



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT 3) Y Bcl-xL EN CÁNCER DE MAMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO
BERENICE ALCALÁ MOTA VELAZCO

ASESORES DE TESIS:

D en C. SERGIO GUTIERREZ CASTELLANOS

D en C. MARTHA EVA VIVEROS SANDOVAL

MORELIA, MICHOACÁN, JUNIO DE 2020

DEDICATORIAS

A mis papás Lic. David Alcalá Delgado y Zorina Mota Velasco Sánchez, por todo el amor y paciencia con que me han cuidado, por sus consejos, por impulsarme siempre a ser una mejor persona y por su apoyo invaluable, sin ellos no sería quien soy.

A mi esposo Raúl Guerrero Moreno, gracias por ser mi soporte, mi compañero de vida, por apoyarme siempre en todos mis proyectos y por contagiarme siempre de tu alegría.

A mis hijos Diana y Raúl, lo mejor que tengo, gracias a ambos por ser excelentes estudiantes y mejores seres humanos y por su indomable espíritu de superación. Dianita gracias por las gráficas, el índice y lo demás.

A mi abuelita Angelina, siempre fuiste un ejemplo de sacrificio y trabajo, gracias por tu cariño, siempre estarás en mi corazón estés donde estés.

A todos los pacientes que padecen de cáncer y que luchan día a día una gran batalla en contra de esa enfermedad, este trabajo es por y para ellos.

AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme todas las facilidades para realizar estudios de posgrado.

A la Dra. Lina Urania Hernández Román jefa del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Dr. Miguel Silva, al Dr. Víctor Hugo Mercado Gómez director del Centro Estatal de Atención Oncológica y al Hospital Regional No. 1 del IMSS por apoyar este proyecto de investigación y permitirme obtener la información clínica de sus archivos y el uso del material biológico para la realización de este trabajo.

Al personal del departamento de Anatomía Patológica del Hospital general Dr. Miguel Silva, patólogos (Dr. Villagrán, Dra. Leilanie, Dra. Jazmín, Dra. Graciela), QFB. Rene, histotecnóloga Esperanza, y a los residentes, por orientarme en mis dudas y apoyarme en todo lo que necesitaba.

A la QFB. Verónica Gómez Ruíz por su apoyo incondicional para la búsqueda del material, bloques, laminillas, inclusión, tinciones, búsqueda de datos, muchas gracias Vero, no lo hubiera logrado sin ti.

Al Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos, por darme un gran proyecto de investigación, por sus enseñanzas, consejos, apoyo y paciencia.

A los miembros de mi Comité tutorial, Dra. Martha Eva Viveros Sandoval, Dr. José Miguel Cervantes Alfaro, Dra. Ana Edith Higareda Mendoza, Dra. Bertha Fenton Navarro por enriquecer este proyecto con sus valiosas aportaciones.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos y sitios de acción de algunos agentes quimioterapéuticos contra cáncer de mama y otras neoplasias.	22
Figura 2. Dominios que constituyen a las proteínas de la familia STAT.	23
Figura. 3 Activación de la vía de transducción de señales STAT.	25
Figura 4. Vías de señalización de STAT3.	27
Figura 5. Representación esquemática del splicing alternativo por el cual se forma STAT3 β y los dominios funcionales de STAT3 α y STAT3 β	31
Figura 6. Mapa de microarreglo de tejidos.	40
Figura 7. Microarreglado terminado	40
Figura 8. Microarreglos elaborados con los casos de cáncer de mama (CM)	40
Figura 9. Distribución del cáncer de mama por grupos de edad.	45
Figura 10. Distribución del cáncer de mama de acuerdo al grado histológico.	46
Figura 11. Distribución por edad de la primera menstruación.	47
Figura 12. Distribución por edad del primer embarazo.	47
Figura 13. Distribución de acuerdo al índice de masa corporal: bajo peso <18.5, normo peso 18.5-24.9, sobrepeso >25, obesidad >30, obesidad I 30-34.9, obesidad II 35-39.9 y obesidad III >40	48
Figura 14. Distribución de la respuesta a la terapia neoadyuvante (Evaluación de Chevallier)	50
Figura 15. Distribución del cáncer de mama por patrón histológico.	51
Figura 16. Clasificación molecular	52
Figura 17. Distribución de casos de cáncer de mama por estadio clínico.	53
Figura 18. Inmunohistoquímica representativa para pSTAT3 y Bcl-xL en casos de carcinoma ductal invasor de mama.	54
Figura 19. Distribución del subtipo molecular respecto a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-xL.	56
Figura 20. Distribución del estadio clínico respecto a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-xL.	57
Figura 21. Curva de supervivencia global en pacientes con cáncer de mama	60
Figura 22. Curva de supervivencia en pacientes con cáncer de mama de acuerdo a la expresión de pSTAT3.	61

Figura 23. Curva de supervivencia en pacientes con cáncer de mama de acuerdo a la expresión de Bcl-xL	62
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama	15
Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.....	38
Tabla 3. Tipos de tratamiento que recibieron las pacientes con cáncer de mama	49
Tabla 4. Distribución de la expresión nuclear de las proteínas pSTAT3 y Bcl-xL en relación al tipo histológico.	55
Tabla 5. Distribución del subtipo molecular de cáncer de mama con relación a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-XI	55
Tabla 6. Distribución del estadio clínico con relación a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-xL	57
Tabla 7. Riesgo relativo entre la expresión de pSTAT3 nuclear y los estadios clínicos (EC) en cáncer de mama.	58
Tabla 8. Relación entre la expresión nuclear de pSTAT3 y Bcl-xL con parámetros clinicopatológicos	59
Tabla 9. Riesgo relativo entre la expresión de pSTAT3 y el estadio ganglionar	60

ABREVIATURAS

ASCO	Sociedad Americana de Oncología
Bcl-xL	Proteína antiapoptótica (Linfoma de células B extra largo)
CSF	Factor estimulante de colonias
CSTE	Cáncer de mama sin tipo específico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER	Receptor estrogénico
Erb	Receptor de factor de crecimiento
ER α	Receptor de estrógeno alfa
ER β	Receptor de estrógeno beta
FAC	5-Fluoruracilo, adriamicina, ciclofosfamida
FEC	5-Fluoruracilo, epirrubicina, ciclofosfamida
FSH	Hormona folículo estimulante
GAS	Secuencia activadora de interferón gama
Gp130	Glucoproteína 130
GPR30	Proteína G acoplada al receptor 30
HER2	Receptor epidérmico humano 2
IL-6	Interleucina 6
IL-6R α	Receptor alfa de interleucina 6
JAK	Janus cinasa
Ki67	Marcador de proliferación celular
LIF	Factor inductor de lisosomas
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
miRNA	Ácido ribonucleico de 22 nucleótidos que regula la expresión de genes

MYC	Oncogén, contribuye al crecimiento celular
OBR	Receptor de leptina
p53	Gen supresor de tumores
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PIAS	Proteína inhibidora de STAT
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PTP	Proteína tirosina fosfatasa
RAF	Proteína con actividad de serina-treonina-cinasa
RAS	Proteína reguladora del crecimiento celular
RB	Regulador negativo de la transición G1/S
RCB	Índice de carga tumoral residual
RP	Receptores de progesterona
RTK	Receptor tirosina cinasa
SERM	Moduladores selectivos de receptor de estrógenos
SH2	Dominio de dimerización de STAT
SMAC	Segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias
SOCS	Supresor de señalización estimulada por citosinas
STAT	Proteína transductora y activadora de la transcripción
TAD	Dominio de activación transcripcional
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNM	Tumor, nódulos, metástasis
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis
Tyr	Tirosina
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	4
Glándula mamaria	4
Expresión de receptores hormonales en la mama normal	5
Carcinoma de mama y carcinogénesis	5
Papel de los estrógenos en el cáncer	7
Carcinogénesis.....	8
Clasificación histológica.....	9
Clasificación molecular	10
Clasificación histológica de Scarff Bloom Richardson para el cáncer de mama	12
Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama	12
Estadificación del cáncer de mama	14
Tratamiento del Cáncer de mama.....	16
Mecanismos de acción de los fármacos utilizados en la quimioterapia	19
Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs)	23
Proteínas STAT 3 y cáncer de mama	26
Proteína Bcl-xL.....	32
Proteína Bcl-xL y cáncer de mama	34
III. JUSTIFICACION	36
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	37
IV. HIPOTESIS	37
V. OBJETIVO GENERAL.....	37
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	38
7.1. Clasificación molecular de cáncer de mama	38
7.2. Estadificación clínica de las pacientes con cáncer de mama	38
7.3 Construcción del microarreglo de tejidos (MAT).	39
7.4 Inmunohistoquímica para la detección de Fosfo-STAT3 y Bcl-xL	41
7.5 Evaluación de la tinción inmunohistoquímica.....	41
7.6 Consideraciones éticas.	42

7.7 Análisis estadístico.	42
DISEÑO EXPERIMENTAL	44
VIII. RESULTADOS.....	45
1. Objetivo. Identificar las muestras histológicas con cáncer de mama de los últimos 3 años que tuvieron estudio inmunohistoquímico de receptores de estrógenos, progesterona y HER2.	45
Características generales de los casos de cáncer de mama.....	45
2. Objetivo. Clasificar los casos de cáncer de mama por tipo histológico, molecular y estadio clínico TNM.....	50
2a) Distribución de casos por tipo histológico	50
2b) Análisis molecular	51
2c) Distribución por estadio clínico TNM	52
3. Objetivo. Analizar la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL.....	53
4. Objetivo. Correlacionar la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el tipo histológico, molecular, estadio clínico y evolución clínica de las pacientes.....	54
4a) Asociación de la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el tipo histológico.....	54
4b) Asociación de la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el subtipo molecular.	55
4c) Asociación de la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el estadio clínico.....	56
4d) Asociación de los componentes del TNM y variantes clínicas con pSTAT3 y Bcl-xL	58
4e) Análisis de la supervivencia global	60
4f) Análisis de la supervivencia global en relación a pSTAT3 y Bcl-xL nuclear.	61
IX. DISCUSIÓN	63
X. CONCLUSIONES.....	68
XI. PERSPECTIVAS.....	69
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMEN

La proteína STAT3 se ha visto implicada en el desarrollo del cáncer de mama porque modula genes implicados en la carcinogénesis. Bcl-xL es una proteína antiapoptótica que favorece mayor supervivencia a las células neoplásicas. Ambas proteínas se asocian con mal pronóstico. El objetivo de este estudio fue asociar el tipo histológico, molecular y estadio clínico con la expresión de las proteínas STAT3 nuclear y Bcl-xL en cáncer de mama. Mediante inmunohistoquímica en microarreglos de tumores (TMA) de 310 casos de cáncer de mama, se analizaron la proteína STAT3 nuclear fosforilada (pSTAT3) y Bcl-xL citoplasmática y nuclear. Se encontró expresión nuclear en 78.2% y 72% de los casos de pSTAT3 y Bcl-xL, respectivamente. Al analizar la expresión de pSTAT3 nuclear en relación al tipo histológico, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.001$) y con el estadio clínico ($P = 0.03$), pero no con el subtipo molecular ($P = 0.52$). Se encontraron un factor protector de pSTAT3 nuclear entre los estadios IIA y IIB (RR, 0.68; IC 95%, 0.517-0.893; $P = 0.014$) y riesgo relativo entre los estadios IIA y IIIA (RR, 2.696; IC 95%, 1.169-6.218; $P = 0.006$); así como entre los estadios N0 y N1 (RR 1.845; IC 95%, 1.123-3.029; $P = 0.006$). La expresión de Bcl-xL total (nuclear y citoplasmática) no mostró diferencias estadísticamente significativas con el tipo histológico ($P=0.06$ y $P=0.20$), con el subtipo molecular ($P=0.14$ y $P=0.70$) ni con el estadio clínico ($P=0.56$ y $P=0.15$). Los resultados de este estudio sugieren que STAT3 tiene una función dual en el cáncer de mama, ya que se presenta como un factor de protección en estadios clínicos tempranos y como factor de riesgo en estadios clínicos localmente avanzados.

Palabras Clave: Tipo histológico, estadio clínico, subtipo molecular, inmunohistoquímica, expresión nuclear.

ABSTRACT

The protein STAT3 has been involved in the development of breast cancer because it modulates genes involved in carcinogenesis. Bcl-xL is an anti-apoptotic protein that promotes greater survival to neoplastic cells. Both proteins are associated with poor prognosis. The aim of the present study was to associate the histological, molecular and clinical stage type with the expression of nuclear STAT3 and Bcl-xL proteins in breast cancer. In tumor microarrays (TMA) of 310 cases of breast cancer, the nuclear STAT3 protein phosphorylated (pSTAT3) and cytoplasmic and nuclear Bcl-xL, were analyzed by immunohistochemistry. Nuclear expression was found in 78.2% and 72% of pSTAT3 and Bcl-xL cases, respectively. In analyzing the expression of nuclear pSTAT3 in relation to the histological type, statistically significant differences ($P = 0.001$) and with the clinical stage ($P = 0.03$) were found, but not with the molecular subtype ($P = 0.52$). A protective factor of nuclear pSTAT3 was found between IIA and IIB stages (RR, 0.68; IC 95%, 0.517-0.893; $P = 0.014$), and relative risk between stages IIA and IIIA (RR, 2,696; IC 95%, 1,169-6.218; $P = 0.006$); as well as between stages N0 and N1 (RR 1,845; IC 95%, 1.123-3.029; $P = 0.006$). The expression of total Bcl-xL (nuclear and cytoplasmic) showed no statistically significant differences with the histological type ($P = 0.06$ and $P = 0.20$), with the molecular subtype ($P = 0.14$ and $P = 0.70$) or with the clinical stage ($P = 0.56$ and $P = 0.15$). The results of this study suggest that STAT3 has a dual function in breast cancer, as it presents both as a protective factor in early clinical stages and as a risk factor in locally advanced clinical stages.

Key words: Histological type, clinical stage, molecular subtype, immunohistochemistry, nuclear expression.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común entre las mujeres en todo el mundo, representa el 16% de todas las neoplasias malignas en este sexo. Se estima que en 2004 murieron 519,000 mujeres por cáncer de mama y aunque este cáncer está considerado como una enfermedad de los países con mayor desarrollo económico, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo (Organización Mundial de la Salud, 2008.)

La incidencia varía mucho en todo el mundo, con tasas normalizadas por edad de hasta 99.4 casos por cada 100,000 habitantes en América del Norte. Europa Oriental, América del Sur, África Austral y Asia Occidental presentan incidencias moderadas, pero en aumento. La incidencia más baja se da en la mayoría de los países africanos, pero también en ellos se observa un incremento de la incidencia de cáncer de mama (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos (Organización Mundial de la Salud, 2008).

En 2018 un estimado de 2.1 millones de mujeres fueron diagnosticadas *de novo* con cáncer de mama, aproximadamente un nuevo caso se diagnostica cada 18 segundos; además 626,679 mujeres murieron por esa causa (Harbeck *et al.*, 2019). La incidencia global del cáncer de mama ha ido en aumento cada año, con un incremento de 3.1%, iniciando con 641,000 casos en 1980 y un aumento a más de 1.6 millones en 2010. La carga mundial del cáncer en las mujeres está aumentando independientemente del nivel de ingresos, debido al crecimiento y envejecimiento de la población. La población femenina representa 49.5% de la población global y representan una gran proporción de la población de más de 60 años de edad (Harbeck *et al.*, 2019).

En países en vías de desarrollo, las pacientes que son diagnosticadas con cáncer de mama son hasta 10 años más jóvenes que en países desarrollados, la proporción de pacientes jóvenes (menores de 35 años) varía desde 10% en países desarrollados a más de 25% en países en desarrollo (Harbeck *et al.*, 2019).

En América Latina y el Caribe, en el 2012, más de 408,000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama y 92,000 fallecieron a causa de esta enfermedad. La proporción de mujeres fallecidas por cáncer de mama con menos de 65 años es más alta en América Latina (57%) que en Norteamérica (41%). Las proyecciones indican que la cantidad de mujeres diagnosticadas con cáncer de mama en América Latina aumentará un 46% en el 2030 (Organización mundial de la Salud, 2014).

En el 2014, del total de casos de cáncer diagnosticados en la población mexicana mayor de 20 años el de mama se ubica en primer lugar entre los tumores malignos (19.4%). En el 2015 la incidencia de tumor maligno de mama fue de 14.80 casos nuevos por cada

100,000 personas en la población mayor de 20 años (INEGI 2014, INEGI 2016). Por grupos de edad, la incidencia alcanza su punto máximo en las mujeres del grupo de 60 a 64 años (68.05 casos por cada 100,000 mujeres), aunque el mayor incremento se observó entre las mujeres de 25 a 44 años y de 45 a 49 años, ya que la cantidad de casos nuevos pasan de 13 a 50 por cada 100,000 mujeres de cada grupo de edad, respectivamente (INEGI 2016, INEGI 2014).

En estudios realizados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en México se identificó un incremento en la incidencia de casos de cáncer de mama en menores de 40 años en comparación con países desarrollados (Lugo, 2018). Se ha reportado que en México y en otros países de América Latina el cáncer de mama se presenta en promedio 10 años antes que, en países desarrollados, ya que mientras en Europa y Estados Unidos la mediana de edad de presentación del cáncer de mama es de 63 años, en nuestro país es de 51 años (Maffuz-aziz et al., 2016). En el 2016 se detectaron 23,000 casos nuevos de cáncer de mama y 15% (alrededor de 3,000), correspondieron a menores de 40 años. El cáncer que afecta a las mujeres más jóvenes es más agresivo y se detecta en etapas más avanzadas (Lugo, 2018). Estas cifras coinciden con las que el INEGI reportó en relación a la tendencia del cáncer de mama hacia una tasa de mortalidad mayor en mujeres más jóvenes (INEGI, 2016). En Michoacán la población de 45 a 64 años registró la cifra más alta de defunciones por tumores malignos (17.2%); en las mujeres, destaca el cáncer de mama (20.5%) (INEGI, 2014).

En México se presentó un aumento continuo en la cantidad de decesos, entre 1980 y 2005 pasaron de 5.6 fallecimientos por cada 100,000 mujeres a 10.1 casos por cada 100,000 mujeres en 2006 (Salinas-Martínez *et al.*, 2014); a partir de este año, el carcinoma mamario se convirtió en la primera causa de muerte por cáncer. Según datos del INEGI, en 2009 ocurrieron 4,964 decesos atribuibles al cáncer de mama, lo que representó el 2% del total de defunciones ocurridas en mujeres. Al igual que en el resto del mundo, en México la tasa de mortalidad se eleva con la edad. En la última década se observó que la tendencia es ascendente en todos los grupos de edad, con un incremento mayor en las mujeres de más de 60 años, en comparación con las mujeres de 40-59 años (Secretaría de Salud, 2011)

El cáncer de mama está incluido en el grupo de enfermedades crónico-degenerativas que cuentan con tratamiento y posibilidades de curación, pero que por diversas complicaciones puede ser causante de la muerte de quien lo padece (INEGI 2016). Se ha observado que conforme aumenta la edad de la mujer se incrementa la mortalidad por cáncer de mama lo cual podría deberse a la respuesta inmunológica del cuerpo al tratamiento, a posibles diagnósticos tardíos, o bien una posible recurrencia de la enfermedad en la zona, nódulos linfáticos o metástasis (INEGI, 2016).

El carcinoma de mama representa un grupo de tumores que muestran características biológicas, manifestaciones clínicas y pronósticos muy diversos. Actualmente se asume que aún en tumores de mama aparentemente semejantes en sus aspectos clínicos y en sus factores de pronóstico clásicos, persiste una diversidad individual

con base en la expresión, en cada caso, de distintos genes en las células involucradas en el proceso tumoral (Arrechea *et al.*, 2011).

No obstante, esta diversidad, se ha avanzado mucho en los lineamientos para establecer los tratamientos del cáncer de mama, que incluyen la caracterización de la enfermedad neoplásica de la mama basada en el estatus del receptor de hormonas y otros receptores en el tejido mamario de las pacientes, así como la identificación de anormalidades genéticas heredables y del riesgo de enfermedad invasiva.

En este sentido, se han estudiado algunas proteínas que podrían estar implicadas en la progresión del cáncer de mama como la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (STAT3) la cual pertenece a una familia de siete proteínas que transmiten señales de citocina activada y receptores del factor de crecimiento epidérmico de la membrana plasmática, al núcleo, donde regulan la transcripción génica (Qin *et al.*, 2019). STAT3 modula la transcripción de genes implicados en la regulación de una variedad de funciones críticas que incluyen diferenciación celular, proliferación, apoptosis, angiogénesis, metástasis y respuesta inmunitaria (Johnston *et al.*, 2011).

La mayoría de las principales enfermedades malignas humanas, entre ellas el cáncer de mama, manifiestan niveles elevados de STAT3 activado constitutivamente, así como perfiles transcripcionales que son consistentes con la expresión del gen regulado por STAT3. Para muchos carcinomas, los niveles elevados de STAT3 activado se han asociado con un mal pronóstico (Johnston *et al.*, 2011).

Bcl-xL, es una proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2. Bcl-xL inhibe la activación de Bak o Bax, que es un evento esencial para la ejecución de la apoptosis (Ikesawa *et al.*, 2017). La sobreexpresión de Bcl-2 o la reducción en la expresión de Bax se asociaron a peor respuesta al tratamiento y peor pronóstico en algunos tumores como el cáncer de mama y el cáncer de ovario (Pazo *et al.*, 2012).

Existe muy poco conocimiento de los factores moleculares que incrementan la carcinogénesis y la capacidad de invasión de las células neoplásicas en el cáncer de mama, entre estos factores se encuentran las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción 3 (STAT-3) y Bcl-xL; el estudio de la expresión de estas proteínas es importante para entender las bases moleculares de la enfermedad, lo cual permitirá establecer blancos terapéuticos más efectivos.

II. ANTECEDENTES

Glándula mamaria

En el ser humano, las dos glándulas mamarias se encuentran sobre el músculo pectoral en la pared torácica superior. La mama está formada por epitelio especializado y estroma (inter e intralobulillar) que pueden dar lugar a lesiones benignas y malignas específicas de este órgano.

Las enfermedades de la mama pueden ser abordadas mejor en el contexto de su anatomía y su histología normal. La mama contiene entre seis y diez sistemas ductales principales. En la mujer adulta, el conducto terminal se ramifica en un grupo de acinos pequeños, similar a un racimo de uvas para formar un lobulillo. Los conductos y los lobulillos están revestidos por dos tipos de células epiteliales; lumbinales y mioepiteliales. Las células mioepiteliales descansan sobre la membrana basal, se disponen como una capa discontinua aplanada de células contráctiles que contienen miofilamentos, las cuales pueden dar origen a los carcinomas triple negativo. Las células epiteliales lumbinales se superponen a las células mioepiteliales, se encargan de la formación de leche y el revestimiento de los conductos excretores principales; las células lumbinales pueden dar origen a los carcinomas de tipo luminal A, B y HER2+. Se ha postulado que una célula madre comprometida en el conducto terminal puede dar lugar a las células tanto lumbinales como mioepiteliales (Kumar *et al.*, 2010).

Los cambios de la mama son dinámicos y profundos durante los años fértiles de la mujer, incluyen cambios cíclicos en su estructura y en su función. Durante la primera mitad del ciclo menstrual los lobulillos son relativamente quiescentes, después de la ovulación, bajo la influencia de los estrógenos y las concentraciones crecientes de progesterona, aumenta la proliferación de células y de acinos por lobulillo (Kumar *et al.*, 2010). La proporción adecuada de progesterona con los estrógenos y sus concentraciones absolutas, son los factores que causan el desarrollo y aumento de volumen de la mama. Los cambios cíclicos que sufre el tejido mamario ocasionado por la estimulación de los estrógenos y la progesterona, hacen de este órgano un blanco susceptible de enfermedades inflamatorias y neoplásicas tanto benignas como malignas (Kumar *et al.*, 2010).

Sólo con la llegada de la gestación, la glándula mamaria alcanza su madurez y funcionalidad, los lobulillos aumentan progresivamente de número y tamaño, al final de la gestación la mama estará compuesta casi en su totalidad por lobulillos separados por un estroma relativamente escaso. Los cambios permanentes inducidos por la gestación podrían explicar el menor riesgo de cáncer de mama observado en las mujeres que tienen hijos a edad temprana (primer embarazo a término antes de los 30 años). Al finalizar la lactancia, las células epiteliales sufren apoptosis, y los lobulillos, regresión (Kumar *et al.*, 2010).

Expresión de receptores hormonales en la mama normal

Hay al menos 2 diferentes receptores estrogénicos (ER), ER α y ER β . Por medio de la inmunohistoquímica se demostró la expresión de ER α en el núcleo de células epiteliales ductales y lobulillares con mayor proporción en los lóbulos que en los conductos; sin embargo, aún en los lóbulos, sólo una pequeña proporción de células presenta ER α , estas células están distribuidas solas o mezcladas con células negativas para ER α (Mills., 2007). Los ER α se incrementan gradualmente con la edad pero permanecen relativamente estables después de la menopausia. En mujeres premenopáusicas, la expresión de ER α varía con la fase del ciclo menstrual, siendo más alta en la fase folicular que en la fase lútea. Las células mioepiteliales no presentan inmunoreactividad para ER α .

Los ER β también se expresan en tejido mamario normal, esta expresión se ha observado no solo en células epiteliales de conductos y lobulillos, también en células mioepiteliales, células endoteliales y células estromales. La expresión de ER β no varía con la fase del ciclo menstrual (Mills., 2007).

Los receptores para progesterona (RP) se expresan en el núcleo del epitelio ductal y lobular; sin embargo, en contraste con la expresión de ER α , la expresión de RP no varía con la fase del ciclo menstrual. (Mills., 2007)

La expresión de receptores de estrógeno (ER) y receptores de progesterona (RP) en el tejido mamario normal se presenta en un pequeño porcentaje de células menos del 10%; esto las distingue de las poblaciones de epitelio neoplásico en los cuales hay mayor expresión de los receptores, el cual puede llegar a ser hasta del 100% (Breastcancer., 2014).

Carcinoma de mama y carcinogénesis

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células, las cuales pueden invadir el tejido circundante y provocar metástasis en puntos distantes del organismo (Organización Mundial de la salud). El cáncer que se origina en el tejido mesenquimatoso, se denomina sarcoma. Las neoplasias malignas que se originan en las células epiteliales, se denominan carcinomas. (Kumar *et al.*, 2015)

El carcinoma es la neoplasia maligna más común de la mama, más del 95% de los tumores malignos de la mama son adenocarcinomas; los demás tipos (es decir, carcinomas de células escamosas, el tumor filoides, sarcomas y linfomas) representan menos del 5% del total de neoplasias (Kumar *et al.*, 2015).

Se han establecido factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama, los más importantes están relacionados con factores hereditarios, exposición a los estrógenos a lo largo de la vida y en menor grado, factores ambientales o del estilo de vida (Kumar *et al.*, 2015), a continuación, se mencionan algunos de ellos:

- Mutaciones en la línea germinal: 5-10% de los casos de cáncer de mama aparecen en personas con mutaciones en la línea germinal de genes supresores de tumores.

- Familiares de primer grado con cáncer de mama: Del 15 al 20% de las mujeres con cáncer de mama tienen una familiar de primer grado afectada, pero no presentan mutaciones génicas identificadas en el cáncer de mama.
- Raza/grupo étnico: Mujeres blancas no hispanas tienen la incidencia máxima, las mutaciones de BRCA1 y BRCA2 son prevalentes en las poblaciones judías. La biología del tumor también varía por el grupo étnico, el cual tiene implicaciones para la diferencia en la mortalidad, mujeres africanas y afroamericanas tuvieron la proporción más alta de tumores triple negativos comparado con otros grupos étnicos, este grupo también tuvo la proporción más alta de enfermedad metastásica y de tumores pobremente diferenciados entre los subtipos, lo cual se asocia con baja supervivencia. (Harbeck *et al.*, 2019)
- Edad. El riesgo de cáncer de mama aumenta a lo largo de toda la vida, alcanzando su máximo a los 70-80 años.
- Edad de la menarquia/menopausia: El riesgo es mayor cuando la menarquia se presenta antes de los 12 años y se reduce incluso hasta 50% cuando se presenta después de los 13 años. La menopausia tardía; es decir, después de los 55 años incrementa 50% el riesgo de cáncer de mama (Sifuentes-Álvarez *et al.*, 2015).
- Edad al tener el primer hijo: Una gestación a término antes de los 20 años disminuye a la mitad el riesgo respecto a nulíparas o que tienen más de 35 años la primera vez que dan a luz a un recién nacido vivo.
- Enfermedad mamaria benigna: La hiperplasia atípica o alteraciones proliferativas aumentan el riesgo de carcinoma.
- Exposición a los estrógenos: La hormonoterapia menopáusica aumenta el riesgo de cáncer de mama.
- Densidad de la mama: las mujeres con mamas muy densas en la mamografía tienen un riesgo de cáncer de mama 6-8 veces superior al de mujeres con una menor densidad
- Exposición a la radiación: La radiación del tórax se asocia a una frecuencia mayor de cáncer de mama, el riesgo es máximo cuando la exposición ocurre en edades jóvenes y con dosis altas de radiactividad.
- Carcinoma de la mama contralateral: 1% de las mujeres con cáncer de mama desarrollan un segundo carcinoma de mama contralateral cada año.
- Dieta: En estudios de gran tamaño se ha conseguido encontrar correlaciones sólidas entre el riesgo de cáncer de mama y la ingesta dietética, así como con el consumo moderado o importante de alcohol.
- Obesidad: Mujeres obesas de menos de 40 años tienen menos riesgo como resultado de los ciclos anovulatorios y las concentraciones menores de progesterona; por el contrario, las mujeres obesas posmenopáusicas presentan un riesgo mayor, atribuido a la síntesis de estrógenos en los depósitos de grasa
- Lactancia materna: La lactancia suprime la ovulación y tal vez active la diferenciación terminal de las células luminales.

En un estudio realizado en México se determinaron como los factores de riesgo más importantes para las poblaciones mexicanas y México-americanas la obesidad y el tipo de

dieta, en particular la ingesta excesiva de carbohidratos y alcohol, la falta de actividad física y la historia familiar; se conservan como factores protectores la dieta rica en folatos y complejo B, embarazos a edad temprana y lactancia materna (Grajales *et al.*, 2014).

El cáncer de mama puede ser **hereditario (familiar)**, apareciendo en mujeres con mutaciones de genes supresores de tumores en la línea germinal, o **esporádico**. No obstante, los factores ambientales influyen claramente en la penetrancia de las formas hereditarias del cáncer de mama. El cáncer de mama hereditario representa el 12% de los casos de cáncer de mama; los principales genes de susceptibilidad conocidos para el cáncer de mama hereditario son: BRCA1, BRCA2, TP53 y CHEK2; todos ellos genes supresores de tumores que participan normalmente en la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad genómica (Kumar *et al.*, 2015). El cáncer de mama asociado a BRCA1, con frecuencia es mal diferenciado y biológicamente muy similar a los casos negativos para RE y para HER2 identificados como de tipo basal. Los carcinomas de mama asociados a BRCA2 también tienden a ser mal diferenciados, pero son positivos para ER con más frecuencia que los BRCA1. Los factores de riesgo principales del cáncer de mama esporádico están relacionados con la exposición a las hormonas: sexo femenino, edad en la menarquia y menopausia, antecedentes reproductivos, lactancia materna, estrógenos exógenos, exposición a la radiación y a sustancias químicas con efectos estrogénicos (Kumar *et al.*, 2015).

Papel de los estrógenos en el cáncer

Es un hecho conocido que las hormonas femeninas se relacionan con el cáncer de mama; hace ya más de 100 años se practicaba la ooforectomía para detener la evolución del cáncer en mujeres premenopáusicas (Majlis, 2008). Todas las hormonas esteroideas entre ellas estrógenos y progesterona se originan del LDL-colesterol del cual se sintetizan precursores androgénicos como la testosterona y la androstenodiona de los cuales por medio de las enzimas aromatasas se formarán estrógenos (estrona y estradiol). Las enzimas aromatasas se encuentran en la granulosa del ovario, el tejido adiposo, los fibroblastos de la piel, la placenta y el cerebro; su síntesis es estimulada por la hormona folículo estimulante (FSH). En la posmenopausia, los sitios de metabolización extraovárico cobran importancia, fundamentalmente el tejido adiposo y la piel, por lo que la aromatización de los andrógenos está directamente relacionada al volumen de tejido adiposo presente en cada mujer; la aromatasas tisular a diferencia de la ovárica no es regulada por la FSH sino por citocinas, factores de crecimiento y glucocorticoides (Samavat *et al.*, 2015. Cóppola *et al.*, 2005). El rol oncogénico de los estrógenos está dado en parte por la hidroxilación de sus moléculas a nivel celular, la generación de radicales que pueden dañar el DNA, junto con la potencial genotoxicidad de los estrógenos y algunos de sus metabolitos. Los metabolitos hidroxilados son: 2-hidroxy-estradiol (2 OHE1), 2-hidroxy-estrona (2 OHE2), 4-hidroxy-estradiol (4 OHER1), 4-hidroxy-estrona (4 OHE2), 16-alfa-hidroxy-estradiol (16 alfaOHE1) y 16 alfa-hidroxy-estrona (16 alfa OHE2). Los estrógenos 2-hidroxilados poseen baja afinidad para unirse con receptores de estrógeno, son inhibidores de la proliferación celular. Los

estrógenos 4-hidroxylados poseen potencial carcinogénico debido a su habilidad para causar daño del DNA por la formación de aductos depurinantes, los cuales generarán mutaciones con el subsecuente daño oxidativo e inicio del cáncer de mama. El 16 α -hidroxysterona es un potencial iniciador tumoral, el cual promueve la síntesis de DNA y el crecimiento celular independiente. Los metabolitos oxidativos de los estrógenos afectan la proliferación y apoptosis del tejido mamario por lo que son potencialmente carcinogénicos (Samavat *et al.*, 2015).

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroides las cuales, ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación a través de sus receptores nucleares: los receptores alfa y los beta (ER α y ER β) los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión a ligando con la consecuente inducción de proteínas y enzimas que activan la síntesis de ácidos nucleicos (Noriega-Reyes *et al.*, 2008) con un efecto proliferativo directo. Los estrógenos también ejercen un efecto indirecto estimulando factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico a través de un tercer receptor de estrógenos transmembranal conocido como GPR30 que actúa de manera independiente de ER α y ER β (Noriega-Reyes *et al.*, 2008). El estradiol puede ser reconocido por la proteína G acoplada al receptor 30 (GPR30), en respuesta al estrógeno, GPR30 inicia funciones no genómicas como estimulación de adenilciclasa, síntesis de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), y activación de las vías de señalización proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) y fosfoinositol 3- cinasa (PI3K).

Finalmente, el estradiol puede activar miRNAs para regular la expresión de genes y los ER α pueden ser activados a través de fosforilación por señales provenientes de receptores de superficie celular tirosina cinasa activados por factores de crecimiento peptídicos (Parl *et al.*, 2018).

Carcinogénesis

Cuando la formación de un tumor ocurre en una glándula hormono-dependiente por una excesiva estimulación hormonal, conduce a una progresión celular desde un crecimiento normal, hiperplasia y, por último, a una transformación neoplásica. Los diversos aspectos histológicos de los carcinomas y las posibles lesiones precursoras son las manifestaciones externas de cambios genéticos complejos y epigenéticos que impulsan la carcinogénesis (Kumar *et al.*, 2010).

Un modelo general de carcinogénesis postula que una célula normal debe adquirir varias capacidades nuevas para convertirse en maligna (Kumar *et al.*, 2010). Cada una de las funciones nuevas puede alcanzarse por un cambio en uno de muchos genes que pueden producir una autosuficiencia en las señales de crecimiento (ER, EGFR, RAS o HER2/neu) o una alteración celular en el control del ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis (p53) (Kumar *et al.*, 2010).

El tipo de célula donde más probablemente se originan la mayoría de los carcinomas es la luminal que expresa ER, puesto que la mayor parte de los casos son ER positivos. Los carcinomas ER negativos pueden originarse en células mioepiteliales ER negativas, eso

puede explicar porque muchas proteínas presentes en las células mioepiteliales son compartidas por los tumores “triples negativos” o similares a las células basales (Kumar *et al.*, 2010).

La oncogénesis no puede centrarse exclusivamente en la célula epitelial, también participan otros componentes tisulares (Kumar *et al.*, 2010). En el caso de los tumores, interactúan con las células malignas un conjunto de células que colaboran con el crecimiento tumoral dando soporte funcional y nutricional, estableciendo lo que se conoce como microambiente tumoral; entre estas células se encuentran fibroblastos anormales, células endoteliales y del sistema inmune innato y adaptativo (Sánchez, C. 2013). La estructura y la función de la mama normal requieren interacciones complejas entre células lumbinales, células mioepiteliales y células estromales. Las mismas funciones que permiten la formación normal de nuevas ramas ductales y lobulillos durante la pubertad y el embarazo pueden desempeñarse durante la carcinogénesis por células epiteliales y/o estromales anormales. La pérdida de estas funciones normales también se produce con la edad y podrían influir en el riesgo mayor de cáncer de mama en mujeres mayores (Kumar *et al.*, 2010).

No se conoce bien el último paso de la carcinogénesis, es decir la transición de carcinoma limitado por la membrana basal dentro de conductos y lobulillos (carcinoma *in situ*) a carcinoma invasor; es posible que esta transición se deba principalmente a la pérdida de la membrana basal y de la integridad tisular por una función anormal de las células mioepiteliales y estromales (Kumar *et al.*, 2010). Algunas células adquieren mutaciones que les permiten desarrollar el potencial de invadir el tejido que las rodea (Invasión) y posteriormente a sitios distantes (metástasis), dentro de estas mutaciones, la mejor caracterizada es la que provoca la disminución en la expresión de E-cadherina en carcinomas, una proteína fundamental en la adhesión con otras células y con la matriz extracelular (MEC) por lo que las células tumorales pierden el anclaje al epitelio (Sánchez, C. 2013). Las células tumorales con capacidad invasiva cambian su fenotipo haciéndose más parecidas a las células mesenquimales, en un proceso denominado transición epitelio-mesenquimal (TEM). Las células pierden las uniones adherentes, cambian su morfología epitelial pareciéndose a los fibroblastos, aumentan la expresión de enzimas que degradan la MEC y aumentan su motilidad, lo que favorece la invasión. Por otra parte, los fibroblastos que rodean a las células tumorales también se modifican favoreciendo el proceso carcinogénico y TEM generando un microambiente pro-tumoral, denominado “estroma reactivo” (Sánchez, C. 2013).

Clasificación histológica

Más del 95% de las neoplasias malignas mamarias son adenocarcinomas; éstos se dividen en carcinomas *in situ* y carcinomas invasores. El carcinoma *in situ* hace referencia a una población neoplásica de células limitada a conductos y lobulillos por la membrana basal, no

invade los ganglios linfáticos ni los vasos sanguíneos ni puede dar metástasis. En cambio, el carcinoma invasor es aquel que ha invadido más allá de la membrana basal hasta el estroma, donde las células también pueden invadir los vasos sanguíneos y de ahí, llegar a los ganglios linfáticos regionales y otros sitios distantes (kumar *et al.*, 2010)

El carcinoma *in situ* se clasifica en ductal y lobulillar, representa del 15 al 30% de todos los carcinomas de mama; el carcinoma ductal *in situ* representa el 80% de los carcinomas, el lobulillar *in situ* representa el 20%.

El carcinoma invasor representa del 75 al 85% de los casos de cáncer de mama. Se distribuye al menos en 8 tipos diferentes, siendo los más frecuentes el carcinoma ductal sin tipo especial (ductal STE) y el carcinoma lobulillar, con una presentación del 79 y 10% de los casos, respectivamente (Kumar *et al.*, 2010).

Clasificación molecular

Debido a que la clasificación histológica es compleja, extensa, laboriosa y la respuesta a los tratamientos es diversa, se inició con la caracterización celular en relación con la expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica. De esta manera se encontró que la mayoría de los carcinomas son positivos para receptores de estrógenos (ER). Entre los tumores negativos para ER, muchos pertenecen a un grupo definido que se llama “similar al basal” (Kumar *et al.*, 2010; OMS, 2003; Harris *et al.*, 2007). De esta manera, se logró identificar subtipos de carcinoma con características morfológicas diferentes, pero con fenotipos similares que presentaron respuesta favorable al tratamiento.

Así, mediante el estudio de la expresión del receptor estrogénico (ER), receptor de progesterona (RP) y del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER2), se subclasificaron los carcinomas de mama en Luminal A, Luminal B, Normal, similar a las células basales y HER2+, a la cual se le conoce como clasificación molecular (Kumar *et al.*, 2010). De hecho, la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) recomienda que a todas las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama se les realice la determinación de los ER y RP para incluir el beneficio del tratamiento endocrinológico (Hammond *et al.*, 2010). Lo mismo se sugiere con la determinación del HER2 en los casos del subtipo invasor al diagnóstico o en la recaída, los cuales se ven beneficiados con el tratamiento de trastuzumab (inhibidor selectivo de HER2) (BREASTCANCER, 2013).

A continuación, se presentan las características de los subtipos de cáncer de mama de acuerdo a la clasificación molecular (Sen Kus *et al.*, 2015; Uribe *et al.*, 2010):

- Luminal A: (40 – 55% de los carcinomas STE) este es el grupo más amplio y se caracteriza por ser ER positivos y HER2/neu negativos. La mayoría son bien o moderadamente diferenciados; suelen afectar a mujeres posmenopáusicas. Estos carcinomas son en general de crecimiento lento y responden bien a los tratamientos hormonales y solo un pequeño número responde a la quimioterapia.

- Luminal B: (15 – 20% de los carcinomas STE) expresan ER, pero en general son de grado más alto; tienen una tasa de proliferación más elevada y se pueden clasificar en los que sobreexpresan HER2/neu y los que no la sobreexpresan, estos tienen una expresión de menos de 20% de RP. Los tumores Luminales B tienen mayor probabilidad de metástasis en los ganglios linfáticos y pueden no responder a la quimioterapia.
- Similar al basal: (13 – 25% de los carcinomas STE) son notables por la ausencia de ER, RP y HER2/neu (denominados triple-negativos) y la expresión de marcadores típicos de las células mioepiteliales (queratinas basales, P-cadherina, p63, etc.). Tienen interés particular por sus características genéticas y epidemiológicas distintivas, son más frecuentes en ciertas poblaciones étnicas y en mujeres jóvenes. Se asocian con un curso agresivo, metástasis frecuentes y pronóstico desfavorable; sin embargo, responden a la quimioterapia.
- HER2 positivo: (7-12% de los carcinomas STE) este grupo comprende carcinomas RE negativos que sobreexpresan la proteína HER2/neu. Suelen ser poco diferenciados, tienen una tasa de proliferación elevada y se asocian a una frecuencia alta de metástasis encefálicas (Sen Kus *et al.*, 2015; Uribe *et al.*, 2010).

El último Consenso Internacional de Expertos de St. Gallen 2013 incluyó el nivel de expresión de Ki67 como marcador fenotípico para diferenciar entre los subtipos moleculares del cáncer de mama (Harbeck *et al.*, 2013). En este consenso se utilizó el Ki67 como marcador diferencial principal, entre los subtipos moleculares del cáncer de mama, por ejemplo, el Luminal A, presenta un Ki67 bajo o menor del 20%, mientras el Luminal B, presenta valores de Ki67 altos o mayores de 20%. Igualmente se reconoce que hasta ahora siguen existiendo dificultades para la unificación de la medición de Ki67, así como la definición del punto de corte para clasificar Ki67 de alto o de bajo grado (Panal *et al.*, 2014).

La clasificación molecular revolucionó el tratamiento del cáncer de mama, por ejemplo, se consideran de buen pronóstico aquellas pacientes con expresión positiva de ER por presentar buena respuesta al tratamiento, mayor tasa de supervivencia y curación; sin embargo, se llegan a presentar algunos casos en los que la respuesta al tratamiento y evolución clínica es contradictoria a la esperada en relación a su caracterización histológico-molecular. Esta variabilidad en la respuesta al tratamiento derivó en una investigación genómica en pacientes con cáncer de mama (Curtis *et al.*, 2012), en la que encontraron diez subgrupos de pacientes de acuerdo al patrón de expresión génica y su evolución clínica. De forma interesante un subgrupo de pacientes del tipo luminal con expresión de ER, presentó altas tasas de mortalidad, por lo que se le asignó como grupo de mal pronóstico; mientras tanto, la mayoría de los casos del tipo semejante al basal (triples negativos) con más de 5 años de seguimiento, se comportaron como de buen pronóstico habiendo pasado este tiempo crítico (Curtis *et al.* 2012).

Clasificación histológica de Scarff Bloom Richardson para el cáncer de mama

Este sistema de clasificación histológica, que posee valor pronóstico, fue propuesto por Bloom y Richardson en 1957 y luego fue modificado por Scarff (Sanz *et al.*, 2005; Ornelas-Aguirre *et al.*, 2013); se basa en una combinación de mediciones del grado nuclear, el índice mitótico y el grado de diferenciación dado por la formación glandular (tubular). Toma en consideración los siguientes parámetros (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2017):

-Diferenciación glandular:

Formación de túbulos en el 75% o más del tumor	1
Formación de túbulos en el 10 – 75% del tumor	2
Formación de túbulos en menos del 10% del tumor	3

-Pleomorfismo nuclear:

Variabilidad escasa en forma y tamaño respecto a las células epiteliales normales	1
Variabilidad moderada en forma y tamaño respecto a células epiteliales normales	2
Variabilidad marcada en forma y tamaño respecto a células epiteliales normales	3

-Índice mitótico:

De 0 a 6 mitosis por 10 campos (40x)	1
De 7 a 10 mitosis por 10 campos (40x)	2
Más de 10 por 10 campos (40x)	3

Una vez determinados los indicadores, se realiza la suma de los 3 números obtenidos, resultando un valor máximo posible de 9, quedando establecido el grado histológico como sigue:

- **Grado I:** Bien diferenciado 3-5
- **Grado II:** Moderadamente diferenciado 6-7
- **Grado III:** Pobremente diferenciado 8-9

Factores pronósticos y predictivos en el cáncer de mama

El pronóstico de las mujeres con cáncer de mama depende de las características biológicas del carcinoma (tipo molecular o histológico) y la diseminación del cáncer (estadio) al momento del diagnóstico. Muchas mujeres con cáncer de mama tienen una esperanza de vida normal, mientras que otras solo tendrán una probabilidad del 10% de estar vivas a los 5 años. Los tumores que se presentan con metástasis a distancia (< 10% de los casos de cáncer de mama) o carcinoma inflamatorio (< 5%) muestran un pronóstico especialmente malo (Kumar *et al.*, 2015). Los factores pronósticos se pueden clasificar en 2 grupos: los relacionados con la extensión del carcinoma y los asociados a la biología del cáncer:

1. Factores pronósticos relacionados con la extensión del carcinoma:
 - a) Carcinoma *in situ* tiene un pronóstico excelente en comparación con el carcinoma invasor.
 - b) Metástasis a distancia; cuando está presente, la curación es improbable, aunque es posible conseguir remisiones y alivio a largo plazo en mujeres con tumores positivos para ER.
 - c) Metástasis en ganglios linfáticos; en ausencia de afectación ganglionar, la supervivencia libre de enfermedad a 10 años es del 70 – 80%, en pacientes con 1 – 3 ganglios positivos es de 35 – 40% y con más de 10 ganglios positivos es de 10 – 15%.
 - d) Tamaño del tumor; los carcinomas inferiores a 1cm de tamaño sin ganglios, tienen una supervivencia a 10 años superior al 90%, mientras que la supervivencia desciende al 77% para los tumores mayores de 2cm.
 - e) Enfermedad localmente avanzada; los carcinomas que invaden la piel o el músculo esquelético tienen un peor pronóstico ya que resulta difícil tratarlos quirúrgicamente.
 - f) Carcinoma inflamatorio; los tumores de mama que se manifiestan con eritema y engrosamiento de la piel tienen un pronóstico malo ya que en la mayoría de las pacientes se demuestran metástasis a distancia, la supervivencia a 3 años es solo del 3 – 10%. Estos carcinomas no tienen un tipo histológico o molecular uniforme, pero más de la mitad (60%) son negativos para RE y el 40 – 50% tienen sobreexpresión de HER2.
 - g) Invasión linfovascular; la presencia de células tumorales en espacios vasculares (linfáticos o capilares) se asocia a la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y a un factor de riesgo de recidiva local.
2. Factores pronósticos relacionados con la biología del tumor:
 - a) Subtipo molecular; está determinado por la expresión de ER y HER2 y la proliferación, siendo un factor pronóstico importante.
 - b) Tipos histológicos especiales; la supervivencia de las mujeres que presentan ciertos tipos especiales de carcinomas invasivos (tubular, mucinoso, lobulillar, papilar, adenoideo quístico) es mayor que la correspondiente a mujeres con carcinomas no clasificados. Las mujeres con carcinoma metaplásico o micropapilar tienen peor pronóstico.
 - c) Malignidad histológica; el grado nuclear, la formación de túbulos y la tasa de mitosis clasifican a los carcinomas invasores en tres grupos muy correlacionados con la tasa de supervivencia global y libre de enfermedad, el de grado 3 es el de peor pronóstico.

- d) Tasa de proliferación; la proliferación puede medirse por el número de mitosis o mediante la detección inmunohistoquímica de ciclínas o Ki-67. Los carcinomas con tasas altas de proliferación conllevan peor pronóstico, pero es posible que respondan mejor a la quimioterapia. La mayoría de los carcinomas negativos para ER y/o positivos para HER2 tienen tasas de proliferación elevadas.
- e) Receptores de estrógenos y progesterona; el 80% de los carcinomas que son positivos para ER y RP responden a la manipulación hormonal, mientras que solo lo hacen cerca del 40% de los positivos únicamente para ER o RP. Los casos con expresión intensa de ER tienen menos probabilidad de responder a la quimioterapia. Al contrario, aquellos tumores que no expresan ER y RP presentan una probabilidad inferior al 10% de responder al tratamiento hormonal, pero más posibilidades de responder a la quimioterapia.
- f) HER2; su sobreexpresión se asocia a supervivencias más cortas, pero su relevancia principal es como factor predictivo de respuesta a los fármacos dirigidos frente a este receptor.

Estadificación del cáncer de mama

De forma habitual, el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama se ha estimado determinando la extensión de la enfermedad en la mama, la afectación de ganglios linfáticos regionales y la presencia o ausencia de metástasis a distancia propagadas por vía hematógena. El sistema principal de estadificación utilizado en la actualidad es el del American Joint Committee on Cancer; se basa en una clasificación denominada sistema TNM, donde T indica el tamaño del tumor primario, N la afectación (presencia de células tumorales) de los ganglios linfáticos regionales y M la presencia de metástasis a diferentes órganos (Kumar *et al.*, 2015).

La estadificación TNM sigue principios generales; la lesión primaria se caracteriza como T1 a T4 conforme va aumentando de tamaño el tumor, T0 denota una lesión *in situ*. N0 indica la ausencia de afectación ganglionar, mientras que N1 a N3 señala la afectación de un número y extensión de ganglios crecientes. M0 quiere decir que no hay metástasis a distancia, y M1 señala la presencia de metástasis (Kumar *et al.*, 2015).

En la tabla 1 se presenta la clasificación completa TNM del cáncer de mama (Secretaría de Salud, 2011)

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama

Estadio	Tamaño del tumor	Ganglio linfático	Metástasis
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

T: Tumor primario
T0: No hay evidencia de tumor primario
Tis: Carcinoma <i>in situ</i>
T1: Tumor de 2cm o menos en su mayor dimensión
T2: Tumor de más de 2cm pero no más de 5cm en su mayor dimensión
T3: Tumor mide más de 5cm en su mayor dimensión
T4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o piel
N: Ganglios linfáticos regionales
N0: No hay metástasis regional de los ganglios linfáticos
N1: Metástasis a ganglio linfático axilar ipsilateral móvil
N2: Metástasis a ganglios linfáticos ipsilaterales unidos entre sí o a otras estructuras
N3: Metástasis a ganglios linfáticos mamarios internos ipsilaterales
M: Metástasis distantes
M0: No hay metástasis distantes
M1: Presencia de metástasis distantes

Tomado de NOM-041-SSA2 (Secretaría de Salud, 2011)

Los cinco estadios (0 a IV) definidos por el American Joint Committee on Cancer se correlacionan fuertemente con la supervivencia.

Heredia-Caballero et al (2018) en su estudio realizado para determinar la supervivencia a 5 años postratamiento de cáncer de mama, encontraron por etapa clínica

a 5 años lo siguiente: I (83%), II (79%), II (82.5%), IV (0%) y reportaron diferencias significativas en la supervivencia al comparar las etapas clínicas I, II y III con la etapa clínica IV, en donde se demostró una supervivencia de 0% (4 casos) y una media de supervivencia de 6.8 meses. La supervivencia global encontrada en este estudio a 5 años fue de 81%, equiparable con la de Europa (81%) y estados Unidos (84%). Para todos los estadios combinados la tasa de supervivencia a 5 años para el cáncer de mama es de 89%, la tasa a 10 años es de 83% y la tasa a 15 años de 78%; todas relacionadas con el diagnóstico en etapas tempranas I a IIA (Allemani et al., 2012).

En la Norma Oficial Mexicana para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama se establecen algunos estándares de referencia en relación con la supervivencia esperada vinculada con la etapa clínica, para la etapa I (93%), II (72%), III (41%), IV (18%) (Secretaría de Salud, 2011).

Tratamiento del Cáncer de mama

El tratamiento integral del cáncer de mama es multidisciplinario, los manejos locorregionales son cirugía y radioterapia y el tratamiento sistémico incluye la quimioterapia (adyuvante y neoadyuvante), la terapia endócrina y la terapia dirigida a blancos moleculares; la elección del tratamiento más adecuado para las pacientes se relaciona directamente con el estadio clínico del cáncer de mama. A continuación, describimos los diferentes tipos de tratamiento de acuerdo con la Guía de Práctica clínica de la Secretaría de Salud en México (Torres-Arreola *et al.*, 2009):

En el carcinoma ductal *in situ* la opción primaria de tratamiento es la escisión completa del tumor más radioterapia, la segunda opción es la mastectomía con o sin reconstrucción y la tercera alternativa es la escisión seguida con observación clínica, la decisión sobre el procedimiento a realizar está en relación al tamaño tumoral, características histológicas tumorales, multicentricidad y el margen obtenido con la cirugía. La disección axilar no debe realizarse. En el carcinoma lobulillar *in situ* se debe realizar biopsia excisional y posteriormente solo vigilancia. Se debe considerar el uso de tamoxifeno en pacientes premenopáusicas y en posmenopáusicas tamoxifeno o raloxifeno con el objeto de reducir la recurrencia.

En el cáncer de mama estadio I y II existen dos procedimientos quirúrgicos bien establecidos; la cirugía conservadora, que incluye la extirpación tumoral con un margen de tejido normal con la preservación de la mama y la mastectomía radical. La cirugía axilar es necesaria para la completa estadificación de la enfermedad, la diseminación metastásica a los ganglios axilares es criterio para indicar un tratamiento sistémico adyuvante. Las pacientes con cirugía conservadora deben recibir radioterapia porque se reduce de 20 a 25% la posibilidad de recurrencia loco regional. En las pacientes con mastectomía si el tumor mide más de 5cm o hay más de 4 ganglios linfáticos positivos está indicada la radioterapia.

Las opciones de manejo para el cáncer de mama estadio III son: Mastectomía seguida de quimioterapia adyuvante y luego radioterapia o quimioterapia neoadyuvante para intentar disminuir el tamaño de la lesión para efectuar un tratamiento conservador seguido de radioterapia. En los estadios IIIA, IIIB y IIIC se considera enfermedad irresecable de inicio por lo que el primer tratamiento debe ser quimioterapia neoadyuvante, seguido de una mastectomía radical si hay respuesta al tratamiento. Si no hay respuesta a la quimioterapia neoadyuvante se debe considerar un tratamiento sistémico adicional de segunda elección y/o radioterapia preoperatoria con valoración posterior de cirugía y en caso de continuar sin respuesta se debe individualizar el tratamiento.

Las pacientes en estadio IV o recurrente se tratan considerando los siguientes factores sitio o sitios metastásicos, estado de receptores de estrógenos, progesterona y HER2/neu y estado funcional del paciente. La OMS recomienda tratamiento para el dolor en pacientes con cáncer de mama, iniciando con fármacos no opioides y solo en caso de dolor intenso utilizar medicamentos opioides. Los bifosfonatos pueden ser usados rutinariamente en pacientes con cáncer mamario avanzado con metástasis óseas sintomáticas (Torres-Arreola *et al.*, 2011).

La quimioterapia adyuvante o adyuvancia, es todo tratamiento antineoplásico administrado después de un manejo quirúrgico; sus objetivos son prolongar el periodo libre de enfermedad, reducir las recurrencias locales y sistémicas y aumenta la supervivencia global. Todas las pacientes con ganglios positivos deben recibir tratamiento sistémico adyuvante y en pacientes con ganglios negativos se tomarán en cuenta el tamaño del tumor y el subtipo molecular.

Los esquemas de quimioterapia adyuvante con mayor evidencia de beneficio son: 5-fluoruracilo, adriamicina y ciclofosfamida (FAC) o 5-fluoruracilo, epirrubicina y ciclofosfamida (FEC), seguidos de taxanos (paclitaxel o docetaxel). También se incluyen otros medicamentos como la gemcitabina, sales platinadas o la capecitabina. (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2017)

La quimioterapia basada en antraciclinas disminuye 33% las recaídas y 27% la mortalidad en mujeres menores de 50 años. Se ha demostrado que la adición de taxanos a la quimioterapia adyuvante, ya sea de forma secuencial o concomitante a los antraciclinos mejora la supervivencia libre de enfermedad, pero no se ha demostrado beneficio en la supervivencia global (Arce *et al.*, 2011).

Inicialmente la neoadyuvancia se utilizó en estadios localmente avanzados, con la finalidad de reducir el tamaño tumoral y facilitar así las diferentes modalidades quirúrgicas, este es un tratamiento sistémico inicial o primario que se administra antes de uno radical (cirugía o radioterapia), las ventajas del tratamiento neoadyuvante son: incrementar las posibilidades de cirugía conservadora y conocer la respuesta patológica al tratamiento, ya que esta terapia se asocia con mejor pronóstico (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2017).

En tumores operables la quimioterapia neoadyuvante tiene como objetivo identificar a las pacientes respondedoras, con base en la expresión de receptores

hormonales, proliferación celular (Ki67) y grado nuclear. El éxito de la quimioterapia está basado en la obtención de una respuesta patológica completa (Arce *et al.*, 2011).

Se considera que el estándar de quimioterapia es de tres a cuatro ciclos con antraciclinas seguidos por tres a cuatro ciclos de taxanos (más trastuzumab en tumores HER2 neu positivos) antes de la cirugía ya que se asocia con mayores posibilidades de respuesta patológica completa. En tumores hormonosensibles con baja tasa de proliferación y bajo grado nuclear se recomienda terapia endócrina neoadyuvante por 6 meses o hasta obtener la máxima respuesta (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2017).

Después de cada ciclo de quimioterapia neoadyuvante debe valorarse la respuesta clínica y tras la administración de tres a cuatro ciclos se recomienda evaluar la respuesta clínica y radiológica al tratamiento mediante mastografía y /o ultrasonido. Cuando el tumor es operable y se realiza la cirugía, se recomienda hacer la evaluación de la respuesta patológica al tratamiento mediante el método de Chevallier (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2011) de la siguiente forma:

- Clase 1: Ausencia de tumor (respuesta patológica completa)
- Clase 2: Presencia de carcinoma intraductal (carcinoma in situ), ausencia de tumor infiltrante y ganglios negativos
- Clase 3: Presencia de carcinoma invasor con respuesta estromal
- Clase 4: Poca modificación del tumor

En caso de que no haya respuesta completa al tratamiento se administrará radioterapia a la mama y áreas linfoportadoras y quimioterapia de segunda línea.

La respuesta patológica a la quimioterapia neoadyuvante, tanto del tumor primario como de las metástasis ganglionares, se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y la recidiva (Tresserra *et al.*, 2013). Actualmente se recomienda reportar los especímenes post-tratamiento con el índice de carga tumoral residual (RCB) del M.D Anderson Center (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2017), para lo cual se requiere la siguiente información: tamaño del tumor residual, densidad celular del carcinoma invasor, número de ganglios linfáticos positivos y diámetro de la metástasis mayor en ganglios linfáticos, esta información se integra en una fórmula matemática en línea para calcular un valor numérico que determina 4 categorías:

- RCB 0: Respuesta patológica completa (no carcinoma invasor ni metástasis a ganglios linfáticos).
- RCB 1: Respuesta parcial, enfermedad residual mínima.
- RCB 2: Respuesta parcial, enfermedad residual moderada.
- RCB 3: Quimioresistente, respuesta mínima o ausencia de respuesta.

En cuanto a las Terapias biológicas, estas se administrarán a las pacientes con cáncer de mama que sobreexpresen HER2neu, el trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humano dirigido en contra de la proteína HER2. Diversos estudios han evaluado el beneficio de trastuzumab concomitante o secuencial con quimioterapia de forma adyuvante, los

resultados combinados demuestran disminución relativa del riesgo de recurrencia o muerte por cualquier causa de 38% (Arce *et al.*, 2011).

Las pacientes con cáncer de mama con tumores hormonossensibles, se podrán beneficiar de terapia endócrina, la decisión dependerá de las condiciones de la paciente, comorbilidades, biología tumoral y perfil de seguridad de cada tratamiento, no está recomendada la quimioterapia concomitante, hay dos modalidades de tratamiento: el tamoxifeno y los inhibidores de aromatasa.

La administración de tamoxifeno durante 5 años como terapia adyuvante ha demostrado una disminución del riesgo de recurrencia de 40% y el riesgo de muerte 35%, así como reducción en el desarrollo de otro cáncer de mama. Los beneficios de tamoxifeno son similares en mujeres premenopáusicas que en posmenopáusicas.

En cuanto a los inhibidores de la aromatasa, estos fármacos representan otra opción terapéutica en el tratamiento adyuvante exclusivo de mujeres posmenopáusicas, administrados de forma inicial o secuencial, han demostrado mejorar la supervivencia libre de enfermedad, no así en la supervivencia global, la duración óptima del tratamiento es de 5 años (Arce *et al.*, 2011).

Mecanismos de acción de los fármacos utilizados en la quimioterapia

Complejos de coordinación de platino (Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino) (Hilala-Dandan *et al.*, 2015): Entran a las células mediante un transportador activo para cobre, dentro de la célula, los ligandos cloro, ciclohexano u oxalato de los análogos son desplazados por moléculas de agua, lo que genera una molécula con carga positiva que reacciona con los sitios nucleófilos en el DNA y las proteínas. Los complejos de platino activados pueden reaccionar con regiones ricas en electrones como los sulfhidrilos y varios sitios del DNA, donde forman enlaces entre las dos cadenas y entre dos puntos de la misma cadena. Los aductos DNA-platino inhiben la replicación y transcripción, causan ruptura en una o ambas cadenas y codificación errónea; si son identificados por p53 y otras proteínas de puntos de verificación, inducen la apoptosis. Los tumores mamarios de tipo basal, como los que tienen mutaciones de BRCA1 y BRCA2, carecen de amplificación HER2 y expresión de receptor hormonal y parecen tener una susceptibilidad única al cisplatino por su intensificación de las vías apoptóticas reguladas por p63 y p73.

Análogos de la pirimidina (Hilala-Dandan *et al.*, 2015): Los antimetabólitos de la pirimidina abarcan un grupo diverso de fármacos que inhiben la función del RNA y el DNA. Las fluoropirimidinas y ciertos análogos de la purina inhiben la síntesis de los precursores esenciales del DNA. Otros, como los análogos de los nucleósidos citidina y adenosina, se incorporan en el DNA y bloquean su elongación y función. Las estrategias para inhibir la síntesis de DNA se basan en la capacidad para crear análogos de sus precursores (timina, citosina, adenina, guanina) que entren con facilidad a las células tumorales y se activen dentro de la célula, por ejemplo el análogo de pirimidina 5-FU se convierte en un desoxinucleótido, el monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), que a su vez bloquea la

enzima TS (Timidilato sintasa), necesaria para la síntesis de nucleótidos de timina que forman parte del DNA y su carencia implica que el DNA no se podrá replicar, lo que inhibe la división celular y por lo tanto el crecimiento tumoral.

Fármacos que dañan los microtúbulos (Hilala-Dandan *et al.*, 2015) : La vinorelbina es un alcaloide purificado de la planta *Catharanthus roseus* que tiene actividad sustancial contra el cáncer pulmonar y mamario. Son fármacos para puntos específicos del ciclo celular, bloquean las células en mitosis, su actividad biológica se explica por su capacidad para unirse de manera específica con la tubulina beta y bloquear su polimerización con la tubulina alfa en los microtúbulos. El huso mitótico no puede formarse, los cromosomas duplicados no pueden alinearse en la placa de división y la división celular se detiene en metafase. Las células bloqueadas en mitosis experimentan cambios característicos de la apoptosis.

Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) tienen propiedades farmacológicas únicas como inhibidores de la mitosis, se unen con un sitio de la tubulina β e inducen, más que inhibir, la formación de microtúbulos, antagoniza su desensamble, lo que aglomera los microtúbulos y genera estructuras anormales derivadas de microtúbulos en la fase mitótica del ciclo celular, esto causa el paro de la mitosis. La muerte celular se produce por apoptosis y depende de la concentración farmacológica y del tiempo de exposición al fármaco.

Antraciclinas y Antracenedionas (Hilala-Dandan *et al.*, 2015): La doxorrubicina y la epirubicina tienen actividad más amplia contra tumores sólidos. Estos fármacos capaces de generar radicales libres, causan una miocardiopatía inusual y a menudo irreversible. Las antraciclinas tienen cuatro mecanismos de acción: Inhibición de la síntesis de DNA y RNA intercalando entre los pares de bases de la cadena DNA/RNA, evitando así la replicación de las células cancerosas de crecimiento rápido, Inhibición de la enzima topoisomerasa II, evitando la relajación del DNA superenrollado y bloqueando así la transcripción y replicación del DNA. Esto conduce a la escisión del DNA mediado por la topoisomerasa II, que produce rupturas del DNA, generación de radicales libres de oxígeno generados por hierro que dañan el DNA, las proteínas y las membranas celulares e Inducción del desalojo de histona de la cromatina que desregula la respuesta al daño del DNA, el epigenoma y el transcriptoma.

Inhibidores de HER2/NEU (Hilala-Dandan *et al.*, 2015): Dos anticuerpos (trastuzumab, pertuzumab) y moléculas pequeñas (lapatinib) tienen efectos antitumorales notables en pacientes con cáncer mamario positivo para HER2 y se han vuelto tratamientos esenciales en combinación con quimioterapia citotóxica para el cáncer agresivo. Los pacientes con tumores con amplificación de HER2/neu tienen tasas de recurrencia más elevadas después del tratamiento adyuvante estándar y mayores tasas de supervivencia general. El dominio interno de las glucoproteínas HER2/neu codifica una tirosina cinasa que activa una serie de señales, que incrementan el potencial metastásico que inhiben la apoptosis. El trastuzumab ejerce sus efectos antitumorales a través de la inhibición de la homodimerización y heterodimerización del receptor, con lo que se evita la activación del receptor de cinasa y la señalización subsiguiente; inicio de la toxicidad celular dependiente de anticuerpos y

mediada por receptor Fcγ; y antagonismo de los efectos angiogénicos de la señalización de HER2.

Moduladores selectivos del receptor de estrógeno (Hilala-Dandan *et al.*, 2015): Los SERM se unen a ER y ejercen sus efectos estrogénicos o antiestrogénicos según el órgano específico. El tamoxifeno es el fármaco antiestrogénico más estudiado contra el cáncer mamario, sin embargo; también tiene efectos agonistas estrogénicos en tejidos extramamarios. El tamoxifeno es un inhibidor competitivo de la unión de estradiol al receptor del mismo nombre, se conocen dos subtipos de receptores de estradiol: ERα y ERβ que muestran diferentes distribuciones tisulares y pueden presentar homodimerización o heterodimerización. La unión del estradiol y SERM a los sitios de unión de estrógeno en sus receptores desencadena un cambio de la conformación de tales receptores, disociación de los receptores de las proteínas de choque térmico e inhibición de la dimerización del receptor. Este último fenómeno (dimerización) facilita la unión del ER a elementos específicos de respuesta estrogénica al DNA (ERE elementos de respuesta a estrógenos) en la cercanía de los genes regulados por estrógenos. Las proteínas correguladoras interactúan con el receptor para intervenir como correpresoras o coactivadoras de la expresión génica. Es posible que la función de las proteínas y los diversos factores de actividad transcripcional, expliquen la variabilidad de la respuesta al tamoxifeno en mujeres que poseen ER en su cáncer mamario.

El fulvestrant es un antiestrogénico esteroideo que se une al ER con una afinidad que rebasa en más de 100 veces a la del tamoxifeno. El fármaco inhibe la unión de estrógeno, pero también altera la estructura del receptor al grado de que éste queda preparado para la degradación por el proteasoma, también puede inhibir la dimerización del receptor. A diferencia del tamoxifeno disminuye el número de moléculas de dicho receptor en las células, como consecuencia el fármaco anula la transcripción de genes estrógeno-dependientes mediada por ER.

Inhibidores de aromatasa (Hilala-Dandan *et al.*, 2015): la aromatasa convierte los andrógenos en estrógenos. Los inhibidores de dicha enzima (AI, aromatase inhibitor) bloquean la actividad enzimática y aminoran la producción de estrógenos. En la actualidad se considera que los AI constituyen la norma asistencial para el tratamiento complementario de posmenopáusicas con cáncer de mama que posee receptores hormonales (receptor hormonal positivo) como tratamiento inicial o en forma seriada después del tamoxifeno.

La aromatasa (CYP19A1) es la encargada de convertir los andrógenos suprarrenales y la androstenediona y la testosterona gonadales en estrógenos, estrona (E1) y estradiol (E2), respectivamente. En las posmenopáusicas dicha conversión constituye la fuente primaria de estrógenos circulantes, en tanto que la producción de estos últimos en las premenopáusicas está a cargo predominantemente por los ovarios. En las posmenopáusicas los AI suprimen gran parte de la actividad aromatasa periférica y origina la privación profunda de estrógenos. Se ha clasificado a los AI tipo 1 (tipo esteroideo) o tipo 2 (no esteroideo), según su estructura y mecanismo de acción. Los inhibidores de tipo 1 son

análogos esteroideos de la androstenediona que se unen de manera covalente e irreversible al mismo sitio de la molécula aromatasa, por lo que se conocen como inactivadores de la aromatasa. Los inhibidores de tipo 2 no son esteroideos y se unen de manera reversible al grupo hem de la enzima y generan inhibición reversible.

Los inhibidores de tercera generación incluyen exemestano, agente esteroideo de tipo 1 y anastrozol y letrozol, imidazólicos no esteroideos de tipo 2. Los AI de tercera generación se usan como parte del tratamiento del cáncer mamario inicial y en fase avanzada en las posmenopáusicas.

Fármacos alquilantes (Hilala-Dandan *et al.*, 2015): (Ciclofosfamida) Sus efectos quimioterapéuticos y citotóxicos tienen relación directa con la alquilación de las aminas reactivas, oxígenos y fosfatos del DNA. La capacidad de los alquilantes para interferir con la integridad y función del DNA, y para inducir la muerte celular en tejidos con proliferación rápida, establece la base para sus propiedades terapéuticas y tóxicas. La letalidad de la alquilación del DNA depende de la identificación del aducto, la creación de rupturas en las cadenas de DNA mediante las enzimas reparadoras y de una respuesta apoptótica intacta. En células que no se dividen, el daño al DNA activa un punto de revisión que depende de la presencia de un gen p53 normal. Las células bloqueadas en la interfase G₁/S reparan la alquilación del DNA o experimentan apoptosis. Las células malignas con p53 mutante o ausente no pueden suspender la progresión del ciclo celular, no experimentan apoptosis y son resistentes a estos fármacos.

En la Figura 1 se muestran los mecanismos generales de acción de los diferentes fármacos antineoplásicos.

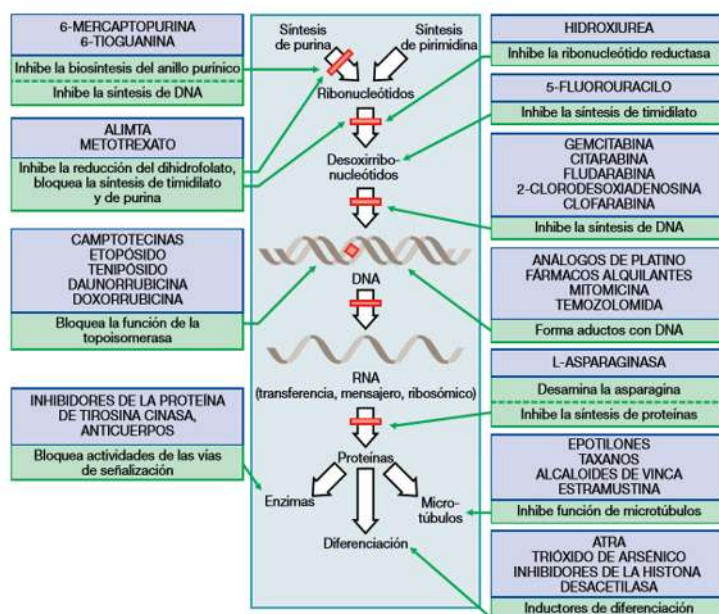


Figura 1. Mecanismos y sitios de acción de algunos agentes quimioterapéuticos contra cáncer de mama y otras neoplasias. (Tomado de Hilala-Dandan *et al.*, 2015)

Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STATs)

La familia de proteínas STAT fue descubierta en la década de los 90's, durante estudios de señalización específicos para receptores de interferón (IFN), los hallazgos iniciales de una familia de proteínas relacionadas, cada una activada por un receptor de citocina diferente sugiere que estas proteínas cumplen los requisitos para llevar información de señalización intracelular inherente a las interacciones citosina-receptor (Levy et al., 2002).

Se han identificado en los mamíferos una familia de 7 proteínas STATs (1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6) éstas comparten algunos dominios con alta homología. El dominio N-terminal promueve la interacción con el co-activador transcripcional CBP/p300 y puede regular la translocación nuclear y la desactivación de las STATs. El dominio de superenrollamiento (coiled-coil) está involucrado con la unión al receptor, con la fosforilación en Tyr, (STAT1 en la 701, STAT2 689, STAT3 705, STAT4 694, STAT5a 694, STAT5b 699 y STAT6 641) y con la exportación nuclear. El dominio de unión al DNA es importante para una actividad transcripcional efectiva, es muy cercano al N-terminal. Dominio SH2 y motivo de activación en Tyr juega un importante papel en la señalización, debido a su capacidad de unir fosfotirosinas que se encuentran en motivos específicos de otras proteínas. El dominio de activación transcripcional (TAD) se encuentra ubicado en el extremo carboxilo terminal; se han caracterizado isoformas truncadas que parecen funcionar como reguladores negativos (Valle, 2005; Figura 2).



Figura 2. Dominios que constituyen a las proteínas de la familia STAT. Descripción de la figura, se encuentra en el texto. (Tomado de Horvath et al., 2000).

Las STATs se localizan en el citoplasma, son una familia de proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción que no solo transmiten la señal de la superficie celular al núcleo, sino que participan directamente en la regulación de algunos genes. Las proteínas STAT's se encuentran involucradas en la señalización intracelular de los receptores de membrana hacia la transcripción de los genes a través de muchas citosinas tales como IL-6 e interferón, los cuales carecen de actividad de cinasa, por lo cual requieren de las proteínas Jak's para fosforilar a las STAT's en un solo residuo de tirosina y en respuesta a la estimulación del receptor por parte de la citocina. Otras proteínas que activan a las STAT1 y STAT3 son numerosos factores de crecimiento, que incluyen el factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este receptor puede fosforilar a las STAT's. También puede ser activado por proteína G, o por cinasas intracitoplasmáticas como Src y Abl (Valle, 2005).

La fosforilación de la tirosina permite la formación de homodímeros o heterodímeros. La base para la dimerización es una interacción recíproca entre los dominios SH2 de una subunidad y una Tyr fosforilada en la otra subunidad de las STAT's. Los dímeros de STAT migran al núcleo y en algunos casos se asocian a otras proteínas, probablemente chaperonas, o se unen a secuencias de 8 a 10 pares de bases, con la finalidad de activar la transcripción de algunos genes. Estas secuencias de DNA específicas llamadas GAS (Secuencia activada por interferón gama) se encuentran presentes en la región promotora de los genes, regulando con ello la transcripción génica (Figura 3).

Por otro lado, también podemos encontrar activación de las STAT's en condiciones patológicas. Un ejemplo lo encontramos en la línea Du-145 de cáncer de próstata, donde una mayor expresión de BRCA 1 resulta en una fosforilación constitutiva de STAT3 tanto en Tyr 705 como en Ser 727. Además, JAK1 y JAK2 interactúan y son activados por BRCA1, indicándonos que esta molécula puede modular la vía JAK-STAT (Valle, 2005). Otro ejemplo lo hallamos en algunas líneas de cáncer de seno. En 6 líneas derivadas de carcinoma de mama se analizó la expresión de ErbB y STAT, la expresión y activación de las STATs fue consistente. Se descubrieron dos niveles de activación de STAT3 en cuanto a su unión al DNA:

- 1.- El efecto inducible por el EGF, requiere un alto nivel de actividad de ErbB1 y de JAK
- 2.- Un efecto que depende de un nivel alto de plasma y es mantenida por una señal parácrina/autócrina y requiere a JAK pero es independiente de ErbB1. La activación de STAT3 se correlacionó con proliferación. También se ha encontrado una activación constitutiva de STAT3, 5 y 1 en cáncer cervical y leucemias aguda y crónica (Valle, 2005).

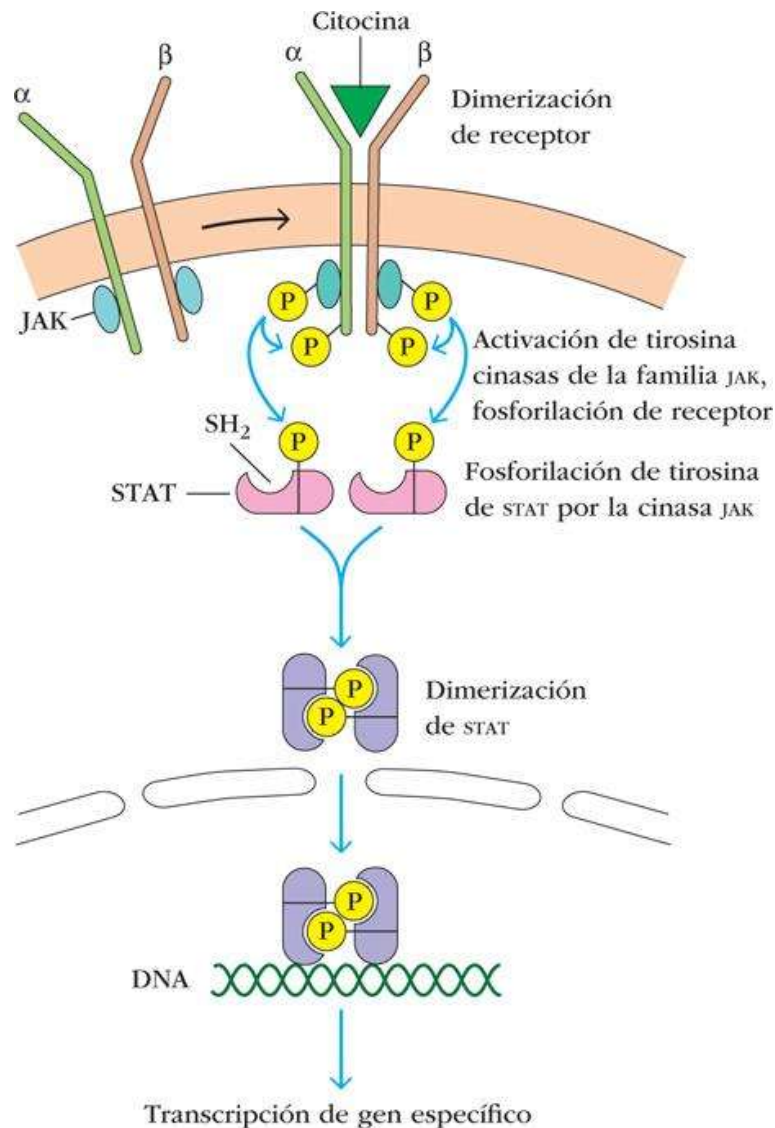


Figura. 3 Activación de la vía de transducción de señales STAT. (Tomado de Owen et al., 2014)

La expresión y activación de los miembros de la familia STAT son regulados en diferentes niveles incluyendo la transcripción y modificaciones post-traduccionales, la fosforilación de tirosina y su impacto en la función celular puede variar con la localización nuclear y citoplasmática. La baja regulación de STAT3 y STAT5a/b por diferentes agentes está asociado con reducción en el crecimiento en líneas celulares de cáncer de mama (Furth., 2014).

STATs 1,3 y 5 a/b se expresan en cáncer de mama humano ER+ y STATs 2,4 y 6 se expresan en líneas celulares de cáncer de mama ER+, se ha reportado un enlace positivo entre la expresión de STAT1 y la positividad de ER. Un estudio reportó que neoplasias positivas para STAT5a/b tuvieron un mejor pronóstico con una respuesta alta al tratamiento endócrino y

supervivencia mayor después de la recaída, en contraste la expresión de STAT3 no se asoció con la respuesta a la terapia o al pronóstico (Futh., 2014).

La expresión de STAT3 se ha asociado con amplificación de HER2, se ha identificado una red de señalización HER2-STAT3 en células madre de cáncer de mama HER2, los mecanismos de enlace entre STAT3 y HER2 incluye a la leptina, que induce el incremento en la expresión de HER2 a través de la señalización de STAT3. (Furth., 2014).

En el cáncer de mama triple negativo se ha demostrado la expresión de STAT 1, 2, 3 y 5, en relación a la expresión de STAT1, en dos estudios su expresión se relacionó con buen pronóstico, mientras que en otro grupo la expresión alta de STAT1 se asoció con enfermedad con ganglios positivos. En estudios in vitro las células de cáncer de mama triple negativo mostraron que la reducción en la acetilación de STAT3 por resveratrol resultó en un incremento en la expresión de RE y aparición de sensibilidad al tamoxifeno (Furth., 2014).

Proteínas STAT 3 y cáncer de mama

STAT3 fue inicialmente identificado como un factor de respuesta de fase aguda (Zhang *et al.*, 2019), es una proteína multifuncional que está involucrada en un notable número de funciones y activa distintos genes en diferentes contextos vía la estimulación de muchos factores, modula la transcripción de genes receptivos implicados en la regulación de una variedad de funciones críticas que incluyen diferenciación celular, proliferación, apoptosis, angiogénesis, metástasis y respuestas inmunitarias (Banerjee, 2015; Johnston, 2011).

En una ruta de señal STAT3 típica, STAT3 se activa mediante Janus quinasa (JAK), más frecuentemente JAK1, por fosforilación de sus residuos de tirosina 705 y serina 727 en el dominio de transactivación, en respuesta a la estimulación por citocinas o también puede ser estimulada por el factor de crecimiento epidérmico. Posteriormente, el STAT3 fosforilado se dimeriza a través de la interacción mutua del dominio SH2. Los dímeros se translocan desde el citoplasma al núcleo y se unen a elementos de respuesta (GAS) en el promotor de genes blanco para estimular la transcripción (Luo *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). La identidad de las serinas cinasas para STAT3 es controversial muy probablemente porque diferentes señales de activación conducen a fosforilación de la serina por alguna de diferentes cinasas incluyendo ERK1, ERK2, p38, JNK y H-7 (Levy *et al.*, 2002). La fosforilación de la serina 727 promueve la asociación de STAT3 con co-activadores como p68 y p300/CBP generando la máxima activación de genes blanco (Zhang, H. *et al.*, 2019).

El estudio en líneas celulares del papel de STAT3 mediante su activación por IL-6, mostraron resultados diferentes dependiendo del tipo celular, por ejemplo, en hepatocitos respuesta de fase aguda, estimulación y proliferación de linfocitos B, arresto del crecimiento y diferenciación de monocitos, mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias. En la glándula mamaria la fosforilación de STAT3 se presenta con la involución de la misma después de la lactancia, la ausencia de STAT3 promueve el retraso del comienzo de la involución (Levy, D.E., Lee C., 2002) en estas condiciones fisiológicas,

STAT3 es requerido para inducir la muerte celular epitelial mediada por lisosomas donde LIF funciona como el activador (Zhang et al., 2019). STAT3 como otras proteínas STAT se han implicado en el desarrollo de cáncer, ya que median funciones de supervivencia e inducción de genes antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL (Levy et al., 2002). Además, se ha mostrado que STAT3 coopera con c-Jun para suprimir la expresión de FAS, un mediador de la vía extrínseca de la apoptosis (Zhang et al., 2019).

La mayoría de las enfermedades malignas humanas (leucemias, linfomas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer gástrico) presentan un nivel elevado de STAT3 activada constitutivamente y se ha asociado a mal pronóstico (Johnston., 2011).

Existen múltiples vías que conducen a la activación de STAT3 e incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), miembro de la familia ErbB/HER de RTK. La familia de receptores de citocina de tipo IL-6 que forman complejos con gp130, JAKs; varios factores de crecimiento G-CSF, HGF, LIF; IL-12, IL-10, IFNs, hormonas y v-Src (Zhang et al., 2019) Figura 4. En neoplasias se han detectado niveles elevados de ligandos activadores de STAT3, tales como TGF α o IL-6 en el suero y/o microambiente tumoral que pueden producirse de manera autócrina, parácrina o endócrina (Banerjee, 2015; Johnston, 2011).

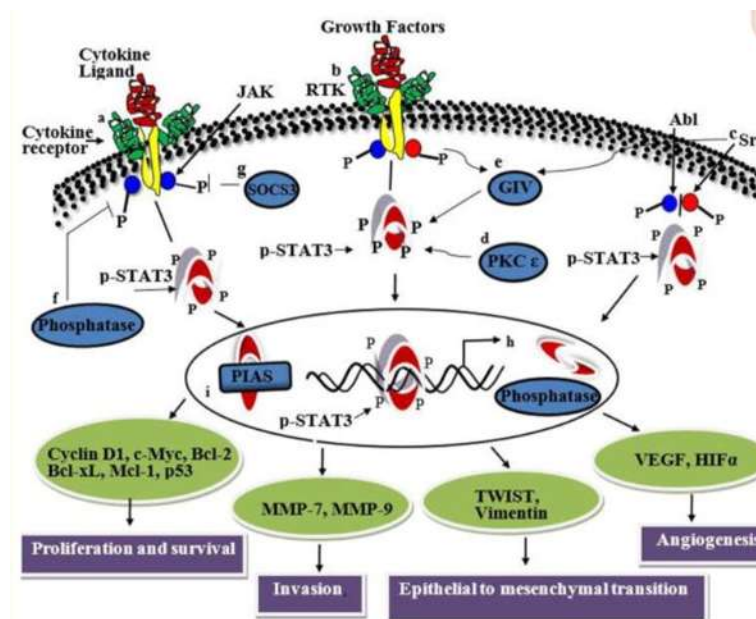


Figura 4. Vías de señalización de STAT3. a) activación a través de citosinas b) activación a través de factores de crecimiento c) receptores no tirosina-cinasa. También se identifican los reguladores negativos (f, g, h, i) (Tomado de Banerjee y Resat, 2015).

La inflamación crónica se ha asociado con la patogénesis del cáncer de mama; las citosinas de la familia IL-6, pueden promover el desarrollo de esta neoplasia, dependiendo

del tipo de hormona o receptor de factor de crecimiento presente en la superficie de las células.

STAT3 está constitutivamente activada en todos los subtipos moleculares de cáncer de mama, pero se asocia más frecuentemente con tumores triples negativos; en este, el mecanismo de activación de STAT3 es a través de la producción autócrina y parácrina de IL-6 (Banerjee, 2015).

Aunque IL-6 se ha descrito como anti-inflamatorio en algunos casos, también juega un rol esencial en la promoción de la inflamación y la respuesta inmune. La vía de señalización clásica de IL-6 se inicia a través de la unión de IL-6 con la subunidad α del receptor de IL-6 (IL-6R α), este complejo se une para la transducción de señales a la glicoproteína 130 (gp130) con lo cual se induce la autofosforilación y trans-fosforilación y activación de JAK 1 y 2 y Tyk2. JAK fosforilado en su residuo de tirosina, sirve como sitio de unión para la señalización de moléculas incluidas STAT1, STAT3, SHP2 y PI3 cinasa, estas moléculas funcionan como factores de transcripción o reguladores enzimáticos de cascadas de señalización río abajo, esta vía de señalización está estrechamente regulada, ya que el IL-6R α se encuentra exclusivamente en hepatocitos y algunos leucocitos. Sin embargo, hay un modo de activación adicional que involucra mecanismos trans-señalización dependientes de una forma soluble de IL-6R α (sIL-6R α). sIL-6R α se une a IL-6 directamente en solución permitiendo la formación del complejo IL-6/sIL-6R α el cual se une en trans para activar gp130 anclada a la membrana en las células de todo el cuerpo, con lo cual se expande el pool de células que responden a IL-6 (Fisher et al., 2014).

Altos niveles séricos de IL-6 se consideran como un indicador de mal pronóstico en pacientes con tipos histológicos diversos de cáncer gástrico, pancreáticos, de mama, de colon, mieloma y cáncer de pulmón (Fisher. D., et al 2014). La fuente primaria de IL-6 en el microambiente tumoral incluye células tumorales, TAM (macrófagos asociados a tumor), neutrófilos, MDSC (células supresoras derivadas de la médula) TCD4 (células T CD4) y fibroblastos. El inicio de las vías de señalización de IL-6 en células neoplásicas activa mediadores de proliferación celular que están estrechamente controladas bajo condiciones de homeostasis. La desregulación de la activación de STAT3 en cáncer es un evento que se caracteriza por transformación celular por lo que STAT3 se considera un oncogén (Fisher et al., 2014).

Se han encontrado mutaciones en STAT3, a menudo en el dominio SH2, el cual controla la dimerización de STAT3, causando hiperactivación constitutiva. La activación de STAT3 dependiente de la trans-señalización de IL-6 puede llevar a la progresión del cáncer a través de la transcripción de genes blanco incluidos reguladores del ciclo celular como ciclina D1, el proto-oncogen c-myc, reguladores transcripcionales como junB, c-fos y C/EBP β y C/EBP δ y reguladores metabólicos como mTORC1 (Fisher et al., 2014).

En el caso de c-myc el cual es un importante regulador de la progresión del ciclo celular de G₁-S, STAT3 activado se une directamente con el promotor de c-myc y ayuda a conducir la transcripción de c-myc. STAT3 blinda E2F del complejo represor que normalmente limita la activación de c-myc por E2F, la activación de c-myc promueve la

proliferación por aumento de la expresión de ciclina D1 y reprime el punto de control del ciclo celular por la proteína p21. IL-6 a través de STAT3 también apoya la supervivencia celular por inducción de la expresión de proteínas anti-apoptóticas incluyendo bcl2, Bcl-xL y survivina. Estudios en células de cáncer de mama humano reportaron que la expresión de survivina esta aumentada a través de la unión de STAT3 al promotor de survivina mientras que la inhibición de STAT3 bloquea la transcripción de survivina e induce apoptosis de las células tumorales (Fisher *et al.*, 2014)

STAT3 es un elemento central de la vía de señalización de receptores de la familia HER; el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) presenta una fuerte asociación con la activación nuclear de STAT3 en el carcinoma de mama primario. El segundo miembro de la familia HER, HER2/Erb2/neu, es un proto-oncogen que está amplificado en cerca de 25-30% de los carcinomas de mama humanos y este rol puede ser dependiente del estado de receptores hormonales para estrógeno y progesterona (ER y PR). En un ensayo clínico con 71 muestras en microarreglos de tejido de cáncer de mama primario ER+ se encontró sobreexpresión de HER2 y fosforilación constitutiva de STAT3 (Banerjee *et al.*, 2015).

Las funciones de señalización del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR2) son una importante vía de supervivencia en células de cáncer de mama; el VEGF promueve a la célula iniciadora tumoral a través de VEGFR/STAT3. Cuando se consideran juntas las vías de EGFR y VEGFR directa o indirectamente participan en la activación de STAT3 lo que lleva a un comportamiento más agresivo del tumor de mama (Banerjee *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Luo *et al* (2017) en células de cáncer gástrico se determinó que los niveles de expresión de STAT3 fueron mucho más altos en las células neoplásicas que en las células gástricas normales, también determinaron el incremento de la proliferación celular por STAT3 y la asociación positiva entre STAT3 activada y la expresión de ciclina D1, la cual puede ser responsable de promover la proliferación y progresión en el ciclo celular en la célula neoplásica (Luo *et al.*, 2017).

Algunas hormonas como la leptina, prolactina e insulina cumplen una función fundamental en la génesis tumoral, su importancia radica en que participan en la cascada de señalización de las STAT, la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la fosfatidilinositol 3-cinasa (PKI3), vías que regulan la expresión génica (Herrera-Covarrubias, *et al.*, 2015).

La leptina es secretada primordialmente por los adipocitos de la grasa subcutánea, su receptor (OBR) pertenece a la gran familia de receptores de citocinas de clase I, su activación puede desencadenar el inicio de vías de señalización a través de la tirosina cinasa (JAK2), cuya activación lleva a la fosforilación de las STAT las cuales son primordiales en la respuesta inmune y en el microambiente tumoral donde pueden promover o inhibir el cáncer (Herrera-Covarrubias *et al.*, 2015).

Cuando la leptina se une a su receptor OBR promueve la proliferación y el desarrollo de las células de cáncer de mama. La síntesis y niveles plasmáticos de leptina aumentan de

acuerdo al total de masa de tejido adiposo y la leptina podría ser producida por fibroblastos asociados al cáncer. La leptina activa la señalización del receptor de estrógeno (ER), así como las vías de señalización JAK/STAT3 y PI3K/AKT promoviendo la proliferación de las células de cáncer de mama (Wu *et al.*, 2019). Además, la leptina aumenta la expresión de ciclina D y de cinasa dependiente de ciclina 2, las cuales aceleran el ciclo celular de células de cáncer de mama, además leptina e IL-1 promueven la expresión de VEGF/VEGFR (Wu *et al.*, 2019).

La invasión y metástasis son pasos críticos para el pronóstico de la neoplasia, muchos estudios han mostrado que STAT3 promueve la invasión y el potencial metastásico de las células neoplásicas ya que activa la transición epitelio-mesenquimal vía la sobre-regulación de Twist-1, Snail y ZEB-1 (Zhang *et al.*, 2019). Además, STAT3 incrementa la expresión de varias metaloproteinasas, las cuales facilitan la capacidad invasora de las células neoplásicas por degradación de varias proteínas de la matriz extracelular (Zhang *et al.*, 2019).

STAT3 es regulada negativamente por: proteín-tirosin fosfatasas (PTPs), supresores de señalización estimulada por citosinas (SOCS) y proteína inhibidora de STATs activada (PIAS) Figura 4. Las PTPs juegan un rol importante en la estrecha regulación de los niveles de STAT3 fosforilada en las células. PTPN2 sirve potencialmente como un supresor de tumor porque disminuye la fosforilación de sus sustratos, los cuales incluyen RTKs (receptores tirosina-cinasa) y familia de cinasas Src (SFKs) (Banerjee *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2019).

Las proteínas SOCS, se encargan de regular las señales de citosinas, las cuales son importantes para la función de las células de la mama; como hormonas tróficas y como mediadores de mecanismos de defensa del huésped contra el cáncer de mama. En cáncer de mama, la pérdida de la expresión de SOCS se asocia con pobre pronóstico. Ellas suprimen las señales de citosinas por inhibición directa de JAKs o por unión a los receptores de tirosina fosforilada, así bloquean la unión con otras proteínas que contengan en su estructura SH2 (Banerjee *et al.*, 2015).

Las proteínas PIASs son inhibidores endógenos de las proteínas STAT. PIAS3 controla el grado y duración de actividad de STAT3 en células normales y previene su función oncogénica. Su expresión esta suprimida post-transcripcionalmente en células con cáncer, posiblemente mejorando los efectos oncogénicos de STAT3 (Banerjee *et al.*, 2015).

En 2009, Gough y colaboradores identificaron STAT3 en la mitocondria (Zhang *et al.*, 2019) y su importancia dependía de la fosforilación de S727 (Zhang *et al.*, 2019). El STAT3 mitocondrial apoya la actividad de la cadena de transporte de electrones, la cual se requiere para la producción de ATP (trifosfato de adenosina) y la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial. Estas actividades mitocondriales de STAT3 tienen consecuencias en la homeostasis del tejido normal por ejemplo en crecimiento neural y función cardíaca y en condiciones patológicas como crecimiento tumoral y daño tisular en respuesta a lesión por isquemia/reperfusión (Zhang *et al.*, 2019).

El potencial oncogénico de STAT3 ha sido bien documentado; sin embargo, se ha encontrado evidencia en estudios experimentales y clínicos que sugiere que STAT3 puede

también tener un rol como supresor de tumor en contextos específicos (Zhang *et al.*, 2016). Además, STAT3 nuclear o pSTAT3^{Y705} se correlacionó con un mejor pronóstico en múltiples neoplasias como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de glándula salival, carcinoma de mama de bajo grado o con ganglios negativos, carcinoma colorectal y carcinoma nasofaríngeo (Zhang *et al.*, 2016).

Se ha descrito la existencia de dos isoformas de STAT3, STAT3 α y STAT3 β (Zhang *et al.*, 2016) STAT3 β es una forma truncada de la longitud total de STAT3 α , es generada por splicing alternativo del exón 23 (Zhang *et al.*, 2016). STAT3 β es idéntica a STAT3 α con excepción de 55 amino ácidos en la C-terminal de STAT3 α que son sustituidos por una secuencia de 7 amino ácidos de STAT3 β (Zhang *et al.*, 2016), en comparación con STAT3 α , STAT3 β carece del dominio de activación transcripcional (TAD) en el C-terminal (Figura 5).

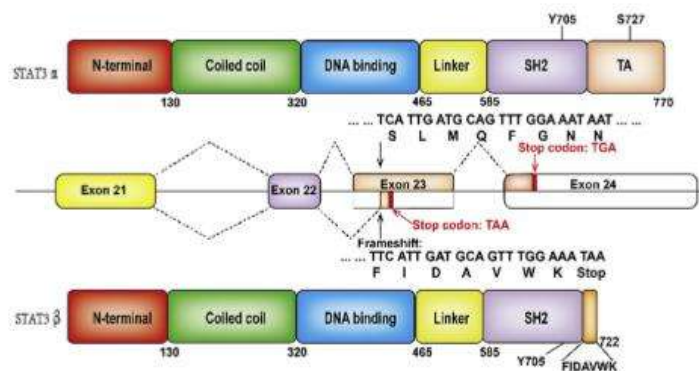


Figura 5. Representación esquemática del splicing alternativo por el cual se forma STAT3 β y los dominios funcionales de STAT3 α y STAT3 β . (Tomado de Zhang *et al.*, 2019)

Schaefer *et al.* (1997) encontraron que STAT3 β activado es más estable y tiene una mayor actividad de unión al DNA que el STAT3 α activado. Sin embargo, STAT3 α muestra una mayor actividad transcripcional que STAT3 β , ellos consideran que esto se debe a la cola acida en C-terminal de STAT3 α la cual puede desestabilizar los dímeros activos de STAT3 α , resultando en una baja actividad de unión de STAT3 α y una desfosforilación más rápida (Zhang *et al.*, 2019). STAT3 β tiende a estar constitutivamente fosforilado en tirosina 705 y se une al DNA para promover la transcripción en ausencia de citocina, mientras que STAT3 α no, indicando el incremento de la vida media de la fosforilación de tirosina en STAT3 β (Zhang *et al.*, 2019). STAT3 β también mejora y prolonga la fosforilación y retención nuclear de STAT3 α para lo cual es necesaria su fosforilación en Y705 y dimerización (Zhang *et al.*, 2019), una razón posible que podría explicar este fenómeno es que la cola hidrofóbica de STAT3 β la protege de la desfosforilación o de la degradación por proteosomas y de esta manera se mantienen los dímeros formados con STAT3 β (STAT3 α /STAT3 β , STAT3 β /STAT3 β)

constitutivamente fosforilados, una unión al DNA estable y la habilidad para combinarse con otros co-activadores (Zhang *et al.* 2019).

Un fenómeno paradójico es que la expresión forzada de STAT3 β incrementa substancialmente el nivel de pSTAT3 α^{Y705} la cual es considerada oncogénica; sin embargo, STAT3 α está retrasada en presencia de suficiente STAT3 β lo cual indica que pSTAT3 α^{Y705} es oncogénica o carcinoestática dependiendo del estado de expresión de STAT3 β (Zhang *et al.*, 2016). STAT3 β también funciona como un regulador transcripcional y específicamente regula genes por cooperación con otros factores como C-Jun y STRA13, ya que carece de TAD (Zhang *et al.*, 2019).

Por otra parte, STAT3 β se ha descrito como como supresor de inflamación sistémica ya que participa directa o indirectamente en la regulación de la expresión de IL-10 que funciona como un regulador inflamatorio (Zhang *et al.*, 2019), En un estudio realizado por Wang *et al.* (2004) se refiere que STAT3 β sobre-regula la expresión de citosinas en células de melanoma B16, lo cual induce la activación de macrófagos, granulocitos y células dendríticas poniendo en evidencia la función antitumoral de STAT3 β (Zhang *et al.*, 2019), además la expresión de STAT3 β en macrófagos también exhibió efectos antitumorales en cáncer de mama de ratón, indicando que esta proteína puede jugar un rol muy importante en las células del microambiente tumoral (Dang *et al.*, 2015).

Hasta la fecha el rol negativo de STAT3 β se ha reportado en varios tipos de cáncer como el melanoma, cáncer de mama, de esófago, pulmón y colon (Zhang *et al.*, 2019), se ha descrito la inducción de muerte celular por STAT3 β ya que disminuye la expresión de Bcl-xL, ciclina D1 y factores solubles de necrosis, así como la disminución en la expresión de genes involucrados en la transformación neoplásica (Zhang *et al.*, 2019). En un estudio realizado por Zhang *et al.* (2016) en carcinoma escamoso de esófago se encontró que una expresión moderada/fuerte de STAT3 β se correlacionó significativamente con una supervivencia global y una supervivencia libre de recurrencia mayor y fue menos probable que tuviera metástasis a ganglios linfáticos. Estos hallazgos indican que STAT3 β es un factor protector independiente para la supervivencia de los pacientes (Zhang *et al.*, 2016).

STAT3 β juega un importante papel con regulador/represor de STAT3 α , ya que “amortigua” la actividad transcripcional transitoria e intensa de STAT3 α , evitando así su activación excesiva; mientras tanto, los niveles altos de STAT3 β amplifican su rol en la regulación de la inflamación, inmunidad y apoptosis, efecto “amortiguador” en cáncer (Zhang *et al.*, 2019).

Proteína Bcl-xL

Bcl-xL es una proteína que pertenece a la familia de proteínas Bcl-2. Dicha familia incluye moléculas con actividad pro y antiapoptótica. Aquellas con actividad antiapoptótica se encuentran como proteínas integrales de la membrana mitocondrial externa y también en la membrana nuclear y el retículo endoplasmático, mientras que diversos miembros con

actividad proapoptótica se encuentran en el citosol o en asociación al citoesqueleto. Una característica relevante de estas últimas es su capacidad para traslocarse y asociarse con proteínas de membrana, regulando la vía apoptótica mitocondrial al controlar la permeabilidad de la membrana mitocondrial que libera al citocromo c y SMAC (segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias) hacia el citosol, los cuales activan las caspasas y una serie de eventos posteriores, que finalmente resultan en la muerte celular. Las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en 3 grupos, la proteína Bcl-xL pertenece al grupo 1, con actividad prosupervivencia, cuya función es protección a la célula de diversas alteraciones citotóxicas (Ramírez-García *et al.*, 2014).

Las células malignas evitan la apoptosis a través de la regulación positiva de las proteínas antiapoptóticas y la regulación a la baja de las proteínas proapoptóticas. Los miembros de la familia Bcl-2 antiapoptóticas se sobreexpresan en una variedad de carcinomas a través de alteraciones genéticas como la translocación cromosómica (Bcl-2) o la amplificación (Bcl-xL y Mcl-1). Estas proteínas antiapoptóticas contienen un surco hidrofóbico que se une a las proteínas proapoptóticas, Bax y Bak, que son efectores esenciales responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, el equilibrio entre estos dos miembros opuestos es crítico para determinar el destino de la célula. La sobreexpresión de proteínas Bcl-2 antiapoptóticas en carcinomas inclina el equilibrio hacia la supervivencia celular. La inhibición farmacológica de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 en el cáncer se ha convertido en una estrategia importante para inducir la apoptosis y la regresión del tumor (Choi *et al.*, 2016).

Estudios realizados en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer sugieren que además de la regulación de la apoptosis, los miembros de Bcl-2 pueden tener otras funciones biológicas; por ejemplo, Bcl-xL promueve la invasión y metástasis del tumor neuroendocrino pancreático; en células de cáncer colorectal la sobreexpresión de Bcl-xL promueve la migración celular y en cáncer de pulmón induce la transición epitelio-mesenquimal, estas funciones son independientes de su actividad antiapoptótica y el responsable de esta función es el Bcl-xL nuclear, pero no el Bcl-xL mitocondrial o Bcl-xL fuera del núcleo (Choi *et al.*, 2016).

La sobreexpresión de Bcl-xL se asocia con crecimiento tumoral, comportamientos biológicos malignos y supervivencia, la regulación al alza de Bcl-xL se observa con frecuencia en muestras humanas y se asocia con peor pronóstico. En un estudio realizado por Ikesawa *et al* (2017) en modelos de ratones Bcl-xLTgP-KrasG12D, la sobreexpresión de Bcl-xL aceleró la carcinogénesis, todos los ratones desarrollaron carcinoma ductal pancreático rápidamente (2 meses) en comparación con ratones mutantes exclusivamente para Kras, los cuales mostraron solo lesiones de adenocarcinoma *in situ*; esto sugiere que la regulación de Bcl-xL en presencia de la mutación Kras causa progresión rápida de carcinomas pancreáticos *in situ* de bajo grado a carcinomas *in situ* y adenocarcinomas ductales pancreáticos de alto grado, se sugieren dos mecanismos por los cuales la sobreexpresión de Bcl-xL aceleró la progresión tumoral: inhibición de la apoptosis e inhibición de la senescencia inducida por oncogenes. Con respecto a la senescencia de las células

neoplásicas, estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de Bcl-xL inhibe la senescencia al evitar la generación de especies reactivas de oxígeno (Ikesawa *et al.*, 2017).

Proteína Bcl-xL y cáncer de mama

En células metastásicas de cáncer de mama presentes en nódulos linfáticos, la presencia de Bax y Bcl-xL se asoció con el sustrato receptor de la insulina (IRS-1); esto se correlacionó positivamente con el marcador Ki67 como indicador de crecimiento celular en cáncer de mama primario y metástasis nodular (Wincewicz *et al.*, 2009). Al evaluar la apoptosis en relación a la respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama avanzado, se encontró que el 26% de los casos con expresión de Bcl-xL se asoció con la progresión de la enfermedad y el 40% con expresión de Bcl-xL se asoció con respuesta pobre al tratamiento. Así mismo, en este mismo grupo de pacientes, al analizar la expresión de Bcl-xL con los factores biológicos del tumor, se encontró que el 43% se asoció a progresión de la enfermedad y el 23% a respuesta pobre al tratamiento (Sjostrom *et al.*, 2002). El ligando relacionado al factor de necrosis tumoral (TNF) inductor de apoptosis (TRAIL) es miembro de la familia del TNF capaz de inducir muerte celular en células tumorales. En modelos animales, TRAIL suprimió eficientemente los tumores sin toxicidad detectable. Sin embargo, en la línea celular SK-BR-3, que sobreexpresa Bcl-xL, fue resistente a la apoptosis inducida por TRAIL. Lo anterior sugiere que algunos tipos de cáncer de mama utilizan la vía Bcl-xL para protegerse de la muerte celular inducida por mecanismos inmunes y tratamientos farmacológicos (Kim *et al.*, 2003).

La sobreexpresión de Bcl-xL induce la transición epitelio-mesenquimal con lo cual se promueve la migración celular y las metástasis en líneas celulares de cáncer de mama en modelos de xenoinjerto. Esta sobreexpresión de Bcl-xL en el cáncer de mama está asociada con un grado tumoral alto, invasión local en el estroma y metástasis ganglionares. En un análisis realizado con dos líneas celulares de cáncer de mama humano, MCF-7 (tipo Luminal, ER+) y HCC1954 (tipo basal, HER2+) y la línea celular N134, Bcl-xL localizado en el núcleo promovió la migración e invasión de MCF7 y HCC1954, mientras que la Bcl-xL mitocondrial no lo hizo, por lo que estos datos sugieren que Bcl-xL funciona en el núcleo para promover la migración y la invasión de múltiples tipos de cáncer (Choi *et al.*, 2016).

Los mecanismos que incrementan el crecimiento de células que sobreexpresan Bcl-xL no están totalmente caracterizados, pero el consenso general es que Bcl-xL proporciona ventajas de supervivencia a las células neoplásicas que se encuentran bajo presión apoptótica inducida por la terapia o por alteraciones oncogénicas. La permeabilidad de la membrana mitocondrial externa es la vía primaria por la cual las células neoplásicas mueren en respuesta a la radioterapia, quimioterapia y a diversos estímulos que les condicionan estrés, la modificación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa es parte de un mecanismo supresor tumoral intrínseco inducido por alteraciones oncogénicas que dirigen a una expresión alterada de C-MYC o pérdida del supresor tumoral pRB. Estas alteraciones imponen una presión sostenida que podrían seleccionar a las células de cáncer

con niveles altos de Bcl-xL. Sin embargo, no todas las señales oncogénicas aumentan la carga apoptótica de las células neoplásicas y en algunos casos la actividad oncogénica la alivia, por ejemplo, la actividad de RAS inhibe la apoptosis (Trécesson *et al.*, 2017). En un estudio realizado mediante análisis proteómico y funcional se determinó que en los carcinomas de mama de tipo basal la expresión de Bcl-xL no está correlacionada con la expresión positiva de MYC ni con la expresión negativa de pRB; en cambio, se encontró que los niveles de expresión de Bcl-xL correlacionaron con los de KRAS y río abajo con activación de RAF. Esto indica un enlace entre la activación de RAS, la cual es frecuentemente alta en los carcinomas de mama de tipo basal y la expresión de Bcl-xL cuya expresión está asociada con resistencia al tratamiento en el mismo cáncer, esta correlación fue consistente con los estudios realizados, los cuales proporcionaron evidencia de un proceso autoamplificador en el que la actividad de RAS conduce a la inducción de Bcl-xL que a su vez regula los niveles de RAS y la señalización (Trécesson *et al.*, 2017).

También se determinó en este estudio que Bcl-xL y RAS están implicados en la inducción de plasticidad fenotípica y autorenovación por activación de RAS que no será automática, pero ayudará cuando la señalización es óptima gracias a la participación de reguladores como Bcl-xL; se ha descrito su sobreexpresión en subconjuntos de células de cáncer de mama, dotadas con propiedades de células madre. Se sugiere que Bcl-xL juega un rol crítico en la viabilidad de algunas células embrionarias o células madre malignas y que puede tener un rol activo en la biología de la célula iniciadora de cáncer a través de su habilidad para modular la actividad de RAS. Bcl-xL tiene una potente actividad antiapoptótica, su sobreexpresión se correlaciona con quimiorresistencia en líneas celulares de cáncer y en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Trécesson *et al.*, 2017).

En un estudio realizado para determinar el efecto de la expresión de Bcl-xL y la sensibilidad en las células tumorales al tratamiento con paclitaxel, agente quimioterapéutico usado en el tratamiento de tumores sólidos, particularmente de mama, ovario y pulmón y que actúa alterando la dinámica de los microtúbulos, se determinó que el tratamiento con paclitaxel puede modular la actividad de c-Myc para que esta induzca la transcripción de dos miRNAs; miR-203b-3p y miR-203a-3p los cuales a su vez regulan la activación de Bcl-xL. En tumores de mama la alta expresión de miR-203b-3p y MYC se asoció con mejor respuesta a la terapia y supervivencia de la paciente, la expresión de MYC se correlaciona negativamente con la de Bcl-xL pero positiva con miRNAs ya que se promueve la muerte celular (Aakko *et al.*, 2019).

III. JUSTIFICACION

La edad al momento del diagnóstico de cáncer de mama es un factor que impacta significativamente en el pronóstico de la enfermedad. En mujeres jóvenes predomina menor diferenciación celular y mayor frecuencia de tumores con mayor tamaño e invasión a ganglios linfáticos (Salinas-Martínez *et al.*, 2014). La clasificación morfológica junto con la caracterización molecular (receptores de estrógenos ER, progesterona RP y del factor de crecimiento epidérmico HER-2) revolucionaron el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, a pesar de tener resultados muy favorables con esta estrategia de tratamiento, se presentan casos en los que la respuesta al tratamiento y evolución clínica es contradictoria a la esperada en relación a su caracterización molecular y el cáncer de mama progresa hasta que finalmente la paciente fallece.

Lo anterior muestra que el cáncer de mama es una patología de alta complejidad, en el que a pesar de ser importante la caracterización histológica y molecular para seleccionar el tratamiento, es importante explorar la expresión de otros genes y sus rutas de activación para tener mayor conocimiento de posibles blancos terapéuticos.

Existen evidencias, en algunos subtipos del cáncer de mama, de que la expresión alterada de algunas moléculas como las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT3) y la proteína que confiere resistencia a la apoptosis Bcl-xL, participan activamente en el potencial metastásico del cáncer de mama y en la resistencia al tratamiento quimioterapéutico y biológico; sin embargo, existen pocos estudios en relación a estas proteínas y por lo tanto aún no se consideran dentro de los marcadores que deben formar parte de la evaluación de las pacientes con cáncer de mama.

La determinación de estas moléculas y su asociación con el subtipo molecular de cáncer de mama y el estadio clínico tendrá trascendencia; ya que si se comprueba su expresión en el tejido afectado, esto ayudará a evaluar mejor a las pacientes y a entender parte de la biología de la enfermedad, así como algunos de los mecanismos de proliferación y apoptosis. Asimismo, la información derivada de este estudio, auxiliará a los médicos para adecuar mejor el tratamiento, ya que pSTAT3 y Bcl-xL podrán ser utilizadas como factores pronósticos y como posibles blancos terapéuticos y así se tendrá mayor probabilidad de curar a las pacientes con cáncer de mama beneficiándolas directamente.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La expresión de la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (STAT3) y la proteína de resistencia a la apoptosis Bcl-xL, en el tejido con cáncer de mama, tienen relación con el tipo histológico, subtipo molecular y el estadio clínico del tumor?

IV. HIPOTESIS

La sobreexpresión de pSTAT3 nuclear y Bcl-xL en cáncer de mama se asocia con el tipo histológico y molecular más indiferenciado y con estadio clínico avanzado y, por lo tanto, con mal pronóstico.

V. OBJETIVO GENERAL

Asociar el tipo histológico, molecular y estadio clínico con la expresión de las proteínas pSTAT3 nuclear y Bcl-xL en cáncer de mama.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las muestras histológicas con cáncer de mama de los últimos 3 años que cuenten con estudio inmunohistoquímico de receptores de estrógenos, progesterona y HER2.
2. Clasificar los casos de cáncer de mama por tipo histológico, molecular y estadio clínico TNM.
3. Analizar la expresión de pSTAT3 nuclear y Bcl-xL.
4. Correlaciona la expresión de pSTAT3 nuclear y Bcl-xL con el tipo histológico, molecular, estadio clínico (TNM) y evolución clínica de las pacientes.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio ambispectivo, descriptivo, transversal y observacional realizado en los departamentos de Anatomía Patológica del Hospital General “Dr. Miguel Silva” y Hospital General Regional No.1 del IMSS, así como en el Centro Estatal de Atención Oncológica. Se revisaron los casos con diagnóstico de cáncer de mama que tuvieron resultados de inmunohistoquímica para receptores de estrógeno, progesterona, HER2 y Ki67, tejido incluido en bloque de parafina y expediente clínico completo, en el periodo comprendido de enero de 2015 a diciembre de 2017.

Las variables analizadas fueron: expresión de los receptores de estrógeno, progesterona, HER2 y Ki67, los subtipos moleculares, la supervivencia libre de enfermedad y la respuesta al tratamiento, así como la expresión de las proteínas fosfoSTAT3 y Bcl-xL.

7.1. Clasificación molecular de cáncer de mama

Los subtipos moleculares de cáncer de mama se clasificaron de acuerdo al Consenso de St. Gallen (Harbeck et al., 2013) y Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario (Cárdenas-Sánchez et al., 2017), que toma en consideración el resultado del estudio de inmunohistoquímica para los receptores de estrógenos, progesterona, HER2 y Ki67. Conforme al porcentaje de expresión de estos marcadores se clasifican en Luminal A y B, con sobreexpresión de HER2 y fenotipo basal. (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación molecular del cáncer de mama.

Subtipo	RE	RP	HER2	Ki67
BASAL	Neg	Neg	Neg	Alta expresión
HER2	Neg	Neg	Pos	
LUMINAL A	Pos	Pos > 20%	Neg	Menor de 20%
LUMINAL B- HER2 (-)	Pos	Pos < 20%	Neg	Mayor de 20%
LUMINAL B- HER2 (+)	Pos	Pos o Neg	Pos	Cualquier %

Tomado y adaptado de Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2017 y Uribe *et al.*, 2010

7.2. Estadificación clínica de las pacientes con cáncer de mama

El estadio clínico se determinó con base al sistema TNM (Tabla 1), que toma en consideración el tamaño tumoral, la afectación ganglionar y la presencia o ausencia de metástasis. La información del TNM de las pacientes se obtuvo del expediente clínico.

7.3 Construcción del microarreglo de tejidos (MAT).

Se concentraron los bloques de tejido de las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, a los que se les denominó bloque donador, se revisaron al microscopio las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina correspondientes a cada caso, se identificaron y marcaron 3 zonas con tejido tumoral y 1 con tejido adyacente al tumor, es decir no maligno. Luego, se diseñó un mapa que contenía el número de registro de cada caso y el número consecutivo correspondiente y por triplicado, así como los tejidos adyacentes al tumor. De esta manera se establecieron las coordenadas de cada caso en el microarreglo de tejido (Figura 6).

En seguida, se preparó el equipo Chemicon Advanced Tissue Arrayer (ATA-100) semiautomático (Biomedical Imaging Facility BMIF, Sídney Australia), colocando la laminilla previamente marcada en el microscopio del microarreglador, su respectivo bloque donador y un bloque receptor de parafina virgen, en las áreas correspondientes del equipo, que los posiciona en forma paralela. Se identificó el área marcada de la laminilla, lo que, al movimiento de la platina el bloque donador se movió paralelamente al de la laminilla, lo que permitió colocarlo al centro de una aguja de alta precisión de 1mm de diámetro. Luego, se puncionó el bloque donador para obtener la muestra y simultáneamente otra aguja del mismo calibre puncionó el bloque receptor. Se movió la aguja con la muestra del bloque donador y se descargó en el agujero del bloque receptor. De esta manera, se fueron colocando las muestras en el microarreglo con base en la Figura 6.

Al concluir la colocación de los cilindros de tejido en el bloque receptor, el bloque fue calentado a 40°C durante 10 min para que se fundieran con la parafina de este bloque (Figura 7). Se elaboraron 11 TMAs con los 310 bloques de parafina con tejido incluido con cáncer de mama, se hicieron tres spots por cada caso con tejido neoplásico y se incluyeron en 92 spots con tejido no neoplásico adyacente al tumor como controles (Figura 3).

Finalmente se realizaron cortes histológicos de 4µm de espesor con un micrótomo estándar, se colocaron en laminillas electrocargadas y se procedió a realizar la inmunohistoquímica con anticuerpos anti Bcl-xL y anti pSTAT3.

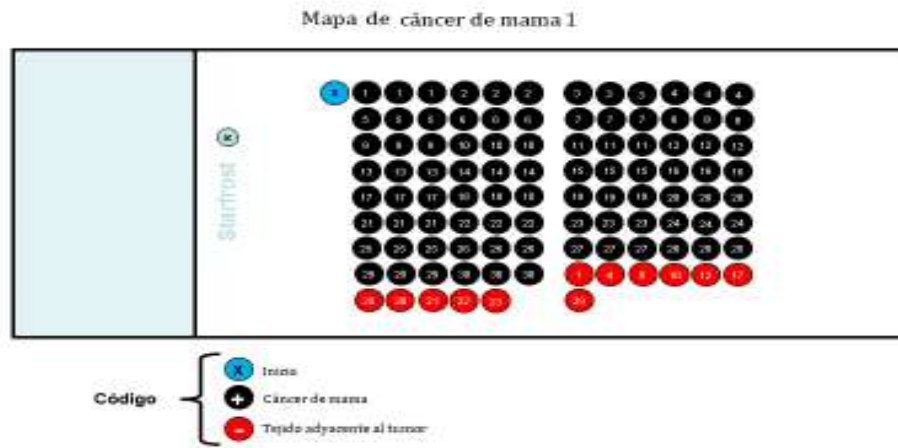


Figura 6. Mapa de microarreglo de tejidos. El círculo en azul marcado con la equis, indica la orientación de la laminilla (spot de inicio). Los círculos en negro marcados con un número consecutivo y por triplicado indican los casos de cáncer de mama. Los círculos en rojo y el número indican el caso del cáncer de mama, pero representa tejido adyacente al tumor.



Figura 7. Microarreglado terminado

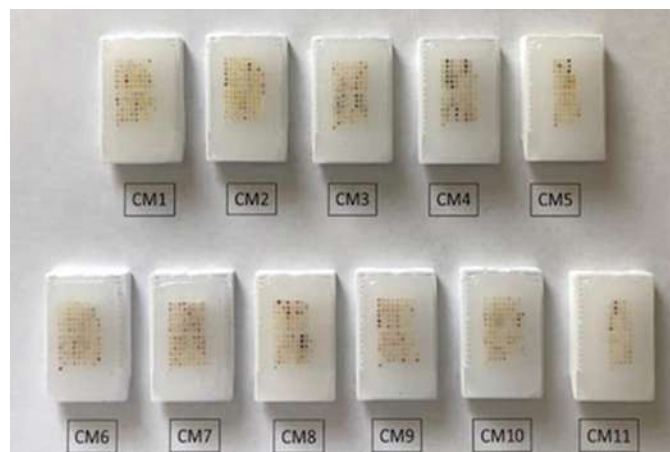


Figura 8. Microarreglos elaborados con los casos de cáncer de mama (CM)

7.4 Inmunohistoquímica para la detección de Fosfo-STAT3 y Bcl-xL.

Los cortes histológicos de los microarreglos, se desparafinaron a 60°C durante 15 min dentro de un horno, luego se hidrataron los tejidos colocando las laminillas en xilol durante 8 min por dos ocasiones, etanol-xilol 5 min, etanol al 100% 3 min por dos ocasiones, etanol al 90% 3 min, etanol al 70% 3 min y agua destilada 3 min.

Luego, se hizo la recuperación antigénica, colocando las laminillas en solución amortiguadora de citrato de sodio 0.01M pH 6.0, e incubando a 121°C durante 20 min. Se dejaron enfriar y se lavaron con PBS tres veces durante 3 min en agitación suave para eliminar el exceso de citrato. Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena con solución de metanol y H₂O₂ al 3% durante 5 min en agitación; este procedimiento se realizó 2 veces. Se hizo un lavado con agua en agitación por 3 min y posteriormente un lavado con PBS durante 3 min en agitación. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a las células, las laminillas se incubaron en suero normal de cerdo al 2% durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda, se retiró el suero normal de cerdo y se hizo un lavado con PBS en agitación por 3 min. Las laminillas se incubaron con cada uno de los anticuerpos primarios siguientes: anticuerpo monoclonal de conejo anti Bcl-xL humano (54H6, Cell Signalling Technology, Danvers, MA. USA) a una dilución de 1:1000, anticuerpo monoclonal de conejo anti pSTAT3 humano (Tyr 705, D3A7, Cell Signalling Technology, Danvers, MA. USA) a una dilución de 1:250. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron con PBS 5 veces durante 3 min en agitación suave y se incubaron con el segundo anticuerpo anti-conejo biotilado durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después se hicieron lavados con PBS 3 veces durante 3 min en agitación. El revelado con Diamino-Bencidina (DAB) (Vector, Burlingame, California USA) se hizo bajo control microscópico, se preparó la solución reveladora adicionando 1µl de cromógeno por cada 300µl de buffer y se colocó una gota con ayuda de una pipeta en la muestra cubriendo perfectamente el tejido, para detener la reacción al momento de observar la inmunotinción, las laminillas se lavaron con agua corriente. Finalmente, las laminillas se contrastaron con hematoxilina de Harris durante 3 segundos, se lavó con agua corriente para eliminar el excedente y se sometieron al proceso de deshidratación y montaje con una gota de resina Entellan (Merck, Kenilworth, N.J., USA) sobre la muestra, se colocó un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Como controles negativos se emplearon los mismos cortes, pero sin agregar el anticuerpo primario y como control positivo se utilizaron cortes de carcinoma de pulmón.

7.5 Evaluación de la tinción inmunohistoquímica.

Todas las muestras (los 11 microarreglos) se procesaron bajo las mismas condiciones y se evaluaron mediante el software Aperio CS2 ImageScope (Leica biosystems, Buffalo Grove, IL. USA). Se evaluó la expresión nuclear de la tinción de pSTAT3 y Bcl-xL en las células

neoplásicas. El software determinó porcentaje e intensidad de las células neoplásicas positivas. Los núcleos se graduaron dependiendo de la intensidad de la reacción de la siguiente manera:

Grado 0: negativo: cuando la tinción no se distinguió del fondo

Grado 1: las células malignas presentaron una tinción débil

Grado 2: las células malignas tuvieron una tinción moderada

Grado 3: las células malignas tuvieron una tinción fuerte.

Los grados 1-3 de expresión de la tinción en el núcleo, en más del 5% de las células malignas se interpretó como positivo.

Para el análisis de la expresión total de Bcl-xL se tomó en cuenta la expresión moderada e intensa en las células neoplásicas y el total se dividió entre el área tumoral previamente marcada y analizada por el software.

7.6 Consideraciones éticas.

El estudio fue aprobado por el Comité de ética en Investigación y el Comité de investigación del Hospital General “Dr. Miguel Silva” con números de registro 16-CEI-004-20161212 y 17-CI-16053153, por el comité local de investigación del IMSS, con número de registro R-2018-1602-019 por el Comité de Investigación y Ética en investigación de la Facultad de Ciencias médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la UMSNH con número de registro 003/P/5/2019.

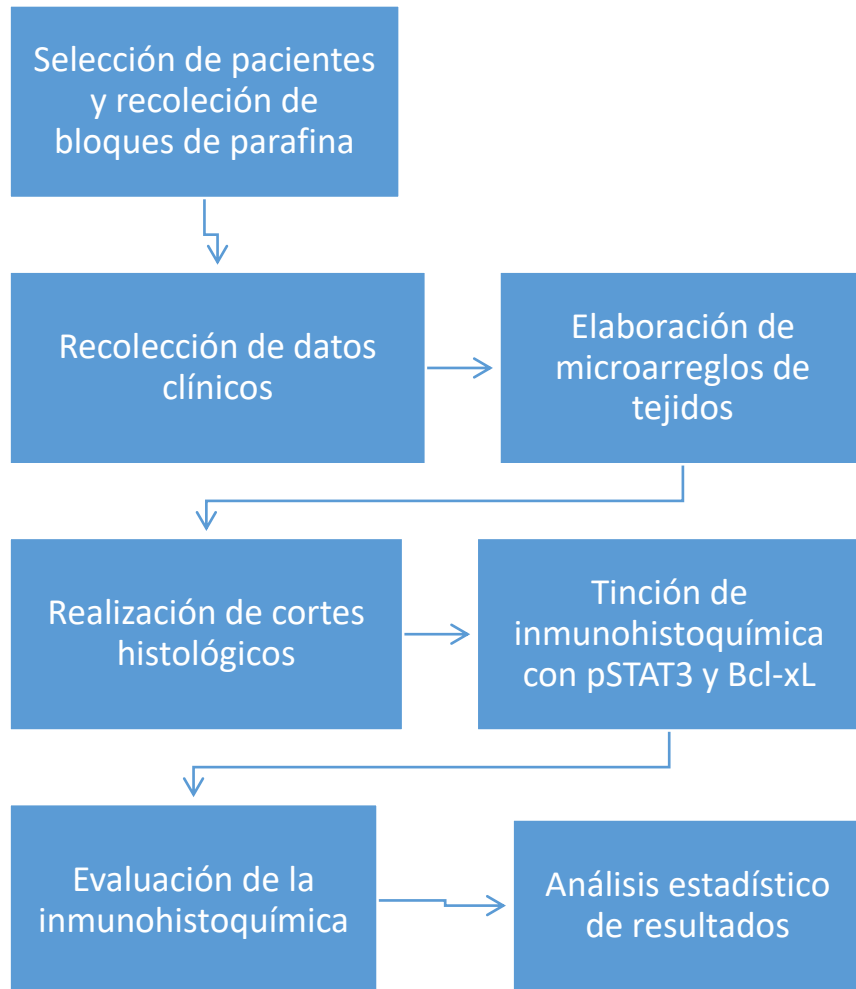
La presente investigación contempló el uso de bases de datos, expedientes clínicos y bloques de biopsias de las pacientes del Hospital General Regional No.1 del IMSS y del Hospital General Dr. Miguel Silva, sin requerir la intervención de individuos en el estudio, por lo que fue considerado de riesgo mínimo, según lo estipulado en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (1984). Por tal motivo y, con base en el artículo 23 del reglamento antes mencionado, no fue necesario el otorgamiento del consentimiento informado por parte de las pacientes incluidas en este estudio, aclarando que siempre se respetó el anonimato y no fueron revelados los nombres de las pacientes.

7.7 Análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva obteniendo las medidas de tendencia central media, desviación estándar y frecuencias. La expresión de las proteínas pSTAT3 y Bcl-xL entre los diferentes tipos histológicos y moleculares de cáncer de mama y el estadio clínico se analizaron mediante χ^2 . Estimación de Riesgo Relativo entre pSTAT3, estadio clínico (TNM) y subtipo molecular. La expresión total de Bcl-xL (variable cuantitativa) entre los diferentes tipos histológicos, moleculares y estadio clínico se analizaron mediante Kruskal-Wallis. Para el análisis de supervivencia se utilizó la prueba de Kaplan y Meier (Log-rank). El análisis se

realizó mediante el paquete estadístico SPSS. La diferencia entre dos poblaciones se consideró como significativa cuando los intervalos fueron $>95\%$ ($p < 0.05\%$).

DISEÑO EXPERIMENTAL



VIII. RESULTADOS

1. Objetivo. Identificar las muestras histológicas con cáncer de mama de los últimos 3 años que tuvieron estudio inmunohistoquímico de receptores de estrógenos, progesterona y HER2.

Se detectaron 1850 casos con diagnóstico de cáncer de mama de los departamentos de Anatomía Patológica del Hospital General “Dr. Miguel Silva”, Centro estatal de atención Oncológica y del Hospital General Regional No. 1 del IMSS de los cuales se excluyeron 1538 por no contar con bloque de parafina o material suficiente en el bloque, resultado de inmunohistoquímica o expediente clínico. Finalmente, se integraron los especímenes de tejido incluidos en parafina de 310 pacientes; el promedio de edad al momento del diagnóstico fue de 54.17 ± 12.11 años, la mediana de 53 años y la moda de 49 años, la edad mínima fue de 25 años y la máxima de 89 años; los grupos de edad más afectados fueron de 45-49 años con 17.7% de los casos y de 50-54 años con 15.5% (Figura 9).

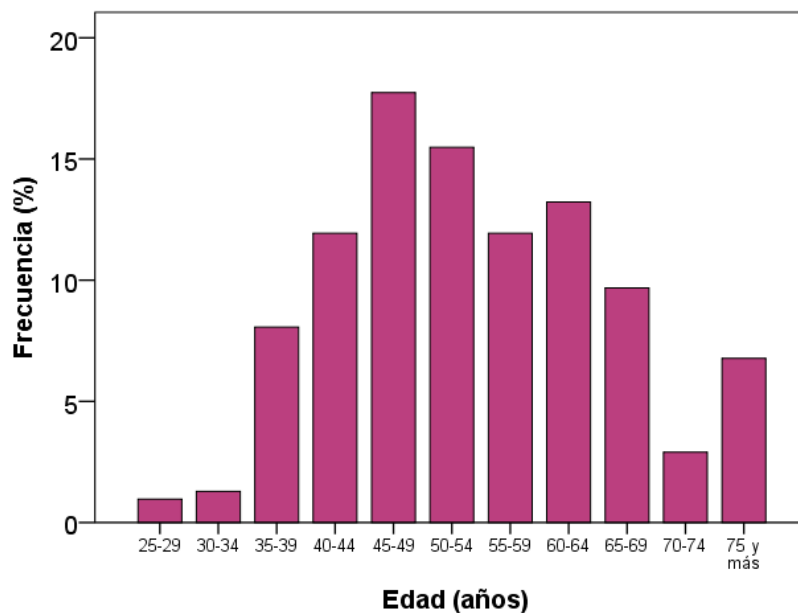


Figura 9. Distribución del cáncer de mama por grupos de edad.

Características generales de los casos de cáncer de mama

1a) Distribución topográfica.

La mama izquierda fue la más afectada con 171 casos (55.3%) en comparación con la mama derecha con 137 casos (44.3%), en un caso ambas mamas estuvieron afectadas, el cuadrante superior externo fue el más afectado en 190 casos (65.1%).

1b) Análisis del grado histológico.

Sesenta y dos casos (20.7%) fueron grado I, 166 (55.3%) grado 2 y 72 (24%) grado 3 (Figura 10).

1c) Análisis del perfil inmunohistoquímico.

El 66.9% de los casos fueron positivos a receptor de estrógeno, 56.9% positivos a receptor de progesterona, 17.4% sobreexpresaron HER2 y 69.4% de los casos expresaron Ki67.

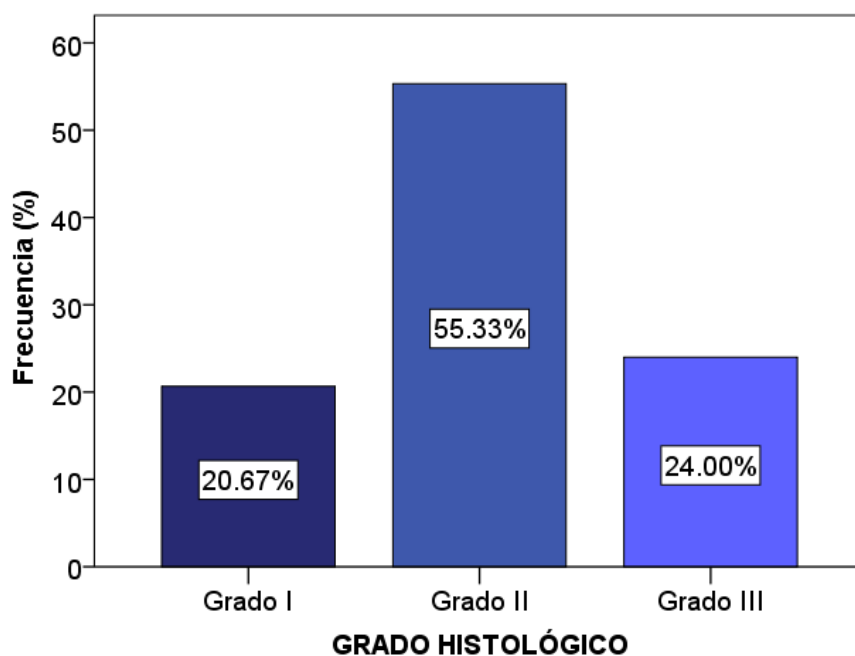


Figura 10. Distribución del cáncer de mama de acuerdo al grado histológico. El carcinoma bien diferenciado corresponde al grado I, el moderadamente diferenciado al grado II y el poco diferenciado al grado III. (Escala de Scarff-Bloom-Richardson; Cárdenas-Sánchez et al., 2017).

1d) Análisis de los factores de riesgo.

La menarca temprana (antes de los 12 años) se presentó en 20.1% de los casos (Figura 11). El primer embarazo se presentó en 7.2% (12 casos) después de los 30 años y el 24.6% de los casos fueron nulíparas (Figura 12). El 37.4% de las pacientes aún se encontraban en periodo

reproductivo (menstruantes) al momento del diagnóstico y el 62.6% estaban en periodo de menopausia.

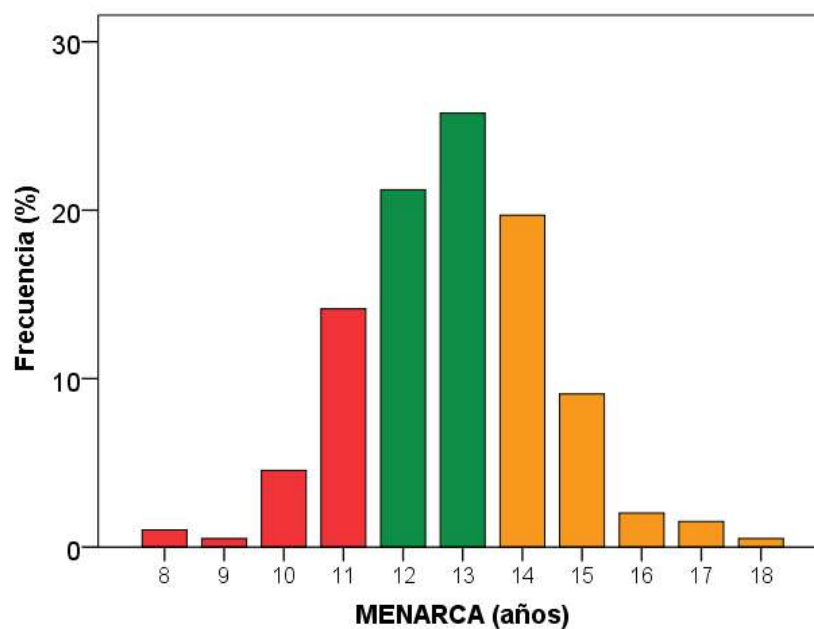


Figura 11. Distribución por edad de la primera menstruación. Las barras en rojo muestran la edad de la menarca con mayor riesgo para el cáncer de mama. (Media 12.82 ± 1.61)

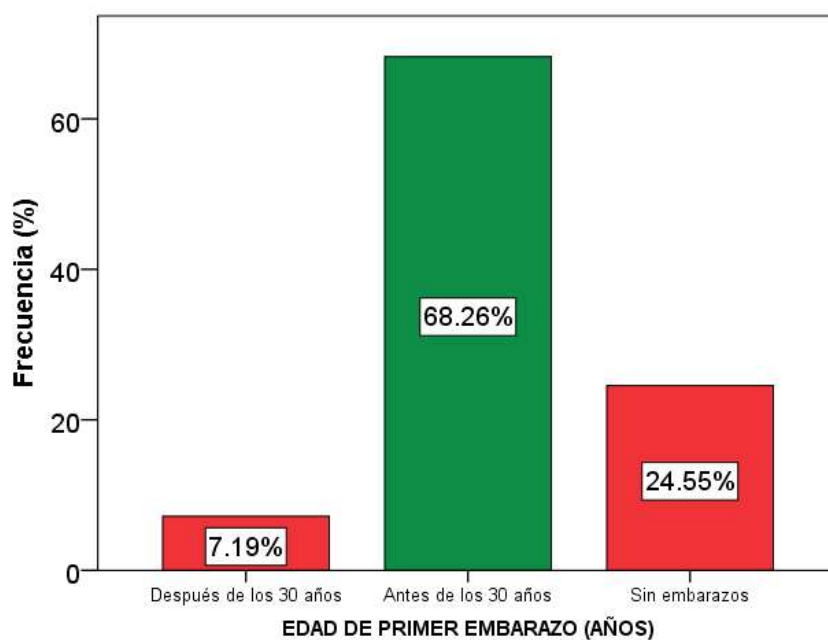


Figura 12. Distribución por edad del primer embarazo. En rojo casos con mayor riesgo.

1e) índice de masa corporal (IMC).

El índice de masa corporal se clasificó de acuerdo a las recomendaciones de la OMS (2016) y se distribuyó en 35.9% de las pacientes con sobrepeso, 22% obesidad (grado I 14.48%, grado II 4.14% y grado III 3.45%); 33.8% con peso normal y 8.3% tuvieron bajo peso al momento del diagnóstico (Figura 13). La media del IMC fue de 29.14 ± 5.52 , el peso promedio de las pacientes fue de $69.88\text{Kg} \pm 13.34$, y la media de la talla 1.54 ± 0.06 .

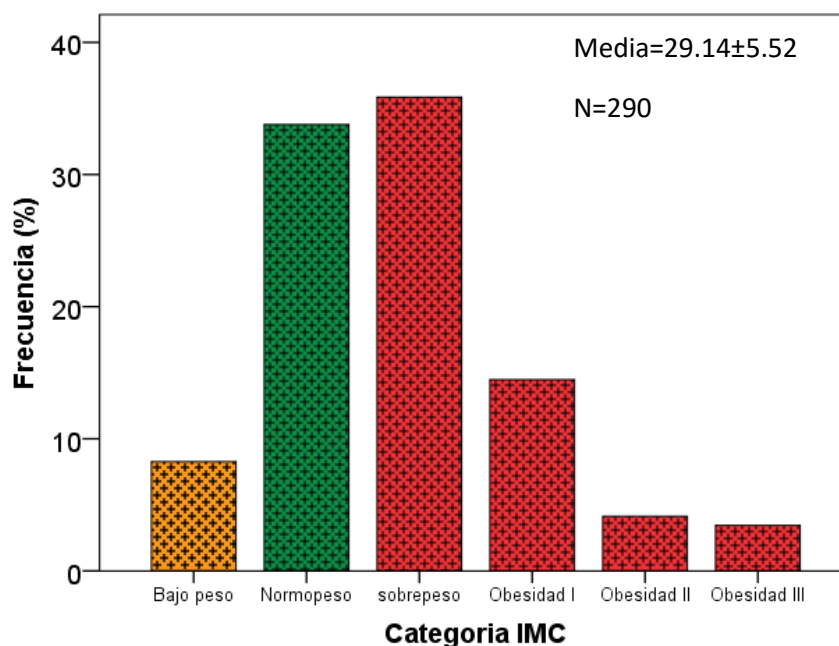


Figura 13. Distribución de acuerdo al índice de masa corporal: bajo peso <18.5 , normo peso $18.5-24.9$, sobrepeso >25 , obesidad >30 , obesidad I $30-34.9$, obesidad II $35-39.9$ y obesidad III >40 (Clasificación de la OMS). En rojo los casos con mayor riesgo.

1f) Evaluación mastográfica.

El método diagnóstico presuntivo inicial fue la mastografía, el 2.3% presentó Birads 0, 0.4% Birads 1, 0.4% Birads 2, 7.6% Birads 3, el 36.6% tuvo Birads 4 y el 52.7% con Birads 5.

1g) Análisis del tratamiento médico.

En cuanto al tipo de tratamiento recibido por cada paciente, 293 pacientes recibieron tratamiento quirúrgico (95.4%) además recibieron quimioterapia en sus modalidades, neoadyuvancia, adyuvancia, hormonoterapia y terapia blanco. El 77.8% de las pacientes

recibieron radioterapia. En la Tabla 3 se ilustra la distribución de los diferentes tipos de tratamiento que recibieron las pacientes.

Tabla 3. Tipos de tratamiento que recibieron las pacientes con cáncer de mama

TIPO DE TRATAMIENTO	FRECUENCIA (n/%)
Mastectomía Radical	234/76.0
Cirugía conservadora	59/19.2
Neoadyuvancia	104/33.9
Adyuvancia	174/56.7
Hormonoterapia	208/67.8
Terapia Blanco	48/15.6
Radioterapia	238/77.8

n: cantidad de casos

1h) Estudio de la respuesta al tratamiento con neoadyuvancia.

Se evaluó la respuesta al tratamiento neoadyuvante mediante análisis histopatológico en las piezas quirúrgicas (mamas) aplicando la clasificación de Chevallier (cárdenas-Sánchez et al., 2011), encontrando que 13.8% tuvieron respuesta completa al tratamiento con ausencia de tumor (Chevallier 1), 1.5% con persistencia del carcinoma *in situ* (Chevallier 2), 55.4% con respuesta mínima al tratamiento ya que persiste el carcinoma invasor (Chevallier 3) y 29.2% tuvieron respuesta nula al tratamiento (Chevallier 4, Figura 14).

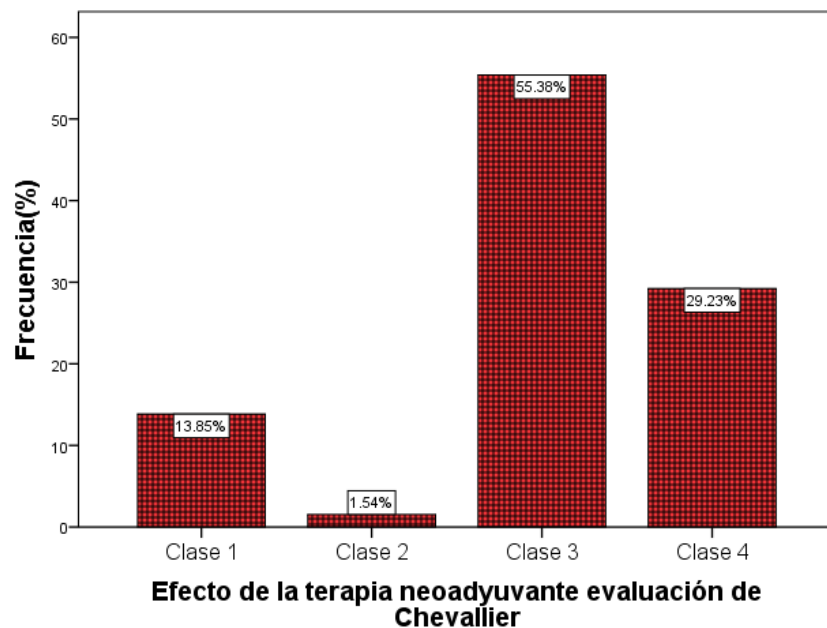


Figura 14. Distribución de la respuesta a la terapia neoadyuvante (Evaluación de Chevallier). El 15.4% de las pacientes respondieron total o parcialmente al tratamiento (Clases 1 y 2), el 84.6% de las pacientes no respondieron de forma completa al tratamiento (clases 3 y 4).

1i) Evolución clínica.

El 75.7% se encontró libre de enfermedad, 17.80% presentaron recaída, 1.29% murieron y 5.18% abandonaron el tratamiento. La media de meses de evolución de las pacientes fue 31.27 ± 13.5 con un mínimo de 1 mes y un máximo de 62 meses.

2. Objetivo. Clasificar los casos de cáncer de mama por tipo histológico, molecular y estadio clínico TNM

2a) Distribución de casos por tipo histológico

El tipo histológico predominante fue el carcinoma ductal infiltrante sin tipo específico con 267 casos (87.5%), seguido del carcinoma lobulillar 11 casos (3.6%) y otras variantes histológicas medular, metaplásico, neuroendócrino, mucinoso, papilar, entre otros, 27 casos 8.8%, (Figura 15).

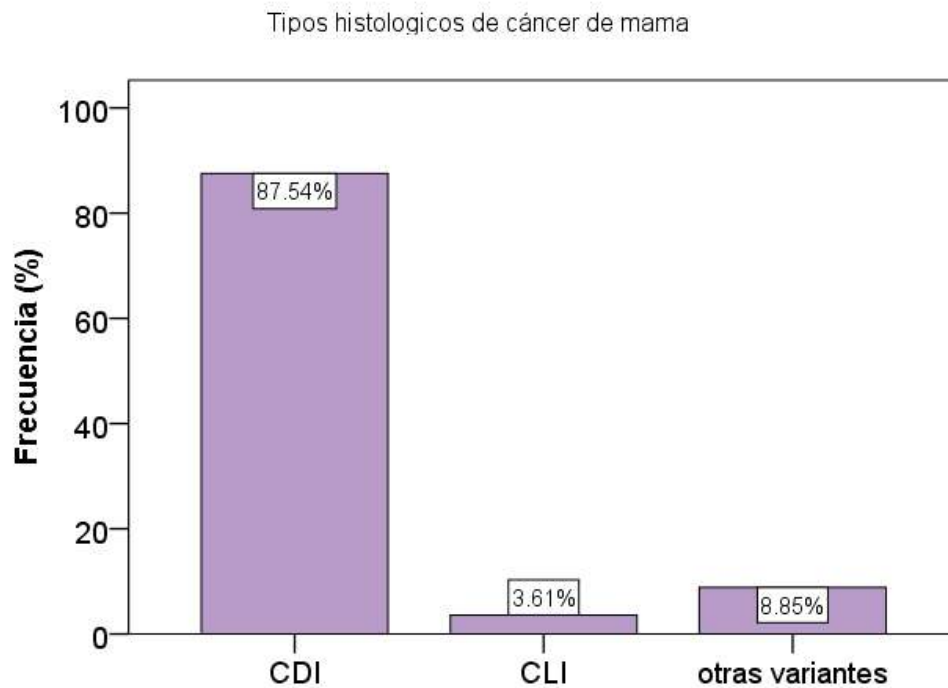


Figura 15. Distribución del cáncer de mama por patrón histológico. CDI carcinoma ductal infiltrante sin patrón específico, CLI carcinoma lobulillar infiltrante.

2b) Análisis molecular

Los tumores con receptores hormonales fueron los más frecuentes (70.2%), seguidos de los triples negativos con 62 casos (20.1%) y por último con sobreexpresión de HER2 con 30 casos (9.7%). Al estratificar los casos de acuerdo al perfil de expresión molecular, se distribuyeron como se observa en la Figura 16.

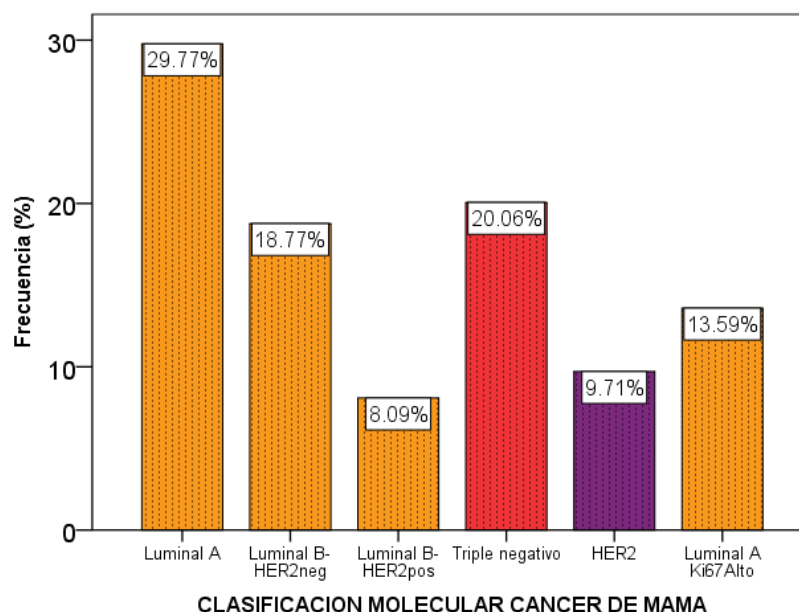


Figura 16. Clasificación molecular de acuerdo con el Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama (Cárdenas-Sánchez et al., 2017). Se observan los 5 subtipos moleculares en los cuales se clasifica el cáncer de mama. Todos los tumores con expresión de receptores hormonales se etiquetaron con las barras amarillas, los tumores triple negativos (barra roja) y los casos con sobreexpresión de HER2 (barra lila). El grupo adicional denominado Luminal A con Ki67 alto, no reúne las características descritas en el Consenso mexicano 2017.

2c) Distribución por estadio clínico TNM

En relación al tamaño tumoral (T) el 20.1% presentaron tumores menores de 2cm (T1), 51.5% tumores de 2cm a 5cm (T2), 12.6% con tumores mayores a 5cm (T3) y 15.5% con tumores de cualquier dimensión, pero con extensión a piel o pared torácica (T4), solo 1 caso (0.3%) correspondió a tumor no palpable (T0), la media del tamaño tumoral fue de 4.01 ± 3.06 . 145 pacientes (46.9%) fueron negativos (N0) 32.4% tuvieron afectación del ganglio linfático axilar homolateral (N1), 19.1% afectación de ganglios linfáticos unidos entre sí o a otras estructuras (N2) y 1.6% afectación de ganglios linfáticos mamarios internos (N3). Al momento del diagnóstico solamente 6 casos (1.9%) presentaron metástasis a distancia en hueso, cerebro y pulmón principalmente.

Al estratificar los casos en estadio clínico, 53 pacientes (17.2%) se encontraron en estadio I, 88 (28.5%) en estadio IIA, 65 (21%) estadio IIB, 50 (16.2%) estadio IIIA, 43 (13.9%) estadio IIIB, 4 (1.3%) estadio IIIC y 6 (1.9%) estadio IV (Figura 17).

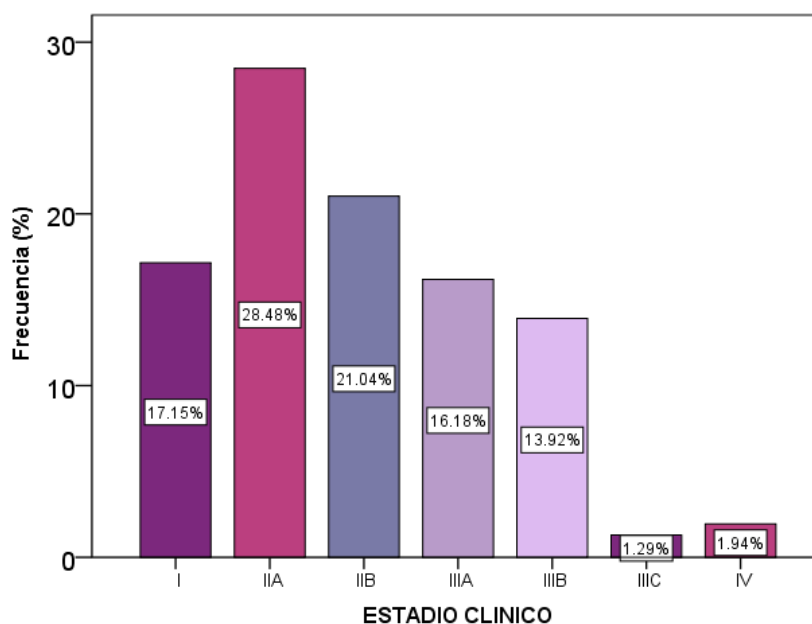


Figura 17. Distribución de casos de cáncer de mama por estadio clínico. El 45.7% de los casos se encontraron en estadios no-avanzados (estadios I y IIA) y 54.3% se presentaron en estadios localmente avanzados (estadios del IIB al IV).

3. Objetivo. Analizar la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL

Se determinó la expresión nuclear de pSTAT3 y las expresiones totales y nuclear de Bcl-xL mediante tinción inmunohistoquímica. La expresión nuclear de pSTAT3 se encontró en 219 casos (78.2%) y 61 casos (21.8%) fueron negativos (Figura 18 a y b). Mientras tanto la expresión nuclear de Bcl-xL se presentó en 201 casos (72%) y en 78 casos (28%) fueron negativos. La expresión total de Bcl-xL presentó una media de 34.41 ± 31.36 píxeles/ μ^2 , con expresión mínima de $0.27/\mu^2$ y máxima de $165.77/\mu^2$ (Figura 18 c y d).

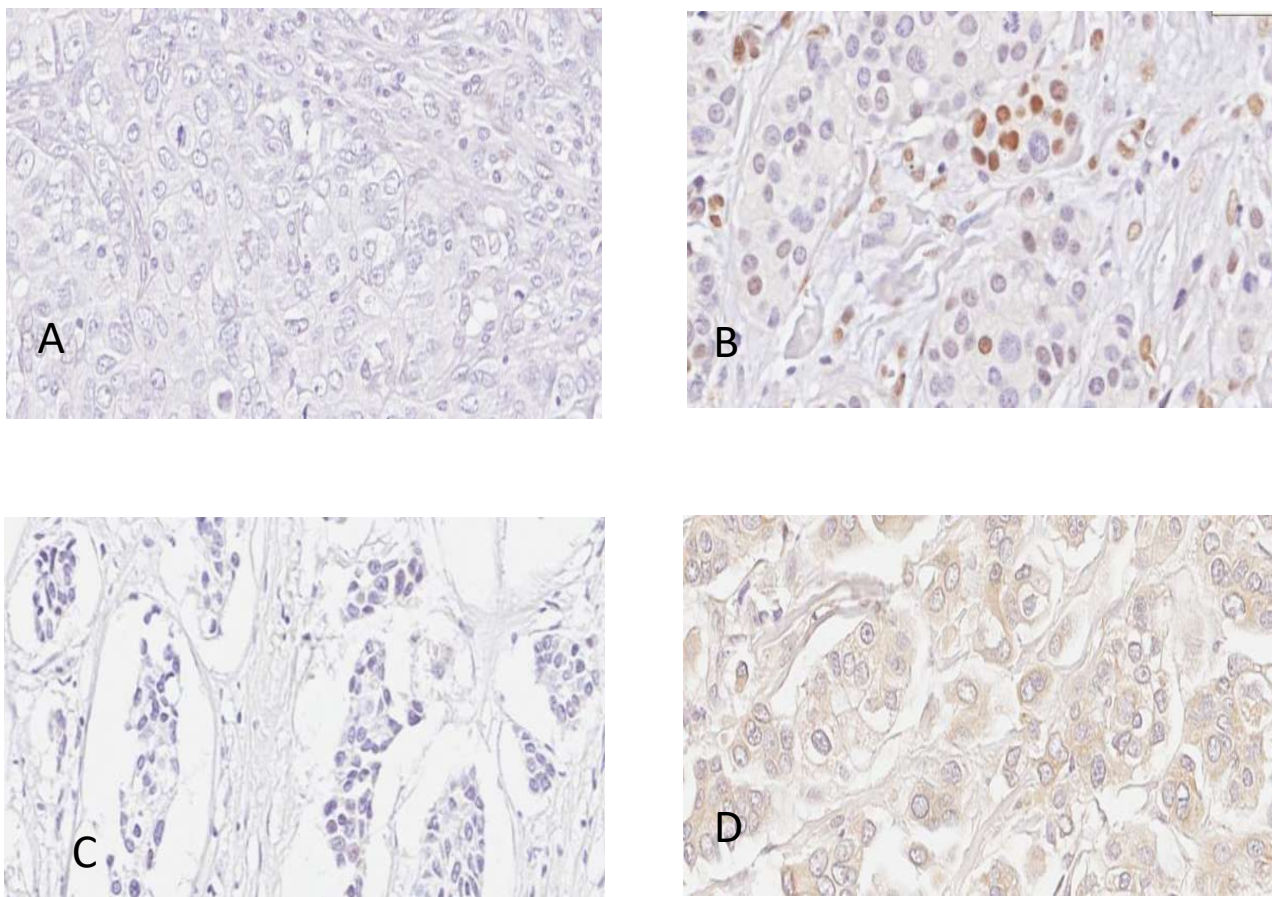


Figura 18. Inmunohistoquímica representativa para pSTAT3 y Bcl-xL en casos de carcinoma ductal invasor de mama. En (A) caso negativo y (B) caso positivo de STAT3 nuclear. En (C) caso negativo y (D) caso positivo de Bcl-xL citoplasmático. El color marrón en B y d indica expresión de la proteína

4. Objetivo. Correlacionar la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el tipo histológico, molecular, estadio clínico y evolución clínica de las pacientes.

4a) Asociación de la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el tipo histológico.

Al analizar la expresión nuclear de pSTAT3 en relación al tipo histológico, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 = 21.85$, $P = 0.001$, Tabla 4). Mientras que al determinar la expresión nuclear de Bcl-xL respecto al tipo histológico no hubo diferencias estadísticamente significativas, pero si se observó una tendencia ($\chi^2 = 12.051$, $P = 0.06$, Tabla 4). Por otro lado, al analizar la expresión total (citoplasmática y nuclear) de Bcl-xL en relación al tipo histológico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.20$).

Tabla 4. Distribución de la expresión nuclear de las proteínas pSTAT3 y Bcl-xL en relación al tipo histológico.

	Carcinoma ductal (%)	Carcinoma lobulillar (%)	Otros (%)	Valor de P
pSTAT3 nuclear (n=277)	71.5	2.2	4.3	0.001 ^b
Bcl-xL nuclear (n=276)	64.5	2.9	4.3	0.06

n: cantidad de casos, valor de *P* mediante χ^2 .

4b) Asociación de la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el subtipo molecular.

Al determinar la relación entre la expresión de pSTAT3 con los subtipos moleculares, la expresión fue muy parecida en todos los grupos, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=4.184$, $P=0.52$, Tabla 5 y Figura 19). Así mismo, al analizar las expresiones nuclear y total (citoplasmática y nuclear) de Bcl-xL respecto al subtipo molecular, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=8.24$, $P=0.14$ y $P=0.70$, respectivamente. Tabla 5 y figura 19).

Tabla 5. Distribución del subtipo molecular de cáncer de mama con relación a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-XL

	Luminal A	Luminal B HER2neg	Luminal B-HER2pos	Triple negativo	HER2	Luminal A Ki67	Valor de P
pSTAT3 nuclear (n=279)	22.2 ^a	15.8	6.8	15.0	6.8	11.5	0.52 ^b
Bcl-xL nuclear (n= 278)	21.5	15.8	5.8	11.8	6.1	10.7	0.14

n: cantidad de casos, a: porcentaje de casos, b: valor de *P* mediante χ^2

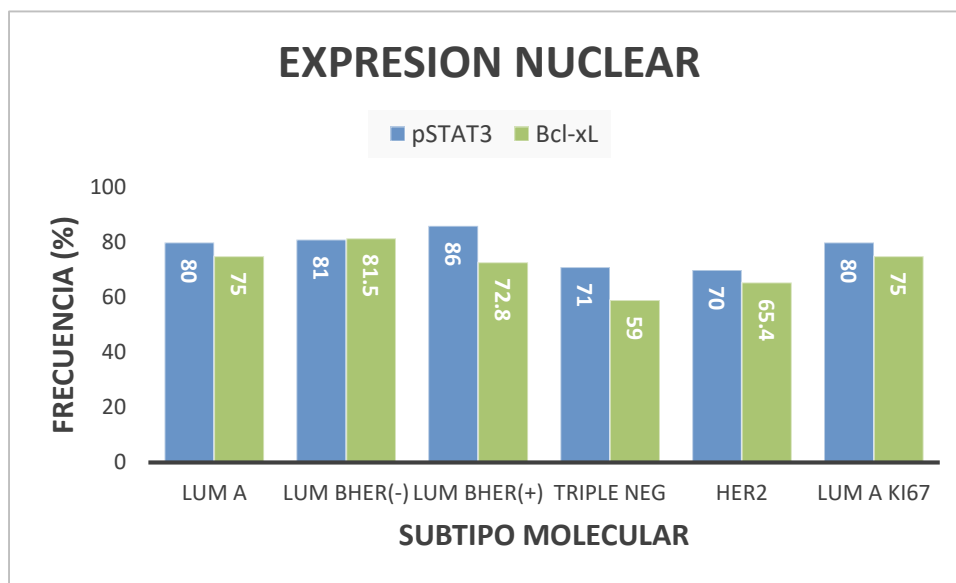


Figura 19. Distribución del subtipo molecular respecto a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-xL.

4c) Asociación de la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL con el estadio clínico

Al estudiar la expresión nuclear de pSTAT3 en relación al estadio clínico, se encontró una asociación estadísticamente significativa ($\chi^2=13.908$, $P=0.03$, Tabla 6 y Figura 20). Luego se hizo el análisis estadístico de estimación de riesgo relativo (RR) entre pSTAT3 y el estadio clínico, encontrándose de forma interesante factor protector de pSTAT3 entre los estadios IIA y IIB para el avance de la enfermedad (RR=0.68; IC 95%=0.517-0.893; $P=0.014$, Tabla 7), mientras que entre los estadios IIA y IIIA, se observó un RR de 2.6 veces para el avance de la enfermedad (RR=2.69; IC 95%=1.16-6.21; $P=0.006$, Tabla 7). Por su parte, al analizar la expresión nuclear de Bcl-xL con el estadio clínico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=4.847$; $P=0.56$, Tabla 6 y Figura 20), ni tampoco entre la expresión total (nuclear y citoplasmática) de Bcl-xL respecto al estadio clínico ($P=0.15$)

Tabla 6. Distribución del estadio clínico con relación a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-xL

								Valor de <i>P</i>
	Estadio I	Estadio IIA	Estadio IIB	Estadio IIIA	Estadio IIIB	Estadio IIIC	Estadio IV	
pSTAT3 nuclear (n=279)	12.5 ^a	18.6	18.2	14.3	10.7	1.4	2.1	0.03 ^b
Bcl-xL nuclear (n=278)	11.5	18.7	15.1	13.3	10.4	1.4	1.4	0.56

n: cantidad de casos, a: porcentaje de casos, b: valor de *P* mediante χ^2

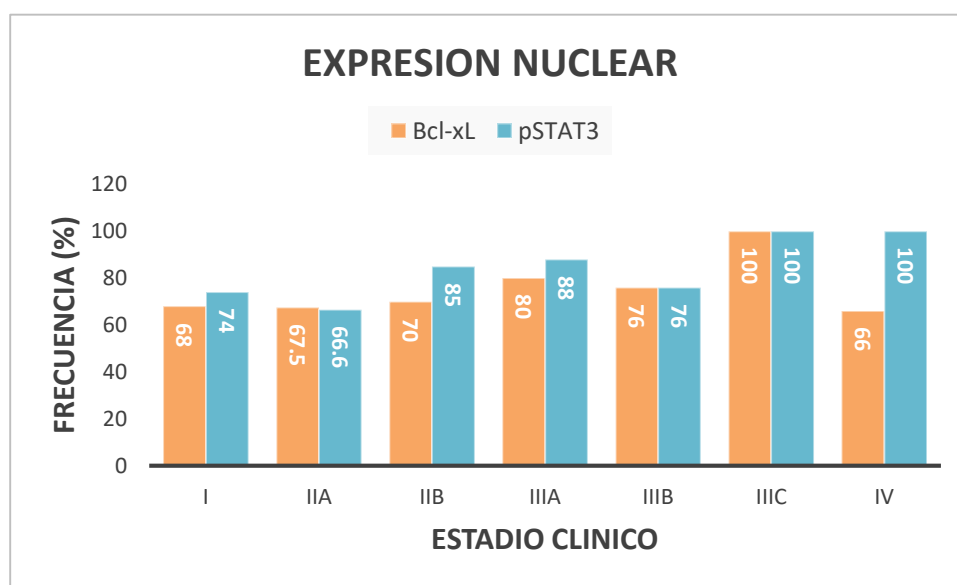


Figura 20. Distribución del estadio clínico respecto a las expresiones nucleares de pSTAT3 y Bcl-xL. En la gráfica se observa que hay un aumento de casos positivos para pSTAT3 entre el estadio IIA y el IIB, este se considera el punto de corte entre las etapas tempranas (I y IIA) y las etapas localmente avanzadas (IIB en adelante) en cáncer de mama.

Tabla 7. Riesgo relativo entre la expresión de pSTAT3 nuclear y los estadios clínicos (EC) en cáncer de mama.

ESTADIO CLÍNICO	Chi cuadrada	Riesgo relativo	IC 95%
ECI – ECIIA	0.358	1.274	0.747 - 2.172
ECI – ECIIIB	0.173	0.712	0.454 - 1.117
ECI – ECIIIA	0.075	0.661	0.447 - 0.977
ECI – ECIIIB	0.792	0.942	0.611 - 1.454
ECIIA – ECIIIB	0.014	0.680	0.517 - 0.893
ECIIA – ECIIIA	0.006	2.696	1.169 - 6.218
ECIIA – ECIIIB	0.253	0.854	0.662 - 1.102
ECIIIB – ECIIIA	0.562	0.872	0.567 - 1.341
ECIIIB – ECIIIB	0.309	1.259	0.771 - 2.058
ECIIIA – ECIIIB	0.142	1.600	0.770 - 3.325

4d) Asociación de los componentes del TNM y variantes clínicas con pSTAT3 y Bcl-xL

Al analizar el tamaño tumoral, afectación ganglionar y metástasis (clasificación TNM del estadio clínico) con la expresión nuclear de pSTAT3, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grados de afectación ganglionar ($P=0.02$, Tabla 8). De manera interesante, al determinar el riesgo relativo entre los estadios N0 – N1, mostró que la expresión nuclear de pSTAT3 se asoció con 1.8 veces más riesgo de tener afectación ganglionar en el cáncer de mama (RR=1.845; IC 95%= 1.123-3.029; $P= 0.006$, Tabla 9). Además, la expresión nuclear de pSTAT3 se correlacionó de forma estadísticamente significativa con la expresión de receptores estrogénicos ($P=0.04$), con el grado histológico ($P=0.03$) y tipo histológico ($P=0.02$, Tabla 8).

Al analizar la expresión nuclear de Bcl-xL respecto a los parámetros clínicos y moleculares se encontró una correlación estadísticamente significativa con la expresión nuclear de pSTAT3 ($P=0.0001$), con la expresión de RE ($P=0.03$) y con el IMC ($P=0.02$, Tabla 8).

Tabla 8. Relación entre la expresión nuclear de pSTAT3 y Bcl-xL con parámetros clinicopatológicos

		pSTAT3 nuclear	X^2	Valor P	Bcl- xL	X^2	Valor P
Estadio tumor	T0	1			1		
	T1	43			39		
	T2	110	2.166	0.70	98	5.276	0.26
	T3	28			29		
	T4	36			33		
Estadio nódulos	N0	89			85		
	N1	79	9.883	0.02	71	4.099	0.25
	N2	45			39		
	N3	5			5		
Estadio metástasis	M0	211	1.724	0.22	195	0.081	0.77
	M1	6			4		
Evolución clínica (2años)	Libre de enfermedad	164			147		
	Recaída	37	2.270	0.51	36	2.552	0.46
	Abandono/ Defunción	17			17		
Tipo histológico	CDI	198			178		
	CLI	6	21.855	0.001	8	12.051	0.06
	Otros	12			12		
Grado histológico	1	38			35		
	2	125	6.796	0.03	113	3.316	0.19
	3	50			46		
pSTAT3					198	27.629	0.0001
RE positivos		150	3.450	0.04	141	4.131	0.03
RP positivos		125	1.831	0.11	118	1.936	0.1
HER2 positivo		37	0.010	0.54	32	0.408	0.3
Ki67		139	0.031	0.49	125	0.025	0.5
índice de masa corporal	Bajo peso	14			14		
	Peso normal	62			59		
	Sobrepeso	80			71		
	Obesidad GI	35	10.811	0.05	33	12.943	0.02
	Obesidad GII	7			4		
	Obesidad GIII	8			6		

Tabla 9. Riesgo relativo entre la expresión de pSTAT3 y el estadio ganglionar

Estadio ganglionar/nódulos	Chi cuadrada	Riesgo relativo	IC 95%
N0-N1	0.006	1.845	1.123-3.029
N0-N2	0.09	0.839	0.695-1.013
N0-N3	0.14	0.947	0.903-0.993
N1-N2	0.513	1.127	0.769-1.652
N1-N3	0.366	0.940	0.891-0.992
N2-N3	0.296	0.900	0.821-0.987

4e) Análisis de la supervivencia global

En la curva de supervivencia de Kaplan-Meier se reflejó el incremento de supervivencia libre de enfermedad en aquellas pacientes que no presentaron recidiva ni abandono del tratamiento (Figura 21). Se observó que las pacientes libres de enfermedad tuvieron una estimación de supervivencia de 37.10 ± 0.95 meses; en las pacientes con recidiva la estimación de supervivencia fue de 31.08 ± 2.18 meses y en las pacientes con abandono/defunción el tiempo estimado de supervivencia fue de 12.85 ± 4.02 meses. [Log Rank: 30.854; $P=0.0001$] (Figura 21).

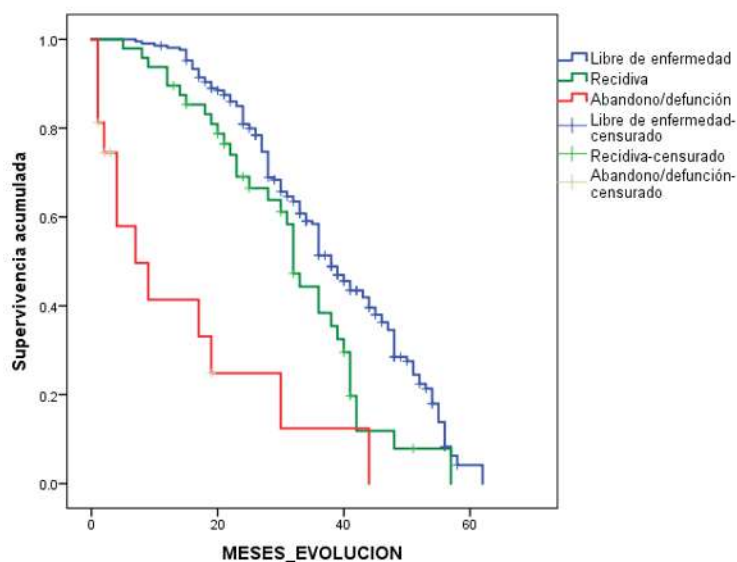


Figura 21. Curva de supervivencia global en pacientes con cáncer de mama

4f) Análisis de la supervivencia global en relación a pSTAT3 y Bcl-xL nuclear.

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier en la que se comparó la expresión de pSTAT3 con el estado actual de la paciente (viva o defunción/abandono) no mostró diferencias estadísticamente significativas, ya que se estimó una supervivencia de 58.45 meses para los casos positivos para expresión de pSTAT3 nuclear y de 52.53 meses para los casos negativos. [Log Rank: 0.678; $P=0.41$] (figura 22).

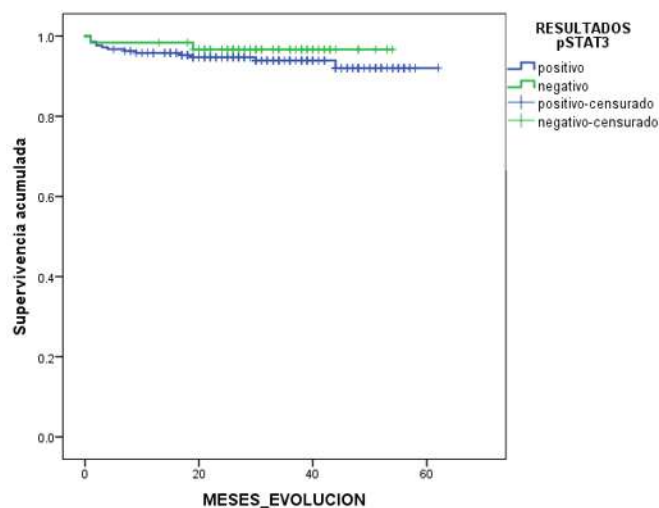


Figura 22. Curva de supervivencia en pacientes con cáncer de mama de acuerdo a la expresión de pSTAT3.

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier en la que se comparó la expresión de Bcl-xL con el estado actual de la paciente (viva o defunción/abandono) no mostró diferencias estadísticamente significativas, ya que se estimó una supervivencia de 58.25 meses para los casos positivos para expresión de Bcl-xL y de 55.49 meses para los casos negativos. [Log Rank: 0.304; $P=0.58$] (figura 23).

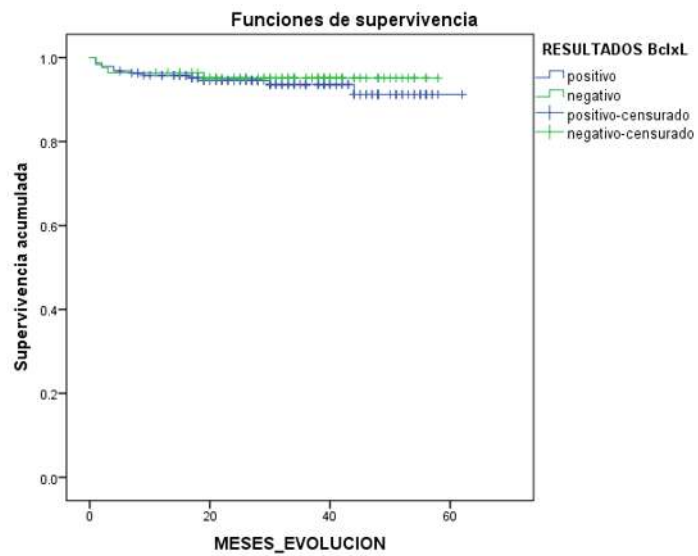


Figura 23. Curva de supervivencia en pacientes con cáncer de mama de acuerdo a la expresión de Bcl-xL

IX. DISCUSIÓN

La proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3 (STAT3) es una proteína pleiotrópica que se activa a través de múltiples receptores de citocinas y factores de crecimiento por fosforilación en su tirosina 705 (Zhang *et al.*, 2019). Modula la transcripción de genes implicados en la regulación de funciones críticas que incluyen diferenciación celular, proliferación, apoptosis, angiogénesis, metástasis y respuestas inmunitarias (Banerjee 2015; Johnston 2011). Muchas enfermedades malignas humanas; entre ellas el cáncer de mama, expresan nivel elevado de STAT3 activada constitutivamente (pSTAT3), lo cual se han asociado con un mal pronóstico (Johnston 2011).

STAT3 parece ser un punto de convergencia de numerosas vías de señalización oncogénicas, por lo que se podría esperar que tumores de mama que expresan constitutivamente pSTAT3 estén asociados a pronóstico pobre, como son los casos de tumores que sobre-expresan HER2 o triple negativo (Sonnenblick *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2019) Sin embargo, existen estudios que asocian la expresión de pSTAT3 a buen pronóstico en cáncer de mama (Aleskandarany *et al.*, 2016; Sonnenblick *et al.*, 2012). El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de pSTAT3 y Bcl-xL en cáncer de mama y correlacionar su expresión con el tipo histológico, subtipo molecular, estadio clínico y el pronóstico.

En el presente estudio, encontramos relación estadísticamente significativa ($P=0.001$), entre la expresión de pSTAT3 nuclear con el tipo histológico, observando más expresión en el carcinoma ductal infiltrante sin patrón específico y en el carcinoma lobulillar lo cual difiere de lo reportado por Aleskandarany *et al* (2016) que encontraron expresión mayor de pSTAT3, en particular con los tipos histológicos especiales de cáncer de mama.

STAT3 está activada constitutivamente en todos los subtipos moleculares de cáncer de mama, pero se asocia más frecuentemente con tumores triples negativos (Banerjee 2015). Sonnenblick *et al* (2018) y Aleskandarany *et al* (2016) reportaron alta expresión de pSTAT3 en carcinomas de mama de subtipo luminal en particular en los Luminales A y relacionaron a pSTAT3 como marcador pronóstico favorable; esto, difiere de lo encontrado por nosotros ya que la expresión de pSTAT3 entre los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama fue similar y no encontramos diferencias significativas. Pero nuestros resultados fueron similares a lo referido por Furth (2014) quien informó que la expresión de STAT1, 3 y 5 puede ser encontrada en todos los subtipos de cáncer de mama. Nosotros consideramos que esto se explica porque STAT3 puede ser activada río arriba a través de varios receptores y no-receptores tirosina cinasa asociados con los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama como IL-6, EGFR, leptina, ER, en particular una variante descrita recientemente ER α -36 al cual se une STAT3 favoreciendo la expresión de MMP2 y MMP9 en cáncer de mama (Xiang *et al.*, 2019). Nuestros hallazgos refuerzan la relación de pSTAT3 con ER, ya que encontramos asociación significativa entre estas proteínas ($P=0.04$), similar a lo reportado por Sonnenblick *et al* (2018) y Aleskandarany *et al* (2016).

Nosotros encontramos asociación estadísticamente significativa entre la expresión nuclear de pSTAT3 y el estadio clínico ($P=0.03$), similar a lo reportado por Chen *et al* (2013), quienes informaron una correlación significativa entre el estadio clínico y la expresión de STAT3. Nosotros reportamos por primera vez el análisis de riesgo relativo (RR) en donde encontramos que pSTAT3 puede expresarse como un factor protector para el avance de la enfermedad entre estadios clínicos IIA y IIB, considerándose el estadio IIB como el punto de corte en donde inician los estadios localmente avanzados (Cárdenas-Sánchez *et al.*, 2017) y como un factor de 2.6 veces más riesgo para el avance de la enfermedad entre estadios clínicos IIA y IIIA. De manera interesante al hacer el análisis por separado de la expresión nuclear de pSTAT3 con el tamaño tumoral (T), afectación ganglionar (N) y metástasis (M), nosotros hayamos diferencias significativas en relación al grado de afectación ganglionar ($P=0.02$); además, al determinar el riesgo relativo entre los estadios N0-N1 encontramos que la expresión nuclear de pSTAT3 se asocia con 1.8 veces más riesgo de tener afectación ganglionar. Estos hallazgos son similares a los descritos por Chen *et al* (2013), donde la expresión de STAT3 fue el predictor más importante de metástasis a ganglios linfáticos en el cáncer de mama y concluyeron que STAT3 favorece la metástasis a ganglios linfáticos, lo cual conduce a un mal pronóstico de las pacientes con cáncer de mama. Sin embargo se han reportado resultados contradictorios en relación a la expresión de pSTAT3 en células de carcinoma de mama por ejemplo Aleskandarany *et al* (2016) y Sonnenblick *et al* (2012 y 2013) no encontraron asociación significativa entre la expresión de pSTAT3 y el grado de afectación ganglionar, ellos reportaron que pSTAT3 se asocia con parámetros de buen pronóstico en cáncer de mama, otros investigadores sugieren que pSTAT3 puede actuar como un supresor tumoral con un rol en la diferenciación celular y apoptosis en el tejido mamario (Sonnenblick *et al.*, 2012). Estos resultados controversiales pueden explicarse por la existencia de dos isoformas de STAT3; STAT3 α y STAT3 β , la cual fue descrita en los 90s por Caldenhoven *et al* (1996). Investigaciones previas sugieren que STAT3 β es un supresor tumoral (Zhang *et al* 2016) que tiene funciones transcripcionales específicas bajo condiciones basales y es capaz de ejercer acciones directas para modular la activación de STAT3 α después de la estimulación con citosina además de ser un importante modulador de la expresión génica (NG *et al.*, 2012). STAT3 β también mejora y prolonga la fosforilación y retención nuclear de STAT3 α por lo que se ha reportado que el incremento de los niveles de STAT3 β contribuyen a aumentar los niveles de pSTAT3 en líneas celulares de cáncer de mama (Bharadwaj *et al.*, 2014), la asociación entre los niveles aumentados de STAT3 β con el incremento de los niveles de pSTAT3 constitutivo y consecuente oncogénesis, contrastan con hallazgos publicados previamente demostrando que la sobreexpresión de STAT3 β antagoniza los efectos transformantes de STAT3 α en líneas celulares NIH-3T3 (Bharadwaj *et al.*, 2014). Nosotros reportamos como un factor protector y de riesgo la expresión de pSTAT3 dependiendo del estadio clínico, estos resultados son consistentes con lo reportado por Ranger *et al* en un modelo murino de cáncer de mama con ErbB2 activado en donde encontró que STAT3 no tiene un rol en la iniciación del tumor, pero tiene un efecto dramático en la progresión metastásica (Hughes *et al.*, 2018), lo cual puede estar

directamente relacionado con el microambiente tumoral; Jones *et al*, reportaron que STAT3 en el epitelio expresa un rol en la promoción de un microambiente tumoral inmunosupresor durante estadios tempranos de la iniciación del tumor y progresión en un modelo murino con poliomavirus (Hughes *et al.*, 2018). En nuestro caso se evaluó en promedio 31.27 ± 13.5 meses de evolución y reportamos que no hay diferencias significativas entre la expresión de pSTAT3 nuclear y la supervivencia de las pacientes. En otros estudios realizados se ha reportado la expresión de pSTAT3 como un marcador de buen pronóstico en cáncer de mama; por ejemplo, Sonnenblick *et al* (2011) reportan que pacientes con tumores positivos para pSTAT3 tuvieron significativamente una mejor supervivencia libre de enfermedad a 5 años, además la expresión nuclear de pSTAT3 correlacionó significativamente con una mejor supervivencia a 5 y 10 años. Aleskandarany *et al* (2016) refieren que la expresión nuclear de pSTAT3 usando inmunohistoquímica se asoció con un mejor pronóstico en las pacientes lo cual se corroboró mediante el estudio de la expresión de genes. El tiempo de evaluación de supervivencia de nuestras pacientes es muy corto para poder determinar el valor de pSTAT3 como un factor pronóstico por lo que sería necesario dar un seguimiento de la evolución de las pacientes por más tiempo.

En el desarrollo del cáncer no solo están implicadas proteínas que favorecen la proliferación celular, también están involucradas proteínas que bloquean la apoptosis y que le confieren a las células neoplásicas mayor supervivencia; tal es el caso de la proteína Bcl-xL la cual pertenece a la familia de proteínas Bcl-2, con actividad antiapoptótica principalmente (Ramirez- García *et al.*, 2014) pero, cuando se localizan en el núcleo de la célula, le confiere otras funciones, como promoción de la migración, invasión y metástasis (Choi *et al.*, 2016). Nosotros encontramos la expresión nuclear y citoplasmática mediante inmunohistoquímica de dicha proteína en tejido mamario neoplásico humano en el 72% de los especímenes evaluados. Esta expresión fue similar en todos los tipos histológicos y moleculares de cáncer de mama; no encontramos antecedente de estudios similares, sin embargo, la explicación a dichos resultados puede ser por el hecho de que nuestros casos presentaron una expresión similar de pSTAT3 en todos los subtipos moleculares de cáncer mama, pSTAT3 activa a Bcl-xL por lo cual esta proteína se encuentra expresada de manera similar en todos los subtipos independientemente del grado de diferenciación celular. Además no encontramos correlación de la expresión nuclear ni de la citoplasmática de Bcl-xL con estadio clínico avanzado, la expresión fue similar en todos los casos, al analizar por separado el tamaño tumoral (T), el grado de afectación ganglionar (N) y la metástasis (M) tampoco encontramos diferencias significativas; estos hallazgos difieren de lo reportado en un estudio en líneas celulares de cáncer de mama y de carcinoma neuroendocrino de páncreas en donde encontraron que la expresión nuclear de Bcl-xL promueve la migración celular y la invasión, no así la expresión mitocondrial (Choi *et al.*, 2016). En otro estudio en líneas celulares de cáncer de páncreas, en un modelo murino y en cortes histológicos humanos para evaluar si Bcl-xL promueve la carcinogénesis, se encontró que los niveles de expresión de Bcl-xL aumentan con la progresión de la neoplasia pancreática (Ikesawa *et al.*,

2017). También se ha reportado la expresión de Bcl-xL nuclear en cáncer de pulmón humano y su correlación con metástasis a distancia (Sánchez-Ceja *et al.*, 2006).

En esta investigación se encontró que la expresión nuclear de Bcl-xL se asoció con la expresión de pSTAT3 ($P=0.0001$) lo cual apoya la relación existente con STAT3, ya que esta, media funciones de supervivencia e inducción de genes antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL en el cáncer (Levy *et al.*, 2002).

Bcl-xL se ha relacionado con el desarrollo de resistencia al tratamiento quimioterapéutico, en el estudio realizado por Williams *et al* (2005), reportaron en una cohorte de pacientes con cáncer de ovario resistente al cisplatino, que el 61.5% de las pacientes mostraron alta expresión de Bcl-xL y en un modelo de xenoinjerto en ratón desnudo se encontró que los tumores con sobreexpresión de Bcl-xL eran resistentes al cisplatino, paclitaxel, topotecan y gemcitabine (Santanu *et al.*, 2017). En nuestros casos encontramos que un 84.61% de las pacientes que recibieron neoadyuvancia presentaron resistencia al tratamiento evaluado histológicamente y aunque no encontramos relación significativa con la expresión nuclear y citoplasmática de Bcl-xL es un hallazgo que requiere de mayor investigación. De manera interesante encontramos correlación en la expresión de Bcl-xL nuclear con la expresión de ER en cáncer de mama, Liu *et al* (2017) reportaron la expresión de ER β 2, Bcl-xL y bax en carcinoma de pulmón de células no pequeñas y una asociación significativa entre ER β 2 y Bcl-xL; esto sugiere que la expresión de ER β 2 puede estar asociada con mecanismos antiapoptosis de las células neoplásicas (Liu *et al.*, 2017). Por otro lado Krajewski *et al* (1999) reportaron que por medio de estudios de inmunohistoquímica encontraron correlación significativa entre Bcl-xL y ER en cáncer de mama.

En nuestro estudio se analizó el índice de masa corporal, el cual es un indicador que se utiliza para identificar el sobrepeso y la obesidad en adultos (OMS, 2020) y encontramos una correlación significativa entre la expresión nuclear de Bcl-xL y el índice de masa corporal. De acuerdo a nuestro análisis el 35.9% de nuestros casos presentó sobrepeso y el 22% presentó obesidad, que se definen como la acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo (OMS, 2020). Recientemente se ha considerado al sobrepeso y la obesidad como factores de riesgo para el desarrollo del cáncer debido a que en estas pacientes se presentan mayores niveles de estrés oxidativo que puede producir inflamación crónica, alteraciones en el funcionamiento del sistema inmune y la producción aumentada de algunos tipos de hormonas (Herrera-Covarrubias *et al.*, 2015) La leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo (Santillan *et al.*, 2012), la cual activa al ER y la vía de señalización JAK2/STAT3 a través de la cual se activa la transcripción de genes implicados en la diferenciación y proliferación celular y en la resistencia a la apoptosis a través de la proteína Bcl-xL (Wu, *et al.*, 2019; Herrera-Covarrubias *et al.*, 2015) por lo que nuestros resultados son consistentes con la asociación que existe entre la obesidad y la activación de vías de señalización en donde participan Leptina/STAT3/Bcl-xL involucradas en el desarrollo del cáncer de mama.

En nuestros casos se evaluó en promedio 31.27 ± 13.5 meses de evolución y reportamos que no hay diferencias significativas entre la expresión de Bcl-xL nuclear y total y la supervivencia de las pacientes, estos datos son diferentes de los reportados por Krajewski *et al* (1999) quienes refieren que contrario a lo esperado, altos niveles de expresión de Bcl-xL se asociaron con supervivencia libre de enfermedad en pacientes con estadios I y II de cáncer de mama, aunque consideran que no debe tener un fuerte significado pronóstico en pacientes con estadios tempranos que hayan recibido tratamiento. El 54.3% de nuestras pacientes se encontraban en estadios clínicos localmente avanzados (IIB a IV), Ikesawa *et al* (2017) reportan mayor expresión de Bcl-xL nuclear en neoplasias en estadios avanzados, por lo cual no se presentaron diferencias en la supervivencia de nuestras pacientes.

Por último, reportamos el hallazgo de un grupo de carcinomas de mama de tipo luminal A que presentaron alta expresión de Ki67 (más de 20%). Ki67 es un marcador de proliferación celular cuya expresión en cáncer de mama se asocia con peor pronóstico y buena respuesta al tratamiento con quimioterapia (Panal *et al.*, 2014), generalmente se ha visto que los subtipos HER2 y triple negativo muestran un porcentaje de expresión mayor de Ki67, así como algunos luminal B, pero no se han reportado luminal A con alta expresión de Ki67. Durante la revisión de los datos clínicos de los casos aquí incluidos, encontramos que tumores ER positivos se presentaron con características clínico-patológicas asociadas a mal pronóstico y además mostraron alta expresión de Ki67, lo cual difiere de las características establecidas para carcinomas de mama de tipo luminal A, por lo que consideramos que aun y cuando los carcinomas de tipo luminal A son de buen pronóstico, es importante tomar en consideración la expresión de Ki67 ya que si este es alto, estas pacientes tendrán más riesgo de recaída en un tiempo menor. Cabe destacar que Hashmit *et al* (2019) reportaron asociación del índice de Ki67 principalmente con tumores de mama triple negativos seguido por HER2 y con un índice más bajo los luminales A; sin embargo, reportan una media de $23.6 \pm 19.7\%$ de expresión de Ki67, es decir por arriba del punto de corte establecido para los tumores luminales A. Además, el índice de Ki67 se asoció con los tipos histológicos de cáncer de mama metaplásico y medular y reportan asociación del índice de Ki67 con la edad en subtipos triple negativos y luminal A.

X. CONCLUSIONES

- La expresión de pSTAT3 nuclear en relación al estadio clínico tuvo un papel dual, en estadios tempranos (I y IIA) en los que el cáncer no ha avanzado localmente, pSTAT3 se identificó como un factor protector para el avance de la enfermedad; mientras que en estadios localmente avanzados (estadios IIB al IV) pSTAT3 se identificó como un factor de riesgo para el avance de la neoplasia.
- La expresión de pSTAT3 nuclear se identificó como un factor de riesgo para metástasis ganglionar (estadios N0-N1).
- La expresión nuclear de Bcl-xL se relacionó con la expresión nuclear de pSTAT3 lo que podría explicar la resistencia a la quimioterapia encontrada en más del 80% de nuestros casos tratados con neoadyuvancia.
- Bcl-xL nuclear se asoció con la expresión de ER y con el IMC lo cual podría explicar la relación existente entre el sobrepeso y obesidad con la activación de vías de señalización como Leptina-STAT3-Bcl-xL y Leptina-ER-Bcl-xL que favorecen el desarrollo de cáncer de mama.
- Los carcinomas de mama de tipo Luminal A pueden presentar una expresión alta de Ki67 (>20%), lo cual puede explicar la presencia de recaída en corto tiempo de estas pacientes.
- La expresión de pSTAT3 y de Bcl-xL (nuclear y total) no se asociaron con menor supervivencia en pacientes que recibieron tratamiento para el cáncer de mama.

XI. PERSPECTIVAS

- Realizar PCR para identificación de isoformas de STAT3 y analizar su expresión en cáncer de mama y su asociación con parámetros clínicos, patológicos y moleculares.
- Analizar la expresión de STAT3 en el microambiente tumoral y como se relaciona con el comportamiento de las células neoplásicas.
- Analizar porque, aunque nuestra población no tiene muchos de los factores de riesgo establecidos para otras poblaciones, el cáncer de mama se presenta a edad menor a la establecida en países desarrollados.
- Analizar la expresión de Leptina con el IMC, STAT3 y Bcl-xL en pacientes con cáncer de mama.
- Asociar a los carcinomas de mama Luminal A con Ki67 alto con parámetros clínicos y moleculares y analizar la evolución de las pacientes.
- Analizar la relación de Bcl-xL y STAT3 con la resistencia a la quimioterapia y la expresión de estas proteínas en pacientes que recibieron neoadyuvancia.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aako, S., Straume, A., Elvbakken, E., Chen, P., Qiao, X., Lonning, P., y Kalli, M. (2019). MYC-Induced miR-203b-3p and miR-203^a-3p Control Bcl-xL Expression and Paclitaxel Sensitivity in Tumor cells. *Transl Oncol*, 12 (1), 170-179. doi: 10.1016/j.tranon.2018.10.001
2. Aleskandarany, MA., Agarwal, D., Negm, OH., Ball, G., Elmouna, A., Ashankyty, I., Nuglozeh, E., Fazaludeen, MF., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C., Tighe, PJ., Green, AR., Ellis, I., y Rakha, EA. (2016). The prognostic significance of STAT3 in invasive breast cancer: analysis of protein and mRNA expressions in large cohorts. *Breast Cancer Res Treat.* doi: 10.1007/s10549-016-3709-z.
3. Allemani, C., Sant, M., y Coleman, MP. (2013). Breast cancer survival in the US and Europe: A CONCORD high-resolution study. *International Journal of cancer*. Recuperado marzo 12, 2020 de <https://doi.org/10.1002/ijc.27725>
4. Arce, C., Bargallo, E., Villaseñor, Y., Gamboa, C., Lara, F., Pérez, V., y Villarreal, P. (2011). Oncología: Cáncer de Mama. *Cancerología*, 6, 77-86.
5. Arrechea, MA., García, V., Córdoba, A., Ibañez, B., Santamaría, M., y Guillen, F. (2011). Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 34 (2). doi: 10.4321/S1137-6272011000200008
6. Banerjee, K y Resat, H. (2015) Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *International Journal of Cáncer*, 138, 2570-2578.
7. Bharadwaj, U., Kasembell, M., Eckols, Tk., Kolosov, M., Lang, P., Christensen, K., Edwards, DP., y Tweardy, DJ. (2012). Monoclonal Antibodies Specific for STAT3 β Reveal Its Contribution to Constitutive STAT3 Phosphorylation in Breast Cancer. *Cancers*, 6, 2012-2034. doi: 10.3390/cancers6042012
8. BREASTCANCER. (2013). *En las nuevas pautas de la ASCO, se establece que debe determinarse el estado de HER2 en todo cáncer de mama invasivo.* Recuperado junio 30, 2018 de

<https://www.breastcancer.org/es/noticias-investigacion/20131023-3>

9. BREASTCANCER. (2014). Análisis de inmunohistoquímica (IHQ). Recuperado enero 7, 2019 de <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/analisis/tipos/ihq>
10. Caldenhoven, E., Dijk, TB., Solari, R., Armstrong, J., Raaijmakers, JA., Lammers, JW., Koenderman, L., y De Groot, RP. (1996). STAT3 β , a Splice Variant of Transcription Factor STAT3, Is a Dominant Negative Regulator of Transcription. *J. Biol. Chem.* 271 (22), 13221-13227
doi: 10.1074/jbc.271.22.13221
11. Cárdenas-Sánchez, J., Erazo-Valle, A., Maafs, E., y Pointevin, A. (2011). Consenso Nacional sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. Cuarta revision. Colima, México. Enero 2011. *GAMO*, 10(6), 4-50.
12. Cárdenas-Sánchez, J., Bargallo-Rocha, JE., Bautista-Piña, V., Cervantes-Sánchez, G., Erazo Valle-Solis, A., Flores-Balcazar, CH., Maffuz-Aziz, A., Pérez-Sánchez, VM., Poitevin-Chacón, A., Salas- González, E., Torrecillas-Torres, L., Valero-Castillo, V. (2017). *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Séptima revision-Colima 2017*. <http://consensocancermamario.com>
13. Chen, Y., Wang, J., Wang, X., Liu, X., Li, H., Lv, Q., Zhu, J., Wei, B., y Tang, Y. (2013). STAT3, a Poor Survival Predictor, Is associated with Lymph Node Metastasis from Breast Cancer. *J Breast Cancer*, 16 (1), 40-49.
doi: 10.4048/jbc.2013.16.1.40
14. Choi, S., Chen, Z., Tang, L., Fang, Y., Shin, S., Panarelli, N., Chen, Y., Jiang, X., y Du, Y. (2016). Bcl-xL promotes metastasis independent of its anti-apoptotic activity. *Nat. commun*, 7, 10384. doi: 10.1038/ncomms10384
15. Coppola, F., Nadre, J., y Aguirre, R. (2005). Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Rev Med Uruguay*, 21 (1), 15-22.
16. Curtis, C., Shah, SP., Chin, SF., Turashvili, G., y Rueda, OM. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486, 346-352.

17. Dang, W., Tang, HC., Wang, XZ., y Tian, W. (2015). Strategy of STAT3[beta] cell-specific expression in macrophages exhibits antitumor effects on mouse breast cancer. *Gene Ther*, 22(12), 977-983.
18. Fisher, D., Appenheimer, M., y Evans, S. (2014). The two faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment. *Semin Immunol*, 26 (1), 38-47.
doi: 10.1016/j.smim.2014.01.008
19. Furth, PA. (2014, 25 de enero). STAT Signaling in Different Breast Cancer Sub-types. *Mol Cell Endocrinol*, 382 (1). doi: 10.1016/j.mce.2013.03.023
20. Grajales, E., Cazares, C., Díaz, L., y De Alba, V. (2014). Risk factors for breast cancer in México: a review of studies on mexican and Mexican-american population. *Rev CES Salud Pública*, 5 (1), 50-58.
21. Hammond, ME., Hayes, DF., Dowsett, M., Allred, DC., Hagerty, KL., Richard, J., y Patrick, L. (2010). American Society of clinical oncology/college of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of Pathology Laboratory Medicine*. 134, e72.
22. Harbeck, N., Thomssen, C., y Gnant, M. (2013). St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summmary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)*, 8 (2), 102-109. Doi: 10.1159/000351193
23. Harbeck , N., Penault-Llorca, F., Cortés, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., y Cardoso, F. (2019). Breast cáncer. *Nature Reviews*, 5 (66).
24. Harris, L., Fritsche, H., Menuel, R., Norton, L., Ravdin, P., Wolff, A., y Elizabeth, M. (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25 (33), 5287-5312.
25. Hashmi, Aa., Hashmi, KA., Irfan, M., Khan, SM., Edhi, M., Ali, JP., Hashmi, SK., Faridi, N., y Khan, A. (2019). Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes*, 12, 605. doi: 10.1186/s13104-019-4653-x

26. Heredia-caballero, A y Palacios-López, G. (2018). Breast cancer survival after 5 years of treatment: Institutional experience. *Ginecol Obstet Mex*, 86 (9), 575-583.
27. Herrera-Covarrubias, D., Coria-Avila, GA., Fernandez- Pomares, C., Aranda-Abreu, GE., Manzo-Denes, J., y Hernández, ME. (2015). La obesidad como factor de riesgo en el desarrollo de cancer. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 32 (4), 766-76.
28. Hilal-Dandan, R. y Brunton, L. (2015). Goodman y Gilman Manual de Farmacología y Terapéutica. Editorial Mc Graw Hill. 2a Ed. México, D.F. pp. 1077-1145.
29. Horvath, CM. (2000). STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem.Sci.*, 25 (10), 496-502.
doi: 10.1016/S0968-0004(00)01624-8
30. Hughes, K y Watson, CJ. (2018). The Multifaceted Role of STAT3 in Mammary Gland Involution and Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci*, 19, 1695.
31. Ikesawa, K., Hikita, H., Shigekawa, I., Iwahashi, K., Eguchi, H., Sakamori, R., Tatsumi, T., y Takehara, T. (2017). El aumento de la expression de Bcl-xL en la neoplasia pancreática promueve la carcinogénesis al inhibir la senescencia y la apoptosis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 4 (1), 185-200. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.02.001
32. INEGI. (2014). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. Recuperado mayo 25, 2018 de www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2014/cáncer16.pdf
33. INEGI. (2016). *Día mundial de la lucha contra el cáncer de mama*. Recuperado mayo 25,2018 de www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mama2016_Opdf
34. Johnston, P y Grandis, J. (2011). Señalización STAT3: Estrategias y desafíos contra el cáncer. *Intervenciones moleculares*, 11 (1), 18-26.
doi: 10.1124/mi.11.1.4
35. Kim, IK., Jung, YK., Nog, DY., Song, YS., Choi, CH., Hidetoshi, E., y Tatsumi, T. (2003). Functional screening of genes suppressing TRAIL-induced apoptosis:

distinct inhibitory activities of Bcl-xL and Bcl-2. *British Journal of cancer*, 88, 910-917.

36. Krajewski, S., Krajewska, M., Turner, BC., Pratt, C., Howard, B., Zapata, JM., Frenkel, V., Robertson, S., Lonov, Y., Yamamoto, H., Perucho, M., Takayama, S., y Reed, JC. (1999). Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 6, 29-40.
37. Kumar, V., Abbas, A., y Fausto, N. (2010). Patología estructural y funcional. Editorial Elsevier. 8ª Ed. Barcelona, España. pp. 1123-1158.
38. Kumar, V., Abul, K., Abbas., Jon C. (2015). Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease. Editorial Elsevier Saunders. 9a. Ed Barcelona, España. pp. 1066-1068
39. Levy, E. y Lee, C-K. (2002). What does STAT3 do? *J. Clin. Invest.*, 109. 1143-1148. doi: 10.1172/JCI200215650
40. Liu, J., Nie, Z., Lei, Y., Yang, S., y Liu, Z. (2017). The expression of ERβ2, Bcl-xL and Bax in non-small cell lung cancer and associated with prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*, 10 (9), 10040-10046.
41. Lugo, G. (2018). Diagnóstico temprano, vía contra el cáncer de mama. Gaceta UNAM. Recuperado diciembre 20, 2019 de www.gaceta.unam.mx
42. Luo, J., Yan, R., He, X., y He, J. (2017). La activación constitutiva de STAT3 y la sobreexpresión de ciclina D1 contribuyen a la proliferación, migración e invasión en células de cáncer gástrico. *American Journal of translational Research*, 9 (12), 5671-5677.
43. Maffuz-Aziz, A., Labastida-Almendaro, S., Espejo-Fonseca, A., y Rodriguez-Cuevas, S. (2016). Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. *Cir cir*, 85 (3), 193-278. doi: 10.1016/j.circir.2016.08.004
44. Majlis, S. (2008). Hormonas femeninas y cáncer de mama: Estado de la polémica y evidencias en 2008. ¿Qué responder a las pacientes? *Revista Chilena de radiología*, 14 (3), 113-121. doi: 10.4067/S0717-93082008000300003

45. Mills, SE. (2007). Histology for Pathologists. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. 3a Ed. Philadelphia, USA. pp. 68-69.
46. NG, IHW., NG, DCH., Jans, DA., y Bogoyevitch, MA. (2012). Selective STAT3- α or- β expression reveals spliceform-specific phosphorylation kinetics, nuclear retention and distinct gene expression outcomes. *Biochem.J*, 447, 125-136. doi: 10.1042/BJ20120941
47. Noriega-Reyes, M y Langley, E. (2008). Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el Cáncer mamario. *Cancerología*, 3, 29-40.
48. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Recuperado mayo 20, 2020 de www.who.int/topics/cancer/es/
49. Organización Mundial de la Salud, Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer. (2003) *Classification of Tumours Pathology and genetics of Tumours of the breast and female genital organs*. Recuperado mayo 25, 2018 de www.who.int/cancer
50. Organización Mundial de la Salud. (2008) *Cáncer de mama: prevención y control*. Recuperado mayo 25, 2018 de www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html.
51. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. (2014). *Epidemiología del cáncer de mama en las Américas*. Recuperado mayo 25, 2018 de www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html
52. Organización Mundial de la Salud. (2016). *Diez datos sobre la obesidad*. Recuperado marzo 25, 2020 de www.who.int/obesity/facts
53. Organización Mundial de la Salud. (2019). Obesidad y sobrepeso. Recuperado junio 6, 2020 de www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
54. Ornelas-Aguirre, JM y Pérez-Michel, L. (2013). Clasificación molecular del cáncer de mama: relación con las características clínico-patológicas y el grado histológico en mujeres del noroeste de México. *Cir Cir*, 81 (6).

55. Owen, JA., Punt, J., y Stranford, SA. (2014). KUBY Inmunología. Editorial McGraw-Hill, 7ª Ed. Recuperado junio, 2018 de www.accessmedicina.com
56. Panal, M., Herrera de la Muela, M., Hardisson, D., Choqueneira, D., Román, A., y De Santiago, F. (2014). Correlation between Ki67 expression and classical prognostic and predictive factors in early breast cancer. *Rev Senol Patol Mamar*, 27 (4), 147-196.
57. Parl, FF., Crooke, Ps., Plummer, WD., y Dupont, WD. (2018). Genomic-Epidemiologic Evidence that Estrogens Promote Breast Cancer Development. *Cancer Epid Biomark*, 27 (8), 899-907.
doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-1174
58. Pazo, C., Alvarez, A., Cebollero, M., Agustín, MJ., Martínez, L., Bernal, A., Pérez, JL., y Antón, A. (2012). Apoptosis. Cancer & Co. *Revista internacional de grupos en investigación en Oncología*, 1 (1), 8-23.
59. Qin, J-J., Yan, L., Zhang, J., y Zhang, W-D. (2019). STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 195.
doi: 10.1186/s13046-019-1206-z
60. Ramirez-García, M., Marquez-Gonzalez, H., Barranco-Lampon, G., y López Aguilar, J. (2014). Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Residente*, 9 (3), 84-94.
61. Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (1984). Recuperado enero 4, 2019 de:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
62. Salinas-Martínez, AM., Juárez-Ruiz, A., Mathiew-Qurós, A., Guzmán-De la Garza, F., Santos-Lartigue, A., y Escobar-Moreno, C. (2014). Cáncer de mama en México: tendencia en los últimos 10 años de la incidencia y edad al diagnóstico. *Revista de Investigación Clínica*, 66 (3), 210-217.
63. Samavat, H y Kurzer, MS. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett*, 356 (200), 231-243. doi:10.1016/j.canlet.2014.04.018
64. Sánchez, C. (2013). Knowing and understanding the cancer cell: Physiopathology of cancer. *Rev.Med.Clin.Condes*, 24 (4), 553-562.

65. Sánchez-Ceja, SG., Reyes-Maldonado, E., Vazquez-Manríquez, ME., López-Luna, JJ., Belmont, A., y Gutierrez-Castellanos, S. (2006). Differential expression of STAT5 and Bcl-xL, and High expression of Neu and STAT3 in non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, 54, 163-168.
doi: 10.1016/j.lungcan.2006.07.012
66. Santanu, M., Panda, S., Samal, SK., Shriwas, O., Rath, R., Pellicchia, M., Emdad, L., Das, SK., Fisher, PB., y Dash, R. (2017). Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Advances in Cancer Research*.
<https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.11.001>
67. Santillán, JG., Ordoñez, A., Mendieta, H., y Gomez, LM. (2012). La leptina en la carcinogénesis mamaria Vías de señalización. *QuímicaViva*, 2 (11), 91-111
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v11n2/santillan.pdf
68. Sanz, NJ., Viñals, A., Díaz, PA., Fernández, PA. (2005). Graduación Histológica de Malignidad en el Carcinoma Ductal Infiltrante de la Mama. 7º *Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica*. Recuperado mayo 20, 2020 de www.conganat.org/7congreso/PDF/260.pdf
69. Secretaria de Salud. (2011). Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del Cáncer de mama. Recuperado mayo 25, 2018 de www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/equipomedico/normas/NOM_041_SSA2_2011.pdf
70. Sen kus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S., y Cardoso, F. (2015). Primary breast cancer: ESMO clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 26 (5), 8-30. doi: 10.1093/annonc/mdv298
71. Sifuentes-Alvarez, A., Castañeda-Martínez, LY., Lugo-Nevares, M., y Reyes-Romero MA. (2015). Factores de riesgo asociados con el cáncer de mama en mujeres del estado de Durango, México. *Ginecol Obstet Mex*, 83, 662-669.
72. Sjostrom, J., Blomqvist, C., Von Boguslawski, K., Bengtsoon, NO., Mjaaland, I., y Bengtsoon, N. (2002). The predictive value of Bcl-2, Bax, Bcl-xL, Bag 1, fas and fasL for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 8, 811-816.

73. Sonnenblick, A., Shriki, A., Galun, E., Axelrod, JH., Daum, H., Rottenberg, Y., Hamburger, T., Mali, B., y Peretz, T. (2012). Tissue microarray-based study of patients with lymph node-positive breast cancer shows tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (tyrosine 705-STAT3) is a marker of good prognosis. *Clin Transl Oncol*, 14, 232-236. doi: 10.1007/s12094-012-0789-z

74. Sonnenblick, A., Uziely, B., Nechushtan, H., Kadouri, L., Galun, E., Axelrod, JH., Katz, D., Daum, H., Hamburger, T., Maly, B., Allweis, TM., y Peretz, T. (2013). Tumor STAT3 tyrosine phosphorylation status, as a predictor of benefit from adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 138, 407-413. doi:10.1007/s10549-013-2453-x

75. Sonnenblick, A., Salgado, R., Brohee, S., Zahavi, T., Peretz, T., Van Den Eynden, G., Rouas, G., Salmon, A., Francis, PA., Di Leo, A., Crown, JPA., Viale, G., Daly, L., Javdan, B., Fujisawa, S., De Azambuja, E., Lieveke, A., Piccart, MJ., Bromberg, JF., y Sotiriou, C. (2018). p-STAT3 in luminal breast cancer: Integrated RNA-protein pooled analysis and results from the BIG2-98 phase III trial. *International Journal of Oncology*, 52, 424-432. doi:10.3892/IJO.2017.4212

76. Torres-Arreola, L., Barragán-Ruíz, JA., Becerra-Alcántara, GI., González-López, NJ., Mainero-Ratchelous, FE., Mijares-Martínez, A., Patlán-Pérez, RM., Pérez-Puente, A., Silva-Juan, A., Pol-Kippes, G., Miranda-Hernández, H., Lázaro-León., JM., y Rodríguez-Cuevas, S. (2009). *Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de atención*, México; Secretaria de Salud. Recuperado abril 1, 2019 de www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html

77. Trecesson, S., Souazé, F., Basseville, A., Bernard, A., Pécot, J., López, J., Bessou, M., Sarosiek, K., Letai, A., Barillé-Nion, S., Valo, I., Coqueret, O., Guette, C., Campone, M., Gautier, F., y Juin, P. (2017). Bcl-xL directly modulates RAS signaling to favour cancer cell stemness. *Nat Commun*, 8, 1123. doi: 10.1038/s41467-017-01079-1

78. Tresserra, F., Martinez, M., González-Cao, M., y Fabregas, R. (2013). Pathologic response to neoadjuvant chemotherapy: Correlation between 2 histologic grading systems. *Rev Senol Patol Mamar*, 26 (3), 77-84. doi: 10.1016/j.senol.2013.01.004

79. Uribe, JR., Hernández, CA., Menolascino, F., Rodriguez, J., Isturiz, L., Marquez, ME., Rodriguez, R., y Uribe, JL. (2010). Clasificación Molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Revista Venezolana de Oncología*, 22 (2), 109-116.
80. Valle, A y Soto, I. (2005). Vía Jak-STAT: Una visión general. *Vertientes revista especializada en Ciencias de la Salud*. Recuperado mayo 25, 2018 de www.revistas.unam.mx
81. Williams, J., Lucas, P.C., Griffith, K.A., Choi, M., Fogoros, S., y Hu, Y.Y., (2005). Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease. *Gynecologic Oncology*, 96, 287-295
82. Wincewicz, A., Koda, M., Sulkowska, M., Kanczuga-Koda, L., Wincewicz, D., y Wincewicz, P. (2009). STAT3 and Hipoxia induced proteins-HIF-1 alpha, EPO and EPOR in relation with Bax and Bcl-xL in nodal metastases of ductal breast cancers. *Folia Histochemical et cytobiologica*, 47 (3), 425-430.
83. Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., y Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology*, 12, 95. doi: 10.1186/s13045-019-0778-6.
84. Xiang, Y., Peng Li, J., y Liao, X-H. (2019). Novel interactions between ER α -36 and STAT3 mediate breast cancer cell migration. *Cell Commun Signal*, 17, 93. doi: 10.1186/s12964-019-0409-4. Recuperado de: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6693284/#!po=0.769231
85. Zhang, HF., Chen, Y., Wu, C., Wu, ZY., Tweardy, DJ., Alshareef, A., Liao, LD., Xue, YJ., Wu, JY., Chen, B., XuXE., Gopal, K., Gupta, N., Li EM., Xu LY., y Lai, R. (2016). The opposing Function of STAT3 as an Oncoprotein and Tumor Suppressor is Dictated by the Expression Status of STAT3 β in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 22 (3), 691-703. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1253
86. Zhang, HF., Yang, PL., Li, EM., y Xu, LY. (2019). STAT3 β , a distinct isoform from STAT3. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 110, 130-139. doi. Org/10.1016/j.biocel.2019.02.006