

**ASOCIACIÓN ENTRE EXPRESION DE *SLUG* y *ZEB1*  
Y RESISTENCIA A LA TERAPIA HORMONAL EN CASOS DE CÁNCER DE  
MAMA, DE UN CENTRO ONCOLÓGICO DE REFERENCIA DEL CARIBE  
COLOMBIANO**

**Presentado por:**

**Belkis de la Candelaria Palacio Villalba, MSc.**

**Inés Benedetti, MD, PhD**

**Tutora**

**Ángel Hernández, MD, MSc.**

**Co-investigador**

**Requisito para optar al grado de Magíster en Farmacología**



**Universidad de Cartagena  
Facultad de Medicina  
Programa de Maestría en Farmacología  
Cartagena, Colombia  
2020**

## **DEDICATORIA**

### **Dedicado a:**

Al creador por haberme dado la fortaleza para llegar a la culminación de mis estudios.

A mis padres por su apoyo permanente.

A Nelson, mi esposo, quien con su apoyo incondicional me mantuvo motivada para culminar con éxito mis estudios.

A mis hijos, Daniela, Vanessa y Pipe a quienes les quite tiempo valioso de familia para poder dedicarlo a desarrollar esta maestría, y son mi inspiración para continuar creciendo profesionalmente.

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora expresa sus agradecimientos a:

Al cuerpo Docente y Directivos de la Maestría en Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, por sus aportes y compromiso con la Maestría.

A la Dra. Marlene Duarte, coordinadora de la maestría, por ser una persona tan positiva y especial. Siempre dispuesta a apoyar las ideas propuestas, orientándonos durante todo el tiempo en las dificultades presentadas como estudiantes y como personas. Además, por habernos impulsado y motivado a aumentar nuestros logros como investigadores en este largo proceso.

A la Dra. Inés Benedetti por su dedicación y entera disposición como directora de este proyecto de grado.

A la Organización clínica Bonnadona, especialmente al Dr. Ángel Hernández por su gran apoyo al permitirme hacer el presente trabajo de grado en sus instalaciones y suministrar todo lo requerido para el buen desarrollo del mismo.

A mis compañeros de estudio por su buena actitud en los momentos más difíciles de la maestría.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CSC** (cancer Stem cells) células madre del cáncer

**EMT** transición epitelial mesenquimal

**ER** Receptor de Estrógenos

**IA** Inhibidores de aromatasa

**MET** transición mesenquimática a epitelial

**PR** Receptor de progesterona

**RLX** Clorhidrato de raloxifeno

**SERD** Reductores selectivos de receptor de estrógenos

**SERM** Moduladores selectivos del receptor de estrógenos

**TMX** Tamoxifeno

## **LISTA DE TABLAS**

- Tabla 1. Sistema de estadificación de la AJCC (American Joint Committee on Cancer)
- Tabla 2. Subtipos de Cáncer de Mama determinados por perfiles de expresión génica
- Tabla 3. Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST versión 1.1)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la mama femenina

Figura 2. Incidencia de cáncer ambos sexos 2018.

Figura 3. Incidencia de cáncer en mujeres 2018.

Figura 4. Estadificación del cáncer de mama, tamaño del tumor primario (T1, T2.T3).

Figura 5. Estadificación del cáncer de mama, tamaño del tumor primario (T4).

Figura 6. Estadificación del cáncer de mama, afectación de ganglios linfáticos regionales

Figura 7.. Estructuras de la proteína ER $\alpha$  y ER $\beta$  con dominios funcionales

Figura 8. Señalización nuclear y extra nuclear del receptor de estrógenos

Figura 9. Esquema del proceso de carcinogénesis en cáncer de mama

Figura 10. Visión general de la transición del epitelio al mesénquima.

Figura 11. Señalización transmembrana por TGF- $\beta$ .

Figura 12. Diagramas esquemáticos que describen las diversas funciones de SLUG en células epiteliales mamarias

Figura 13. Funciones oncogénicas del factor de transcripción inductor de EMT ZEB1.

Figura 14. Estructuras químicas de los metabolitos del tamoxifeno en este estudio, sus vías de metabolismo y las enzimas metabolizadoras del citocromo P450.

Figura 15. Diagrama estructural / funcional del producto de la proteína ESR1 ER $\alpha$

## TABLA DE CONTENIDO

1. FICHA BÁSICA DE IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	4
DESCRIPCION DE LA PROPUESTA .....	5
2. RESUMEN DEL PROYECTO .....	6
3. DESCRIPCION DEL PROYECTO .....	6
3. 1. Planteamiento del problema .....	6
3. 2. Justificación .....	9
3. 3. Marco teórico .....	10
3. 3. 1. Marco conceptual.....	10
3. 3. 2. Estado del arte o antecedentes .....	37
3. 4. Objetivos.....	40
3. 4. 1. Objetivo general .....	40
3. 4. 2. Objetivos específicos .....	40
3. 5. Metodología propuesta .....	41
3. 5. 1. Diseño de investigación .....	41
3. 5. 2. Población .....	42
3. 5. 3. Muestra y muestreo.....	43
3. 5. 4. Operacionalización de variables.....	43
3. 5. 5. Obtención de la información.....	43
3. 5. 6. Análisis estadístico.....	45
3. 5. 7. Aspectos éticos .....	46
3. 6. Cronograma de actividades .....	46
3. 7. Resultados/Productos esperados y potenciales beneficiarios.....	47
BIBLIOGRAFÍA .....	48
4. PRESUPUESTO .....	53
Formato de resumen de hoja de vida de los integrantes del proyecto .....	55

# 1. FICHA BÁSICA DE IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO

**Título:** ASOCIACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE LOS GENES *SLUG* Y *ZEB1* EN TEJIDO TUMORAL CON CANCER DE MAMA Y RESISTENCIA A TERAPIA HORMONAL, EN PACIENTES DE UNA CLÍNICA ONCOLÓGICA DEL CARIBE COLOMBIANO

Investigador Principal: BELKIS PALACIO VILLALBA

Correo electrónico: belkispalacio@hotmail.com

Dirección de correspondencia: Cra 53 N 90-165 apto 304

Teléfono: 3007838

C.C 32.751.079

Celular: 3004523797

<b>Nombre de los Grupos de Investigación:</b> (registre la información de los grupos que participan)		Total de Investigadores (número)
1. Nombre: Histopatología Facultad/Programa: Medicina	Código GrupLAC <b>COL0061912</b> Reconocido Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	3
2. Nombre: Facultad/Programa:	Código GrupLAC Reconocido Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	
Línea(s) de Investigación:		
<b>Tipo de proyectos de I&amp;D:</b> Investigación Básica: <input checked="" type="checkbox"/> Investigación Aplicada: <input type="checkbox"/> Desarrollo Tecnológico o Experimental: <input type="checkbox"/>		
<b>Es un proyecto de innovación Tecnológica</b> <input type="checkbox"/>	Se refiere a aquellos proyectos que tienen como objetivo el desarrollo de nuevos productos o procesos, así como las modificaciones tecnológicas importantes en productos o procesos	
Tipo de innovación: Innovación tecnológica de producto <input type="checkbox"/> Innovación tecnológica de proceso <input type="checkbox"/> Innovación organizacional <input type="checkbox"/>		
<b>Área Temática en la que participa</b>		
Ciencias de la salud <input checked="" type="checkbox"/>	Ciencias Sociales, Económicas, Humanas y Jurídicas <input type="checkbox"/>	Ciencias básicas e ingenierías <input type="checkbox"/>
a) Medio ambiente y salud humana..... b) Mortalidad infantil y salud materna..... c) Reducción de riesgos, prevención..... y control de enfermedades	a) Desarrollo empresarial y ..... competitividad sectorial b) Cultura ciudadana, identidad ..... y relaciones sociales c) Igualdad, oportunidades sociales ..... y derechos humanos d) Desarrollo humano ..... e) Educación y desarrollo social .....	a) Movilidad urbana..... b) Infraestructura y desarrollo urbano.... c) Sostenibilidad medioambiental..... d) Biodiversidad, potencial innovador y desarrollo productivo ..... e) Biotecnologías ..... f) Desarrollo de Software ..... g) Modelación .....
<b>Grupos beneficiarios: (seleccionar máximo los 5 más importantes)</b>		
Indígenas..... Comunidades negras..... Campesinos..... Mujeres..... X Pequeños y medianos empresarios..... Productores agropecuarios..... Productores industriales..... Comercio..... Empresas en general.....	Niños y jóvenes..... Desplazados..... Enfermos e internos en clínicas..... Prestadores de servicios de salud..... Prestadores de servicios de educativos..... Comunidad Académica.....X Estado..... Otros..... Cuáles .....	
<b>Lugar de Ejecución del Proyecto: (Municipio/Departamento o No territorial)</b>		
<b>Presupuesto</b>		
Valor total del proyecto: \$ <b>28.400.000</b>	Valor solicitado a la \$ Vicerretoría de Investigaciones	
<b>Duración total (meses): 12</b>		



## **DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA**

### **2. RESUMEN DEL PROYECTO**

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más incidente y la principal causa de muerte relacionada por cáncer en mujeres alrededor del mundo. En Colombia el cáncer es un problema de salud pública en aumento, que representa grandes repercusiones psicoafectivas, sociales y económicas imponiendo un reto para el sistema de salud. El CM es una enfermedad heterogénea a nivel histológico y molecular, lo que se ve reflejado a nivel celular con la identificación de una pequeña subpoblación de células con características de células madre, las células madre cancerosas (CSC). Estas células madre del cáncer se relacionan con mayor expresión de los factores de transcripción ZEB1 y SLUG reguladores de la inducción de transición epitelial-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés). La EMT es un proceso fenotípico que convierte las células epiteliales polarizadas y adyacentes en células mesenquimales que confieren propiedades móviles y migratorias. La formación de adherencias estrechas entre las células depende principalmente del sistema E-cadherina, y un sello distintivo de la EMT es la regulación a la baja de esta proteína. De manera similar, se ha demostrado que los marcadores de EMT: E-cadherina y mTOR desempeñan un papel en la progresión tumoral y el potencial metastásico del cáncer de mama, y que esta neoplasia también se asocia con aumento de la actividad de la vía de señalización Wnt, que a su vez se relaciona con la EMT.

La terapia hormonal, es el tratamiento indicado para pacientes con cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés), el cual impulsa el crecimiento de la mayoría de los cánceres de mama luminales y esta expresado en aproximadamente 70% de los casos. Aunque el bloqueo de ER con fármacos como el tamoxifeno y/o los inhibidores de la aromatasa (AI) es muy efectivo, una limitación clínica importante es el desarrollo de resistencia a la terapia endocrina, especialmente en el contexto de la enfermedad metastásica. El desarrollo de resistencia a terapia hormonal está asociado con incremento en el contenido de células madre cancerosas y

EMT. La resistencia intrínseca o adquirida a la terapia antiestrógeno presenta un desafío importante y se cree que la resistencia a los antiestrógenos es causada principalmente por alteraciones en la expresión y función de ER- $\alpha$ , por lo tanto, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la actividad de ER- $\alpha$  puede revelar nuevos objetivos moleculares que podrían explotarse para tratar y erradicar más eficazmente los cánceres de seno. Los factores de transcripción ZEB1 y SLUG están asociados con la deficiencia de ER- $\alpha$  en células de cáncer de mama y, por lo tanto, confiere resistencia antiestrógeno. Recientemente, se han postulado mutaciones activadoras de *ESR1* como mecanismos potenciales clave que subyacen al fracaso de las terapias endocrinas, estas mutaciones adquiridas se han encontrado en el dominio de unión a ligando (LBD) del ER $\alpha$ .

El objetivo general de este estudio es la determinación de la expresión de los genes *slug* y *zeb1* en tejido tumoral mamario y su potencial implicación en la resistencia farmacológica a la terapia hormonal, para lo cual se realizarán tinciones inmunohistoquímicas en el tejido de tumores primarios buscando la expresión de las proteínas SLUG y ZEB1. Posteriormente se comparará la expresión de los genes entre los casos que presentaron progresión de su enfermedad y los que respondieron a la terapia endocrina. De acuerdo con estudios realizados por diferentes autores se espera que la expresión de las proteínas SLUG y ZEB1 se encuentren alteradas en los tumores resistentes a terapia hormonal, lo cual podría traducirse en objetivos potenciales para el desarrollo de nuevas estrategias para tratar el cáncer de mama resistente a este tratamiento.

### **3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

#### **3.1. Planteamiento del problema**

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en las mujeres de los países occidentales (1). Igualmente, es el tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de las Américas, con 462.000 casos nuevos y casi 100.000 muertes por su causa. Según el reporte del año 2018 de Globocan, en

Colombia, el cáncer de mama fue el de más alta incidencia en la población general con 13.380 casos, correspondiente al 13,1% de todos los cánceres entre hombres y mujeres de todas las edades, seguido del de próstata y fue el de mayor incidencia en mujeres (2).

Los tumores están compuestos por una población heterogénea de células entre las cuales se encuentran las células madre cancerosas (CSC). En los tumores de mama, esta pequeña población de células que muestran propiedades de células madre se conoce como CSC de mama. Esta población de células posee una mayor tolerabilidad a la quimioterapia, la terapia hormonal y la radioterapia y es capaz de reproducir la mayor parte del tumor después de la reducción de las poblaciones celulares sensibles a la terapia de primera línea que conduce a la recaída de la enfermedad (3). Aproximadamente un 70% de los cánceres de mama expresan receptor de estrógenos (RE) que sensibiliza a las células tumorales a la acción de esta hormona (4), por lo cual, la terapia endocrina (TE) es la opción preferida para el tratamiento de este tipo de tumores RE-positivo. Las opciones actuales de esta terapia incluyen moduladores selectivos del RE (SERM, por su sigla en inglés), inhibidores de la aromatasa (IA), y reguladores negativos de la expresión del RE (SERD, por su sigla en inglés), como el Fulvestrant (5). La expresión del RE determina si una paciente con cáncer de mama recibe TE terapia endocrina, pero no garantiza la respuesta a la misma, pues los factores moleculares que definen dicha respuesta en pacientes con cáncer de mama positivo para ER siguen siendo poco conocidos (6).

A pesar del gran arsenal terapéutico para el manejo del cáncer de mama RE-positivo, entre los cuales destaca la terapia hormonal, la resistencia a este grupo de medicamentos continúa siendo un desafío clínico importante, ya que alrededor del 20% de las pacientes que presentan enfermedad temprana desarrollarán resistencia, manifestada como recurrencia durante o después de los tratamientos endocrinos adyuvantes (7), el poder predecir la respuesta a la terapia farmacológica sería de gran utilidad. Actualmente se cuenta con pruebas de pronóstico multigénicas que

proporcionan información complementaria útil sobre el tamaño y el grado del tumor en los cánceres de mama positivos para el receptor de estrógenos (8). Sin embargo, a pesar de la existencia de estas pruebas multigenes, es necesario buscar biomarcadores que ofrezcan mayor capacidad de predicción del comportamiento evolutivo y de la respuesta terapéutica.

Se ha postulado que el desarrollo de resistencia a terapia hormonal está asociado con un incremento en el contenido de células madre cancerosas, las cuales expresan niveles elevados de SLUG y ZEB-1 relacionados con la regulación de la transición epitelial-mesenquimal (EMT por su sigla en inglés) (9). La EMT es un proceso biológico caracterizado por la conversión de un fenotipo de células epiteliales a un fenotipo mesenquimatoso, que está estrechamente relacionado con mayor movilidad celular e invasión. ZEB-1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia humana ZEB, y facilita la EMT al suprimir la molécula de adhesión celular E-cadherina, proteína transmembrana crítica para mantener el fenotipo epitelial, vía regulatoria específica que se establece como un sello distintivo de EMT (10). SLUG es un miembro de la familia de represores transcripcionales en dedos de zinc SNAIL, que desempeña un papel crucial en la organogénesis y la neuralización. SLUG está relacionado con la progresión tumoral y la invasividad por su capacidad para alterar la expresión de E-cadherina y vimentina. (11). SLUG es un regulador de la dinámica del estado celular del epitelio mamario ya que reprime la transcripción de los genes del linaje luminal y mantiene las células en un estado basal / progenitor (12).

Teniendo en cuenta que el desarrollo de resistencia a terapia hormonal en cáncer de mama ha sido asociado con un incremento en el contenido de células madre cancerosas que expresan niveles elevados de SLUG y ZEB-1 y que estas proteínas están relacionados con la regulación de la transición epitelial-mesenquimal, se establece la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la asociación entre el perfil de expresión los genes *Slug* y *Zeb1* en tejido tumoral, y la evolución clínica representada por el desarrollo de resistencia a la terapia hormonal, en pacientes con cáncer de mama?.

### 3. 2. Justificación

El cáncer de mama ha aumentado de forma significativa en los últimos 30 años haciéndolo el más\_incidente y la principal causa de muerte relacionada por cáncer en mujeres alrededor del mundo (13). En las mujeres de América Latina y el Caribe, el cáncer de mama supone el 27% de los nuevos casos y el 16% de las muertes por cáncer (2). Según el reporte 2018 de Globocan, en Colombia, el cáncer de mama fue el de más alta incidencia en la población general (2). A pesar de que hoy día se cuenta con un gran arsenal terapéutico para su manejo, entre los cuales destaca la terapia hormonal que se instaura a las pacientes con receptores hormonales positivos, la resistencia a este grupo de medicamentos presenta un desafío clínico importante en la terapia endocrina para el cáncer de mama sensible a las hormonas. Los mecanismos subyacentes que contribuyen a la resistencia a la terapia hormonal no se entienden completamente. Identificar biomarcadores que ofrezcan mayor precisión diagnóstica del comportamiento evolutivo y en la predicción de la respuesta terapéutica ayudaría a establecer una terapia individualizada buscando disminuir recaídas y muertes por esta patología.

Una comprensión completa del proceso de diseminación de células cancerosas sistémicas es fundamental para desarrollar terapias de próxima generación. Gran cantidad de datos experimentales apuntan hacia un papel central del proceso de EMT en la cascada de múltiples pasos de la formación de metástasis (14). Dentro de este proceso, se ha descrito que la amplificación y sobreexpresión de las proteínas SLUG y ZEB1 en el carcinoma de mama están asociadas a un curso clínico adverso, a menor tiempo de supervivencia libre de enfermedad y de supervivencia total, y aumento del riesgo de recurrencia y reducción de las expectativas de vida (10) (15). Se ha postulado que el desarrollo de resistencia a terapia hormonal está asociado con un incremento en el contenido de células madre cancerosas, las cuales expresan niveles elevados de SLUG y ZEB1 en asociación con regulación de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) ganando propiedades de migración e invasión (8). Este estudio busca determinar la expresión de los genes *Slug* y *Zeb1* en tejido tumoral primario y si esta

expresión se asocia con el desarrollo de resistencia al tratamiento hormonal, lo cual podría permitir identificar posibles biomarcadores de predicción de respuesta a la terapia hormonal en pacientes con cáncer de mama.

### 3. 3. Marco teórico

#### 3. 3. 1. Marco conceptual

##### Cáncer de mama

##### Anatomía de la mama

La mama está formada por 10 o 20 secciones llamados lóbulos. Cada lóbulo está dividido en secciones más pequeñas llamadas lobulillos. Los lobulillos contienen las glándulas encargadas de producir la leche durante la lactancia. La leche fluye del lobulillo al pezón por unos tubos llamados ductos. El espacio entre los lobulillos y los ductos está lleno de grasa y tejido fibroso. El drenaje linfático de las mamas se produce fundamentalmente a los ganglios linfáticos axilares (16).



Figura 1. Anatomía de la mama femenina. Tomado del NIH

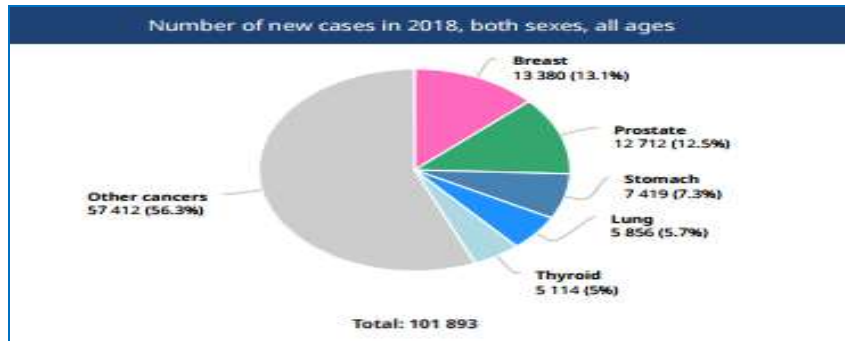
##### Definición del cáncer de mama

El cáncer de mama consiste en la proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Son células que han aumentado enormemente su capacidad reproductiva. Las células del cáncer de mama pueden diseminarse a través de la sangre o de los vasos linfáticos y llegar a otras partes del cuerpo. Allí pueden adherirse a los tejidos y crecer formando metástasis (16).

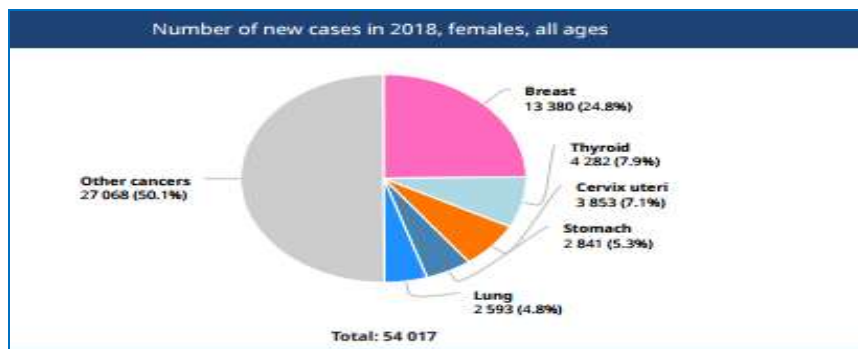
## **Epidemiología**

A nivel mundial, el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuentemente diagnosticada y la causa principal de mortalidad oncológica en mujeres (17). El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres de las Américas. Cada año se producen en la región más de 462.000 casos nuevos y casi 100.000 muertes por cáncer de mama. En las mujeres de América Latina y el Caribe, el cáncer de mama supone el 27% de los nuevos casos y el 16% de las muertes por cáncer. De manera similar, entre las mujeres de Estados Unidos y Canadá, el 24% de los nuevos casos y el 14% de las muertes por cáncer son por cáncer de mama. Se espera que para el 2030 se produzca un aumento del cáncer de mama en las Américas, con unos 572.000 casos nuevos y unas 130.000 muertes. El aumento de nuevos casos y muertes en América Latina y el Caribe será casi el doble que en los Estados Unidos y Canadá (2).

En Colombia según el reporte Globocan 2018, el cáncer de mama fue el de más alta incidencia en la población con 13380 casos, correspondiente al 13,1% de los cánceres entre hombres y mujeres de todas las edades, seguido del de próstata. En las mujeres, el CM fue el de mayor incidencia como lo muestran las figuras 2 y 3 (2). Según información del Registro Poblacional de Cáncer de Barranquilla y el DANE 2008-2012, la incidencia y mortalidad por cáncer en Barranquilla presentan aumentos importantes en los principales tipos de tumores (mama y próstata) con respecto a otras regiones de Colombia, La tasa global de incidencia de cáncer por 100,000 personas /año ajustada por edad fue 116.5 en hombres y 155.4 en mujeres en el quinquenio 2008-2012. Las localizaciones más frecuentes de neoplasias malignas fueron: próstata y pulmón en hombres, y mama y cérvix para mujeres. Las mayores tasas de mortalidad se presentaron por los tumores de mama en mujeres y próstata en hombres (18).



**Figura 2.** Incidencia de cáncer ambos sexos 2018. Fuente The Global Cancer Observatory 2018.



**Figura 3.** Incidencia cáncer en mujeres 2018. Fuente The Global Cancer Observatory 2018

### Factores de riesgo

Se cree que 50% de las mujeres con diagnóstico de cáncer de mama tiene factores de riesgo identificables aparte de la edad y género (mayor frecuencia en mujeres que en hombres y en edades entre los 35 y 75 años). Ciertos factores hormonales y reproductores (como menarquia precoz, menopausia tardía, multiparidad o primer embarazo a término a una edad avanzada) así como estilos de vida, dieta y el ambiente (obesidad en la posmenopausia, consumo de alcohol, falta de actividad física, exposición en edad temprana a radiaciones ionizantes de la pared torácica como en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin) están relacionados con el riesgo. Además de antecedentes familiares o personales de esta neoplasia, los historiales de enfermedad benigna de la mama, como las lesiones proliferativas con o sin atipias, son otro factor predisponente (19).

### Cáncer de mama hereditario



Se estima que entre el 5 y el 10% de todos los CM son hereditarios, es decir, causados por mutaciones de la línea germinal en genes de predisposición al cáncer de alta penetrancia. De estas, las mutaciones más prevalentes están en BRCA1 y BRCA2, genes supresores de tumores que están asociados con el cáncer hereditario de mama y ovario (20). Las estimaciones del riesgo de cáncer asociado con las mutaciones BRCA1 y BRCA2 varían según la población estudiada. Para las mutaciones en BRCA1, el riesgo promedio estimado de cáncer de mama y de ovario oscila entre 57-65% y 20-50%, respectivamente. Para BRCA2, las estimaciones de riesgo promedio oscilan entre 35-57% y 5-23%, respectivamente (21). Además de BRCA1 y BRCA2, las mutaciones hereditarias en otros genes supresores de tumores también aumentan el riesgo de cáncer de seno y otros tumores. Los genes de cáncer de mama hereditarios altamente penetrantes incluyen PTEN (síndrome de Cowden), TP53 (síndrome de Li-Fraumeni), STK11 (síndrome de Peutz-Jeghers) y CDH1 (cáncer gástrico difuso hereditario). Las mutaciones de la línea germinal en el gen CHEK2 están asociadas con un aumento modesto en el riesgo de mama (15-25% de riesgo de por vida) y cáncer colorrectal en el síndrome hereditario de cáncer de mama y colon (HBOC) (20). Se estima que las mutaciones de la línea germinal TP53 son responsables de alrededor del 1% del cáncer de mama hereditario. También parece haber una asociación entre las mutaciones de la línea germinal TP53 y el cáncer de mama positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). El síndrome de Li-Fraumeni se asocia con anomalías en el gen de la proteína tumoral p53 ( TP53 ), ubicado en el cromosoma 17p13.1. TP53 se considera un gen supresor de tumores con influencias en la detención del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN. Es una mutación somática común que se observa en la mayoría de los tipos de cáncer, pero cuando hay una mutación en la línea germinal, esto causa el síndrome de Li-Fraumeni. Cuando hay una mutación de TP53, hay una pérdida de supresión tumoral y una ganancia resultante de la función oncogénica (22).

### **Clasificación anatomopatológica**

Según la afección o no de la membrana basal, se clasifican en no invasivos (in situ) o invasivos. Los tumores no invasivos son el carcinoma intraductal in situ. Los carcinomas

invasivos son aquellos que invaden más allá de la membrana basal y se introduce en el estroma mamario, desde donde puede llegar a invadir los vasos sanguíneos, ganglios linfáticos regionales y a distancia. Entre los principales tipos histológicos de carcinoma de mama se encuentran: Ductal (79%), Lobulillar (10%), Tubular (6%), Mucinoso (2%), Medular (2%), Papilar (1%) y Metaplásico (1%) (23). El carcinoma lobulillar in situ ya no se clasifica como tumor in situ y ahora se considera un factor de riesgo, no un tumor maligno (24).

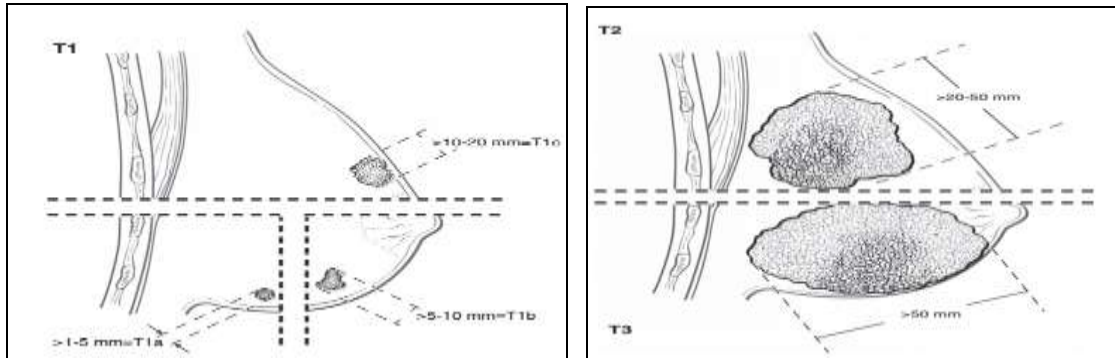
### Estadificación

El sistema de estadificación más utilizado es el TNM de la AJCC (American Joint Committee on Cancer) para el cáncer de mama 8 edición, el cual se basa en el tamaño del tumor (T), si el tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos (N), y si el tumor se ha metastatizado (M) (24).

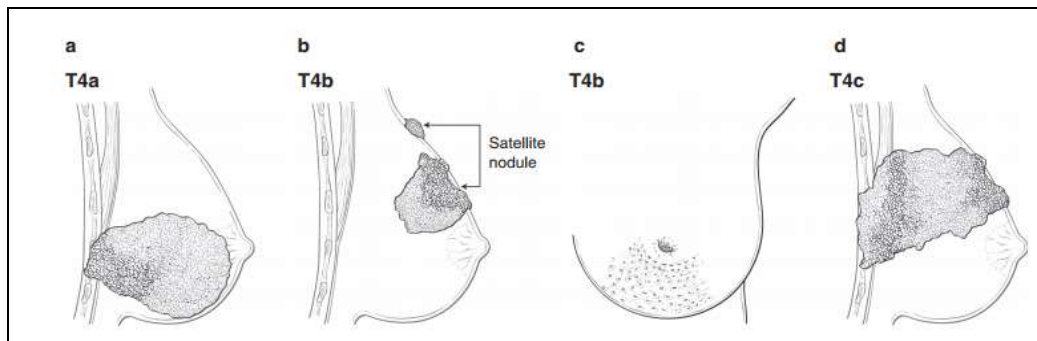
**Tabla 1.** Sistema de estadificación de la AJCC (American Joint Committee on Cancer)

<b>T.</b>	Tamaño del Tumor Primario
<b>Tx</b>	El tumor primario no puede ser determinado
<b>TO</b>	No hay evidencia de tumor primario
<b>T1s</b>	Carcinoma in situ. Enfermedad de Paget sin tumor palpable.
<b>T1.</b>	Tumor = 2cm ·T1a: =0.5 cm ·T1b: >0.5 hasta 1 cm ·T1c: >1 pero no superior a 2 cm
<b>T2.</b>	Tumor > 2 y = 5 cm
<b>T3.</b>	Tumor > 5 cm

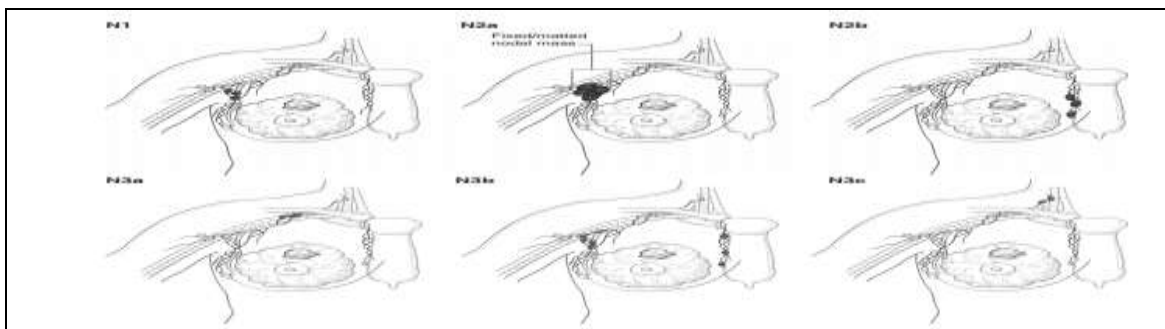
<b>T4.</b>	<p>Tumor de cualquier tamaño con fijación a la pared torácica o a la piel (la pared incluye la costilla, músculo intercostal, músculo serrato anterior, pero no músculo pectoral)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·T4a: extensión a la pared costal</li> <li>·T4b: edema o ulceración de la mama o presencia de nódulos satélites dentro de la mama (piel y/o nódulos dérmicos).</li> <li>·T4c: T4a + T4b</li> <li>·T4d: Carcinoma inflamatorio</li> </ul>
<b>N.</b>	Afectación de ganglios linfáticos regionales.
<b>Nx.</b>	No pueden ser identificados.
<b>N0.</b>	Ausencia de adenopatías
<b>N1.</b>	Adenopatías axilares homolaterales móviles
<b>N2.</b>	<p>Adenopatías axilares homolaterales, fijas entre ellas o a la axila, o en ganglios mamarios internos ipsilaterales sin ganglios axilares clínicamente evidentes</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·N2a: adenopatías axilares homolaterales, fijas entre ellas o a la axila</li> <li>·N2b: metástasis en ganglios mamarios internos ipsilaterales sin ganglios axilares clínicamente evidentes</li> </ul>
<b>N3.</b>	<p>Metástasis en ganglios mamarios internos ipsilaterales o infraclaviculares ipsilaterales con ganglios axilares clínicamente evidentes, o adenopatías supraclaviculares homolaterales con/sin afectación axilar o mamaria interna</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>·N3a: Metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales y ganglios axilares</li> <li>·N3b: Metástasis en ganglios mamarios internos ipsilaterales y ganglios axilares</li> <li>N3c: adenopatías supraclaviculares homolaterales</li> </ul>
<b>M.</b>	Metástasis
<b>Mx.</b>	No se han practicado los estudios para determinar metástasis
<b>MO</b>	Sin evidencia de metástasis
<b>M1</b>	Con evidencia de metástasis



**Figura 4.** Estadificación del cancer de mama, tamaño del tumor primario (T1,T2.T3). Tomado de: Estadificación del carcinoma de mama (AJCC 8th Edition).



**Figura 5.** Estadificación del cancer de mama, tamaño del tumor primario (T4). Tomado de: Estadificación del carcinoma de mama (AJCC 8th Edition).



**Figura 6.** Estadificación del cáncer de mama, afectación de ganglios linfáticos regionales. Tomado de: Estadificación del carcinoma de mama (AJCC 8th Edition)

### Clasificación molecular del cáncer de mama

La clasificación molecular del cáncer de mama tiene un valor pronóstico y predictivo. Se basa en los perfiles de expresión génica obtenidos por microarreglos de ADN, lo que

permite clasificar en subtipos luminal A y B, Her-2 (oncogén del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano) y cánceres de mama de tipo basal (basal-like). Sin embargo, el uso de esta tecnología en la práctica clínica es limitado por su alto costo, por lo que algunos autores han propuesto clasificaciones aproximadas basadas en el perfil IHQ, que es un método confiable y menos costoso y se dividen en las categorías siguientes: receptor estrógeno (RE)/receptor progesterona (RP) positivo como luminal A, RE/RP/Her-2 positivo como luminal B, Her-2 positivo (Her-2 array) y triple negativo (basal-like) (25).

También se ha propuesto que aquellos tumores que solo expresan los receptores hormonales, pero la expresión del marcador de proliferación celular o Ki-67 es mayor que 14 %, se clasifiquen como luminal B (25). Ki-67 es una proteína nuclear del tipo no histona, identificada en 1991 y relacionada con el control de la proliferación celular. Esta proteína tiene 2 isoformas, una larga de 359 kDa y otra corta de 320 kDa; el gen regulador de su actividad se localiza en el cromosoma 10q25. Su vida media es de 60 a 90 minutos y es fosforilada por el sistema serina/treonina. Su localización celular e intensidad de expresión se relaciona a las fases del ciclo celular, pero la mayor intensidad de su expresión se observa durante la mitosis, a nivel citoplasmático. La expresión de la proteína puede ser detectada a través del estudio inmunohistoquímico del tejido fijado y embebido en parafina mediante los anticuerpos MIB-1 y MIB-3; su expresión se reporta como el porcentaje de células tumorales teñidas nuclearmente (26).

Los tumores luminales poseen un patrón inmunofenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Expresan citoqueratinas luminales, receptores de estrógeno y los genes asociados a su activación (LIV1 y CCND1). Habitualmente son de bajo grado histológico y tienen mutación de p53 en menos del 20%. Existen varios subtipos, sin embargo, los más considerados por su frecuencia son el Luminal A y B (25). El carcinoma de tipo luminal A es un subtipo con mejor pronóstico y se caracteriza por expresar el gen del receptor de estrógenos (RE), progesterona (RP) y queratinas de bajo peso molecular (CK7, CK8), similar al epitelio de los ductos mamarios (27). Se ha informado que el cáncer de mama Luminal B tiene una expresión

más baja de los receptores hormonales, una mayor expresión de marcadores de proliferación y un grado histológico más alto que el luminal A. También presenta un peor pronóstico y tiene un perfil distinto de respuesta a la terapia hormonal y la quimioterapia (28).

Los tumores receptor de estrógeno negativo se dividen en: El subtipo basal y el subtipo con sobreexpresión de HER2/neu. El subtipo basal que expresa citoqueratinas de alto peso molecular en sus células mioepiteliales corresponde al 2 a 18% del total de los cánceres de mama. Fue reconocido como triple negativo por ser RE negativo, RP negativo y HER2/neu negativo. Es un subgrupo que expresa genes asociados a células mioepiteliales cuyo inmunofenotipo corresponde a CK5, CK17, c-kit (una tirosina quinasa del epitelio mamario), factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina 1, caveolina y laminina. Los datos clínicos actuales muestran que es el subtipo más agresivo, cuya sobrevida total y libre de enfermedad es baja, debido a que las terapias endocrinas y con trastuzumab son ineficaces en este grupo de tumores. El subtipo con sobreexpresión de HER2/neu, corresponde al 10 a 15% de los cánceres de mama y sobreexpresa genes ubicados en el cromosoma 17q, incluyendo el gen del EGFR-2 (ERBB2) y el growth factor receptor bound protein 7 (GRB7), además sobreexpresa genes de proliferación y expresa escasos genes asociados al fenotipo luminal (25).

Existen biomarcadores específicos que permiten la subclasificación, como las citoqueratinas (Ck) basales (Ck5, Ck6, Ck14, Ck17) que pueden identificar el tumor basal-like (29). El ERBB2 es un proto-oncogen que cuando está sobreexpresado (amplificado), se asocia con caracteres histopatológicos asociados a mal pronóstico: alto grado histológico, baja expresión de RE y RP, además de mala respuesta a terapia. Este subtipo es particularmente resistente a la terapia hormonal, debido a la ausencia de receptores hormonales (30). Actualmente, existe una terapia específica para las pacientes con cáncer de mama Her2 positivo. Son dos los fármacos aprobados por la FDA: trastuzumab (Herceptin), el cual inhibe la formación de los dímeros de Her2 en la membrana celular, los cuales son la forma activada del receptor Her2; y Lapatinib (Tyker), el cual actúa a nivel del dominio tirosina-cinasa del receptor Her2., estos

tratamientos han venido a mejorar el pronóstico y recuperación de las pacientes con cáncer de mama Her2 positivo (31).

**Tabla 2.** Subtipos de Cáncer de Mama determinados por perfiles de expresión génica. Modificada de Schnitt 2009

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
Luminal A	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (-)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subtipo más común y menos agresivo. Buen pronóstico.</li> <li>• Bajo grado histológico. Respuesta hormonal.</li> <li>• Asociado a incremento de edad.</li> </ul>
Luminal B	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Similar al Subtipo Luminal A.</li> <li>• Peor resultado que el Subtipo Luminal A.</li> <li>• Más frecuentemente RE (+)/RP (-).</li> </ul>
Basal	RE (-); RP (-); HER2/neu (-) CK 5/6 (+) y/o EGFR (+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subtipo agresivo.</li> <li>• Alto grado histológico e índice mitótico.</li> <li>• Riesgo en edades menores (&lt;40 años).</li> <li>• Más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas.</li> </ul>
HER2/neu (+); RE (-)	RE (-); RP (-); HER2/neu (+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menos común. Subtipo altamente agresivo.</li> <li>• Alto grado histológico.</li> <li>• Riesgo en mujeres &lt;40 años, mayor que el subtipo luminal.</li> <li>• La etnia afroamericana puede ser un factor de riesgo.</li> <li>• Resultado mejorado por HER2/neu (+).</li> </ul>

### Receptores de estrógeno (ER): ER $\alpha$ y ER $\beta$

La gran mayoría de las actividades de estrógenos están mediadas por el receptor de estrógenos (ER estrogen receptor), un miembro de la familia de factores de transcripción nuclear activados por hormonas (32). El ER está muy involucrado en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. La mayoría de los efectos del 17 $\beta$ -estradiol (E2) están mediados por sus dos receptores nucleares: ER $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y  $\beta$  (ER $\beta$ ), que están codificados por diferentes genes, *ESR1* codifica ER $\alpha$  en el cromosoma 6 y *ESR2* codifica ER $\beta$  en el cromosoma 14, Er $\beta$  (33). El receptor estrogénico  $\alpha$ , el primero en ser descubierto, se expresa más abundantemente en el aparato reproductor de la mujer, en particular en el útero, la vagina y los ovarios, y también en la glándula mamaria, el hipotálamo, células endoteliales y músculo de fibra lisa de vasos. El receptor  $\beta$  se expresa predominantemente en la próstata y los ovarios, y su expresión

es menor en pulmones, encéfalo, huesos y vasos. Muchas células expresan los dos tipos de receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y así se pueden formar homodímeros o heterodímeros (34).

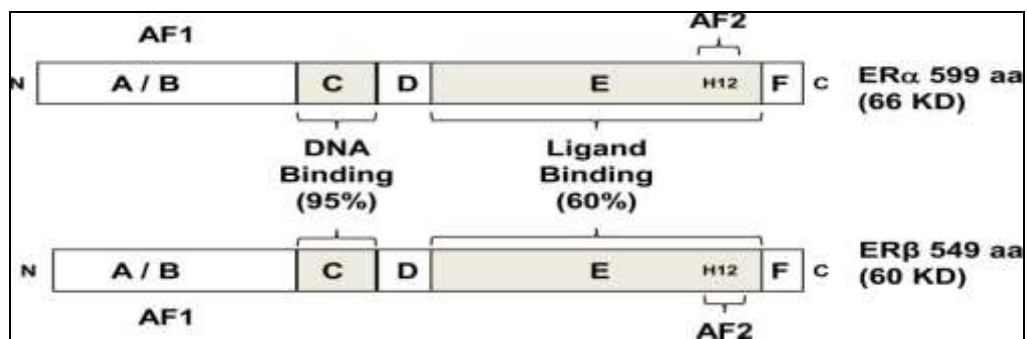
### **Estructura del Receptor de estrógenos**

Ambos receptores están conformados por 5 dominios funcionales: dos activaciones transcripcionales independientes del ligando, dominios N-terminales, NTD (dominios A / B), también llamados dominios del factor de activación 1 (AF1), donde se lleva a cabo la fosforilación mediada por MAPKs, un dominio de unión a ADN, DBD (dominio C), un dominio de unión a proteínas de localización nuclear y choque térmico (dominio D), un dominio de activación transcripcional dependiente de ligando, dominio de unión a ligando, LBD (dominio E), también llamado factor de activación 2 (AF2) ) y un dominio C-terminal (dominio F), que modula la activación transcripcional mediada por los dominios A / B y E. En ausencia de ligandos, los ER se encuentran predominantemente en el núcleo como monómeros asociados con complejos multiproteicos, incluidas las proteínas de choque térmico (HSPs) (33). Los estudios indican que el LBD está compuesto por 11  $\alpha$ -hélices (H1 y H3 a H12) dispuestos en tres capas tipo sándwich de hélices alfa para crear un bolsillo de unión al ligando hidrofóbico cerca del extremo C del receptor. La unión del receptor a un agonista de estrógenos conduce a reordenamiento del LBD de modo que H11 se repositione y H12 gira hacia el núcleo del dominio para que forme una "tapa" sobre el bolsillo de encuadernación. El reposicionamiento de H12 conduce a la formación de una hendidura hidrofóbica, o "caja NR", por las hélices 3, 4 y 5 en la superficie del receptor, que constituye el AF-2, que sirve para reclutar coactivadores y correpresores (32).

Los efectos biológicos de E2 en el epitelio mamario están mediados por el receptor de estrógeno  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Los estudios estructurales y funcionales han demostrado que la unión de ligandos induce un cambio conformacional importante en el dominio LBD de ER $\alpha$ . El reordenamiento estructural crea una nueva interfase de acoplamiento que permite que AF-2 interactúe con numerosas proteínas correguladoras. Los correguladores asociados a AF-2 capaces de mejorar la transactivación del receptor nuclear se denominan coactivadores y se caracterizan por tener uno o más motivos



LXXLL que median su interacción con el dominio LBD de ER $\alpha$ . Los coactivadores ER $\alpha$  incluyen SRC-1, SRC-2 / GRIP1 / TIF2 / NCoA2, SRC3 / RAC3 / p / CIP / ACTR / AIB1, proteína de unión a CREB (CBP) / p300 y factor asociado a CBP (P / CAF). Los coactivadores AF-2 mejoran la transactivación de ER $\alpha$  a través de diferentes mecanismos. Algunos coactivadores, como TRAP / DRIP, mejoran la actividad del receptor nuclear a través de su interacción con los miembros de la maquinaria de transcripción basal. Otros, como SRC-1 y CBP / p300, modifican el estado de condensación de la cromatina a través de su actividad intrínseca de histona acetiltransferasa (35).

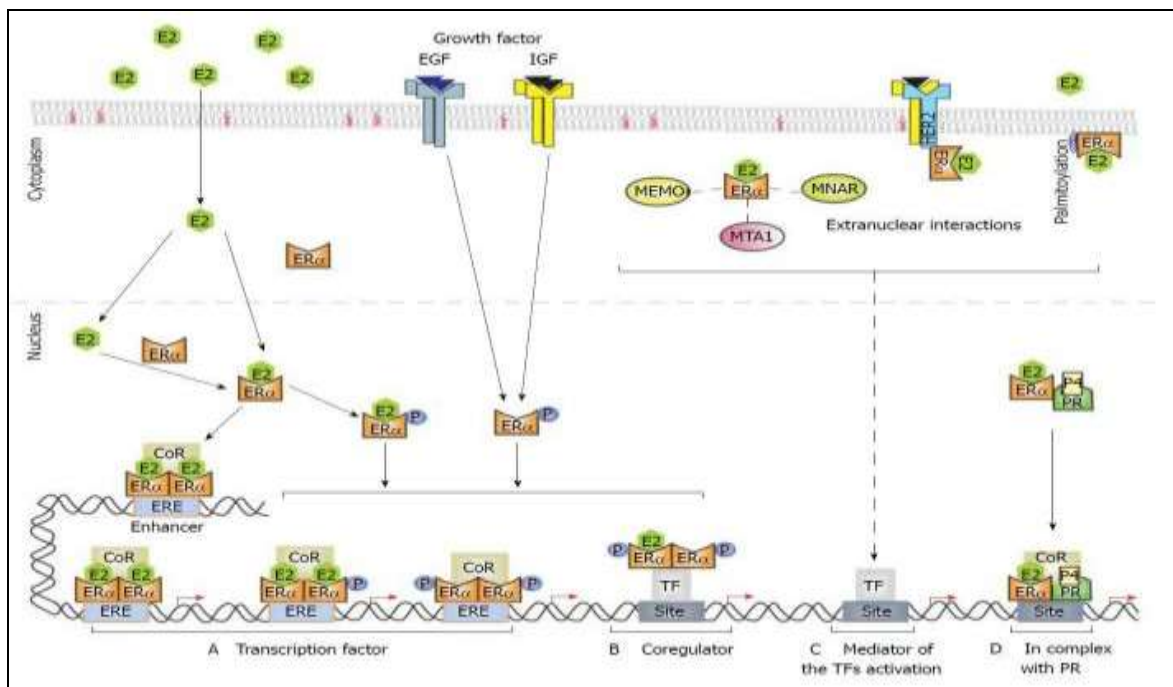


**Figura 7.** Estructuras de la proteína ER $\alpha$  y ER $\beta$  con dominios funcionales. Los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$  comparten una estructura de dominio conservada. El dominio A / B, en el extremo amino (N) de la proteína contiene la función de activación 1 (AF1). El dominio C se une a motivos de ADN llamados elementos sensibles al estrógeno (ERE). El dominio D se denomina región bisagra y contribuye a la especificidad de unión al ADN y la localización nuclear de los RE. El dominio E se denomina dominio de unión a ligando porque interactúa con el estrógeno, a través de una disposición de 11 hélices  $\alpha$  (H1 y H3 a H12). El H12 en esta región del receptor es crítico para mediar la activación transcripcional a través de la función de activación 2 (AF2). En el extremo carboxi (C) está el dominio F. Se muestra el% de homología compartida entre ER $\alpha$  y ER $\beta$  en los dominios C y E. tomado de S C Hewitt and others What's new in estrogen receptor action.

### Señalización del receptor de estrógenos

Muchas funciones nucleares de ER $\alpha$  se desencadenan mediante la unión de E2 al receptor, lo que induce a los homodímeros de ER $\alpha$  a unirse a elementos sensibles al estrógeno (ERE) dentro de las regiones potenciadoras y promotoras de los genes E2-

target. En estos eventos, los factores pioneros exponen secciones de cromatina, facilitando la asociación de ER $\alpha$  con ERE. Además, los correguladores transcripcionales son reclutados por los dominios AF-1 y AF-2 del receptor para la remodelación de la estructura de la cromatina y la promoción de bucles de cromatina que modulan la expresión génica sensible a E2. Además, existe una diafonía entre ER $\alpha$  y otras vías de señalización: ER $\alpha$  actúa como corregulador al interactuar con otros factores de transcripción, como la proteína activadora 1 (AP-1), la proteína de especificidad 1 (Sp1) y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Además, ER $\alpha$  se fosforila y se activa transcripcionalmente en respuesta a factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Recientemente, el receptor de progesterona (PR) se muestra como una proteína de interacción ER que modula y dirige la unión de ER a la cromatina y la expresión de genes específicos en células de cáncer de mama (fig. 8) (4).

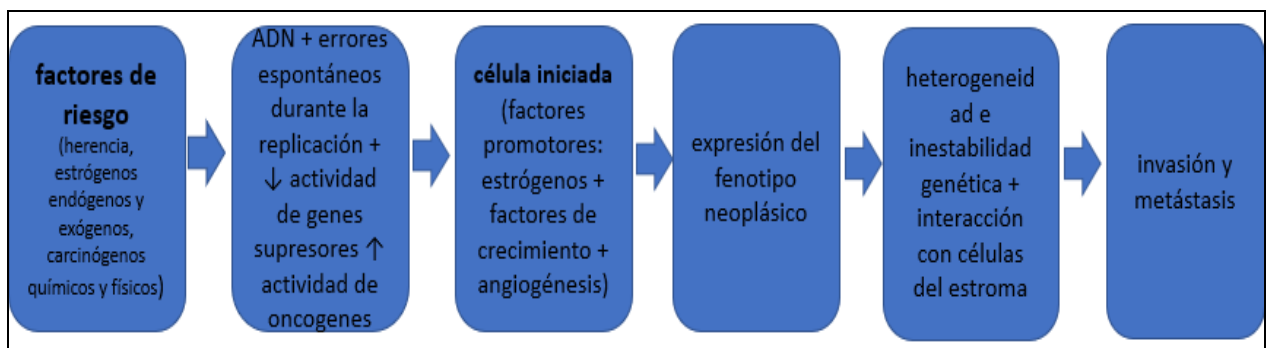


**Figura 8.** Señalización nuclear y extra nuclear del receptor de estrógenos  $\alpha$ . E2 se une a ER $\alpha$  en el citoplasma y / o núcleo. Entonces ER $\alpha$  forma homodímeros que reconocen la secuencia ERE (AGGTCAnnnTGACCT) en potenciadores y promotores diana, reclutando complejos correguladores

(CoR) como los coactivadores para inducir la expresión génica. La fosforilación de ER $\alpha$  puede ser inducida por E2 para modular su actividad como regulador de la transcripción. A y B: los factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento similar a la insulina) también inducen la fosforilación de ER $\alpha$  de manera independiente de E2 para promover la actividad de ER $\alpha$  como factor de transcripción o CoR para algunos factores de transcripción ( es decir , AP-1, Sp1 y NF- $\kappa$ B); C: ER $\alpha$  asociado a la membrana celular ( mediante palmitoilación) asociado con receptores transmembranales ( es decir., HER2) o con proteínas citoplasmáticas como ( es decir , MEMO, MTA1 y MNAR). Estas interacciones extranucleares pueden inducir una señalización dependiente de la quinasa que podría finalizar en la activación de algunos factores de transcripción; D: PR puede asociarse con ER $\alpha$  para coordinar la unión de ER $\alpha$  a la cromatina que modula la expresión de genes específicos.

## Biología molecular del cáncer de mama

El esquema acorde con el proceso de carcinogénesis en CM es el representado en la figura 9.



**Figura 9.** Esquema del proceso de carcinogénesis en cáncer de mama

Las células madre del cáncer (CSC) se consideran una subpoblación de células tumorales que tienen propiedades similares a las de los tallos y la capacidad de sostener la tumorigénesis (36).

## Vías de señalización en cáncer de mama

Dos de las vías de señalización más importantes en el cáncer de mama humano incluyen: la señalización de estradiol (E2) / ER $\alpha$  y la señalización de E-cadherina / SNAIL1 / SLUG, esta última conduce a EMT. La unión de E2 induce un cambio conformacional de activación dentro del ER, promoviendo la dimerización y la unión de

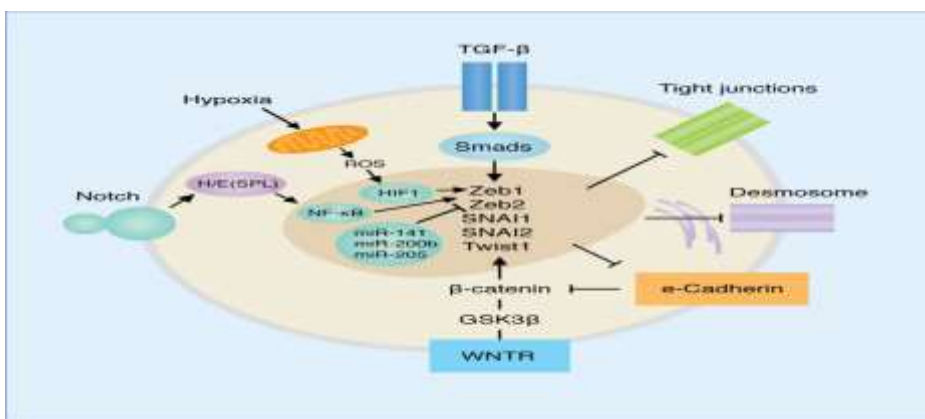
alta afinidad a elementos de respuesta de estrógeno específicos (ERE) ubicados dentro de las regiones reguladoras de los genes diana. La acción del ER $\alpha$  activado por ligando no se limita a los genes con ERE. El ER $\alpha$  activado por ligando puede interactuar de manera indirecta con las regiones reguladoras de los genes diana, que carecen de ERE. En cualquier caso, la activación del ligando de ER $\alpha$  desencadena una serie compleja de activaciones genéticas en la célula de cáncer de mama humana (37).

La vía de señalización Wnt funciona en respuesta a la presencia de  $\beta$ -catenina, y es fundamental en el desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular. Esta vía está alterada en diversos tipos de cáncer. La pérdida de expresión de algunos genes que codifican proteínas de la vía Wnt está relacionada con la estabilización de la proteína  $\beta$ -catenina, con la actividad continua de esta proteína como co-activador transcripcional y con la activación de la proliferación debido a la estimulación constante de la vía. Varios factores de transcripción están implicados en la represión del gen CDH1 como las proteínas de la familia "dedos de zinc" Slug / Snail, F1/ZEB1, SIP-1, y el factor base "hélice-bucle-hélice" E12/E47. La represión transcripcional del gen CDH1 y los subsecuentes cambios morfológicos en las células ocurren durante la transición epitelio mesenquimal en el desarrollo embrionario, cuando las células epiteliales se diferencian y durante la migración de células de la cresta neural del neuroectodermo (38).

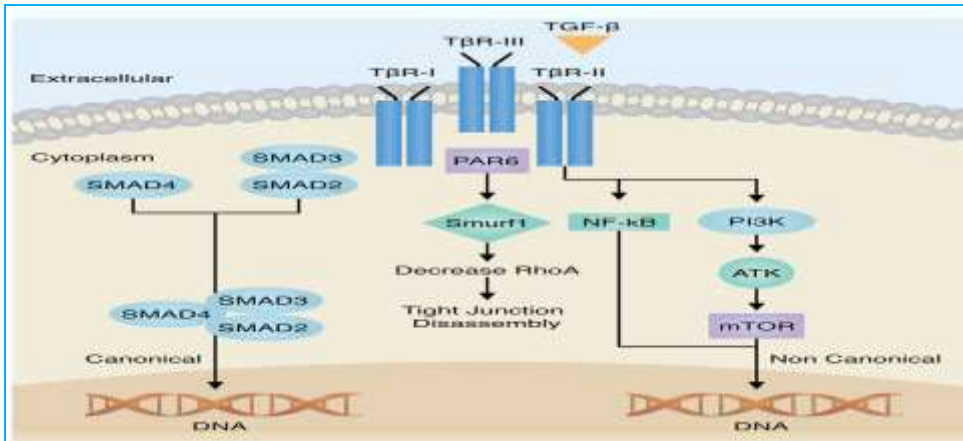
### **Transición epitelial-mesenquimal**

Las células madre cancerosas conducen la cascada metastásica al someterse a una EMT y nuevamente a una transición mesenquimática a epitelial (MET) (39). La EMT es un proceso fenotípico que convierte las células epiteliales polarizadas y adyacentes en células mesenquimales que confieren propiedades móviles y migratorias. Se ha propuesto que las CSC en tumores primarios pueden metastatizarse en tejidos u órganos distantes para diseminarse y formar colonias metastásicas a través de la EMT. Un estudio reciente ha revelado un patrón dinámico in vivo de transiciones epiteliales a mesenquimales en células tumorales circulantes y metástasis del cáncer de mama (40). La evidencia reciente ha demostrado que la inducción de EMT en las células cancerosas no solo produce metástasis, sino que también sirve como un factor principal

que contribuye a la resistencia a los medicamentos. Sin embargo, los mecanismos de resistencia a los medicamentos mediados por EMT siguen sin estar claros (41). El proceso de EMT coincide con la pérdida de marcadores epiteliales, como la E-cadherina y la ocludina, y la adquisición de marcadores mesenquimales, como la N-cadherina y la vimentina. E-cadherina es un represor de la invasión del cáncer y la inducción de la EMT (42). Los reguladores maestros de la EMT incluyen muchas vías, sin embargo, los mediadores principales de la EMT incluyen la señalización a través de TGF- $\beta$ , Notch y Wnt; pero también están influenciados por los efectos del microambiente tumoral, como la hipoxia, así como la expresión diferencial de microARN (miARN) (Figura 10) (43). Común a todas estas vías es la convergencia en los factores transcripcionales SNAI (Snail), Zeb y Twist, cuya expresión diferencial en los cánceres ha demostrado conducir a la EMT. De hecho, tanto la señalización canónica como la no canónica de TGF- $\beta$  (Figura11) conducen a cambios en la expresión génica de los factores de transcripción Snail, Zeb, Twist y Six1. De manera similar, la señalización de Notch actúa sobre NF- $\kappa$ B, induciendo la transcripción de SNAI1, SNAI2 (Slug), Twist y Zeb1 / Zeb2; además de aumentar la producción de citocinas y la supervivencia celular. La vía Wnt, a menudo desregulada en cáncer, conduce a la inducción de la expresión de SNAI1 con la posterior regulación negativa de E-cadherina a través de  $\beta$ -catenina. El estímulo externo, como en el caso de la hipoxia, conduce a cambios en la función mitocondrial, lo que lleva a la estimulación de HIF1, con la posterior expresión de Zeb1 (43).



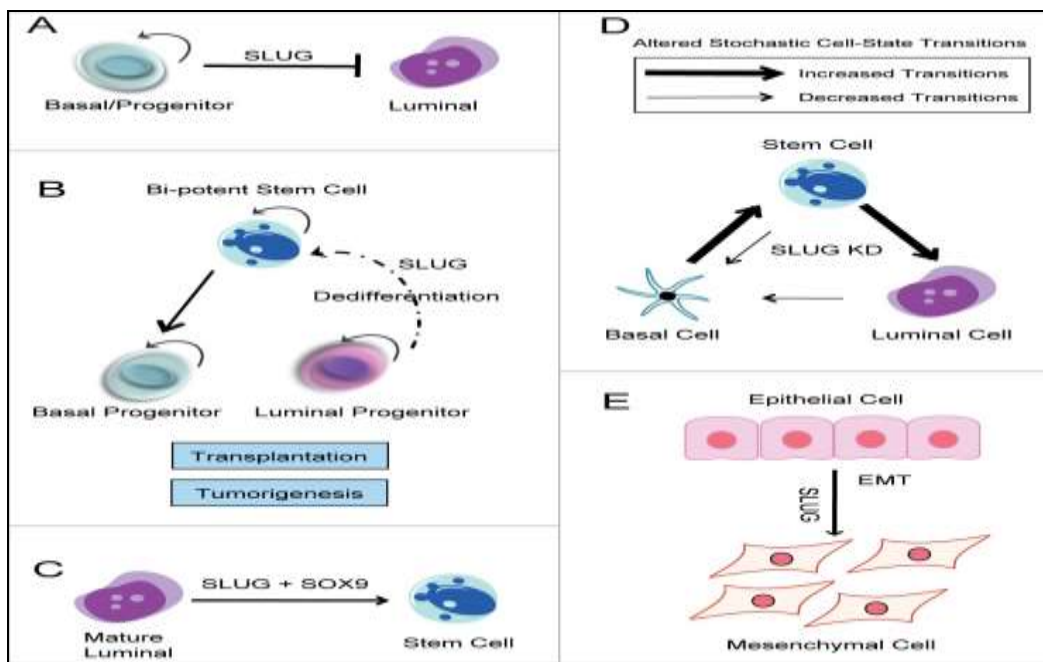
**Figura 10.** Visión general de la transición del epitelio al mesénquima. Se muestran las rutas de señalización seleccionadas. El factor de crecimiento transformante  $\beta$ , Notch, WNT puede inducir EMT a través de múltiples vías. EMT y MET (transición mesenquimatosa a epitelial) se asocian con cambios en el citoesqueleto y la interrupción de uniones estrechas y desmosomas (43).



**Figura 11.** Señalización transmembrana por TGF- $\beta$ . El TGF canónico se une a T $\beta$ R-III, con el reclutamiento de T $\beta$ R-I, lo que resulta en la activación de Smad 3/2 y 4 que se transloca al núcleo para regular los genes de TGF- $\beta$  (izquierda); El TGF no canónico se une a T $\beta$ R-II (o III con la unión posterior de II) a través de la ruta independiente de Smad que incluye Par-6, NF- $\kappa$ B, se muestra PI3K (derecha) (43).

SLUG (SNAI2) es un miembro de la familia SNAIL de represores transcripcionales de dedos de zinc que median interacciones específicas de secuencia con el ADN. Los miembros más altamente estudiados de esta familia incluyen SNAIL (SNAI1) y SLUG, los cuales se conservan entre las especies de vertebrados. Miembros de la familia SNAIL han sido implicados en una variedad de procesos celulares y de desarrollo, muchos de los cuales se relacionan con la motilidad celular y la inducción de la EMT (12). SLUG es un regulador de la dinámica del estado celular del epitelio mamario. Entre las diversas funciones de SLUG en células epiteliales mamarias se destacan: SLUG regula la diferenciación de MEC. Como un represor transcripcional, SLUG reprime la transcripción de los genes del linaje luminal y mantiene las células en un estado basal / progenitor. Durante la regeneración tisular después del trasplante y la iniciación del tumor, la SLUG puede ser necesaria para que las células con restricción

de linaje se dividan en un estado más primitivo, similar al tallo. SLUG coopera con SOX9 para promover el estado de las células madre mamarias. SLUG regula las transiciones estocásticas del estado celular entre las células luminal, basal y madre. Tras la caída de SLUG, hay transiciones disminuidas al estado basal y transiciones incrementadas al estado luminal. SLUG KD también afecta la transición hacia y desde el estado de la célula madre. SLUG promueve el EMT (12).

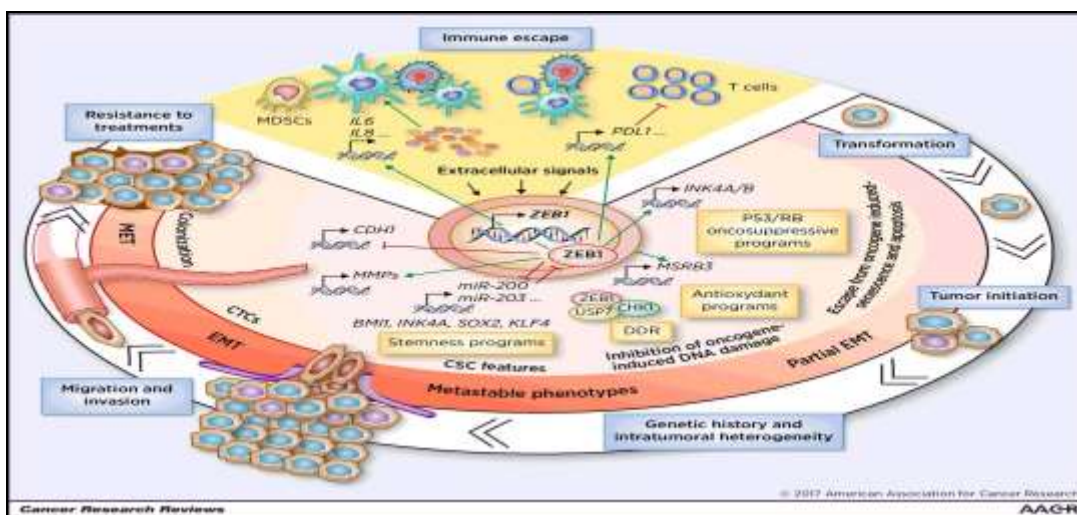


**Figura 12.** SLUG es un regulador de la dinámica del estado celular del epitelio mamario. Diagramas esquemáticos que describen las diversas funciones de SLUG en células epiteliales mamarias. (A) SLUG regula la diferenciación de MEC. Como un represor transcripcional, SLUG reprime la transcripción de los genes del linaje luminal y mantiene las células en un estado basal / progenitor. (B) Durante la regeneración tisular después del trasplante y la iniciación del tumor, la SLUG puede ser necesaria para que las células con restricción de linaje se desdividan en un estado más primitivo, similar al tallo. (C) SLUG coopera con SOX9 para promover el estado de las células madre mamarias. (D) SLUG regula las transiciones estocásticas del estado celular entre las células luminal, basal y madre. Tras la caída de SLUG, hay transiciones disminuidas al estado basal y transiciones incrementadas al estado luminal. SLUG KD también afecta la transición hacia y desde el estado de la célula madre. (E) SLUG promueve el EMT.



Slug y Sox9, actúan de forma cooperativa para determinar el estado de la célula madre mamaria (MaSC). La inhibición de Slug o Sox9 bloquea la actividad de MaSC en células epiteliales mamarias primarias. A la inversa, la coexpresión transitoria de Slug y Sox9 exógenos es suficiente para convertir células luminales diferenciadas en MaSC con capacidad de reconstitución de la glándula mamaria a largo plazo. Slug y Sox9 inducen MaSC activando distintos programas de expresión de genes autorreguladores (44).

La proteína de unión a la caja E del dedo de zinc 1 ( ZEB 1) y ZEB 2 inducen la transición epitelial-mesenquimatosa ( EMT ) y mejoran la progresión del cáncer. Sin embargo, la visión global de la regulación transcripcional por ZEB 1 y ZEB 2 aún no se ha dilucidado (45). ZEB1 y ZEB2 son capaces de inducir el inicio de EMT al unirse a la secuencia de la caja E en el promotor de la E-cadherina, reprimiendo así su expresión (46). Cada vez hay más pruebas de que las funciones de las proteínas ZEB no se limitan a la regulación EMT. De hecho, podrían participar en un interruptor central que controla las funciones y estados celulares críticos, incluida la diferenciación, la proliferación, la respuesta al daño del ADN y la supervivencia celular, con un impacto dramático en el desarrollo del tumor, desde los primeros pasos de la tumorigénesis hasta la progresión del cáncer ( Fig. 13) (47).



**Figura 13:** Funciones oncogénicas del factor de transcripción inductor de EMT ZEB1. El factor de transcripción ZEB1 es un determinante central del destino celular. Regula transcripcionalmente los



factores involucrados en el control de la diferenciación celular, la proliferación, la supervivencia y la motilidad. Su expresión fomenta el proceso tumorigénico desde los primeros pasos, incluida la transformación maligna, y proporciona a las células cancerosas capacidades migratorias e invasivas. En el curso del desarrollo del tumor, ZEB1 tiene un profundo impacto en la plasticidad de las células cancerosas y la heterogeneidad genética y epigenética intratumoral. ZEB1 también promueve un escape del control inmune en el contexto de una intrincada conversación cruzada con las células inmunes y finalmente contribuye a la resistencia a los tratamientos. CTC, células tumorales circulantes; MET, transición mesenquimatososa a epitelial; MDSC.

### **Tratamiento del cáncer de mama**

El tratamiento del cáncer de mama en etapa temprana involucra tres modalidades terapéuticas principales: cirugía, terapia sistémica y radioterapia. Las terapias sistémicas se refieren a la administración de medicamentos que se extienden por todo el cuerpo para tratar las células cancerosas donde sea que se encuentren. Incluyen quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y productos biológicos como los anticuerpos monoclonales. Tradicionalmente, la terapia sistémica se ha administrado después de la cirugía. Los ensayos fundamentales han demostrado que la quimioterapia neoadyuvante (preoperatoria) (NCT) es segura y equivalente a la quimioterapia adyuvante en términos de riesgo de recurrencia y supervivencia general (SG) La terapia endocrina neoadyuvante (NET) es una alternativa atractiva a la NCT para los tumores positivos al receptor de estrógeno (ER), dado que es fácil de administrar y una terapia dirigida bien tolerada (48).

### **Terapia endocrina antiestrogénica**

Los métodos antiestrogénicos para el tratamiento del cáncer de mama positivo a receptor hormonal incluyen el uso de moduladores selectivos del receptor de estrógeno (selective estrogen-receptor modulators, SERM), reductores selectivos de receptor de estrógeno (selective estrogen-receptor downregulators, SERD) e inhibidores de aromatasa (aromatase inhibitors, AI) (49).

### **Moduladores selectivos de receptor de estrógeno (SERM)**

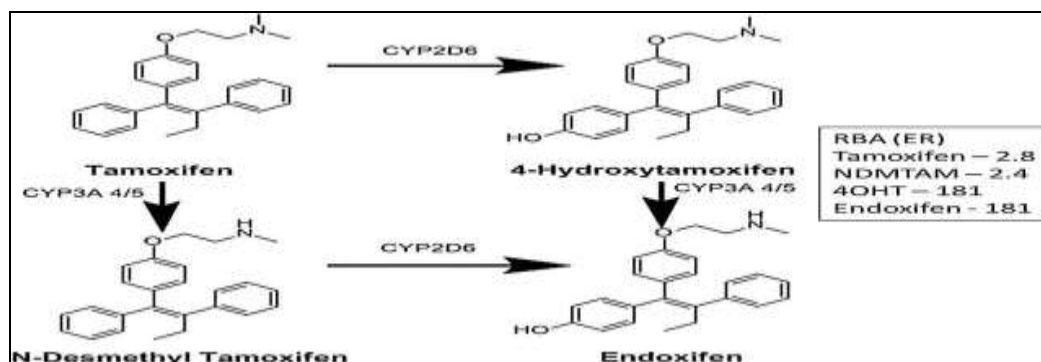
Son agentes que se unen al receptor de estrógeno donde simulan la actividad de los estrógenos en ciertos tejidos, mientras inhiben su acción en otros. Los SERM tienen

una variada actividad: compuestos con actividad totalmente agonista, como la hormona endógena estrógeno; compuestos con actividad agonista en algunos tejidos y antagonista en otros, como el tamoxifeno.

### **Tamoxifeno (TMX)**

El tamoxifeno continúa siendo una terapia hormonal importante para la prevención y el tratamiento del cáncer de mama en todo el mundo. Actualmente es el único agente hormonal aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para la prevención del cáncer de mama premenopáusico y el tratamiento del carcinoma ductal in situ (DCIS). El TMX también se utiliza en el tratamiento adyuvante del cáncer de la mama receptor de estrógenos positivo (ER) resecado quirúrgicamente en la premenopausia y para tratar el cáncer de mama metastásico con ER positivo (50). El TMX es un antiestrógeno débil que se metaboliza ampliamente, y sus metabolitos exhiben una actividad antiestrogénica similar, menor o más potente. Además, el tamoxifeno puede exhibir propiedades antiestrogénicas o proestrogénicas, dependiendo del tejido objetivo y la presencia o ausencia de coactivadores o correpresores. Cuando se administra a mujeres con cáncer de mama con ER positivo durante cinco años después de la cirugía, casi reduce a la mitad la tasa de recurrencia anual y reduce la tasa de mortalidad por cáncer de mama en un tercio tanto en mujeres pre y posmenopáusicas (51). Los primeros hallazgos demostraron que el TMX se activa metabólicamente a 4-hidroxitamoxifeno que tiene un aumento de cien veces en la afinidad por el ER. Sin embargo, la alta afinidad de un ligando por el RE es una ventaja, pero no un requisito para la actividad antiestrogénica. De hecho, los estudios que compararon la actividad antitumoral del tamoxifeno y el 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) in vivo demostraron que el TMX era el agente superior para el desarrollo clínico. El 4-hidroxitamoxifeno se elimina del cuerpo más rápido que el tamoxifeno mientras se acumula el medicamento original tamoxifeno. Sin embargo, la identificación posterior de 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (más tarde llamado endoxifeno) y la demostración de una reducción de la producción de endoxifeno en mujeres que toman inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) (para la reducción de los sofocos),

que bloquean la actividad enzimática del CYP2D6 ( 16) , sugirió que esta importante interacción farmacológica reduce la eficacia del TMX (52).



**Figura 14.** Las estructuras químicas de todos los metabolitos del tamoxifeno en este estudio y sus vías de metabolismo y las enzimas metabolizadoras del citocromo P450 (CYP) con afinidades de unión relativa (RBA) para el receptor de estrógenos (ER). El tamoxifeno se activa metabólicamente a 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) y endoxifeno (N-desmetil-4-hidroxitamoxifeno) por el sistema enzimático CYP2D6. El tamoxifeno también se metaboliza en N-desmetiltamoxifeno (NDMTAM).

Se informa que el TMX, o su metabolito activo 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT), induce la apoptosis de las células de cáncer de mama. Sin embargo, la recurrencia dentro de los 15 años ocurre en un tercio de los pacientes tratados con tamoxifeno durante 5 años. Los mecanismos subyacentes para desarrollar resistencia, especialmente la resistencia adquirida, al tamoxifeno son complejos y numerosos, incluida la activación independiente de ligando de ER $\alpha$  o sus coactivadores a través de la fosforilación, y la inhibición de la apoptosis a través de la activación constitutiva de la señalización de supervivencia. La evidencia clínica muestra que los pacientes con sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y niveles más bajos de ER $\alpha$  tienen más probabilidades de volverse resistentes al tamoxifeno. Los estudios preclínicos implican la contribución de las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento, como EGFR y HER2, a la resistencia al tamoxifeno (53).

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) como el tamoxifeno son antagonistas en la mama y agonistas en los huesos y el endometrio. La

actividad agonista de SERM proviene de la unión del corregulador específico de tejido en presencia de tamoxifeno. Además, se identificaron mutaciones somáticas en el dominio de unión al ligando (LBD) ESR1 (gen para ER $\alpha$ ) en 25-30% de los pacientes que previamente recibieron tratamiento endocrino, Y537S y D538G son las dos mutaciones más prevalentes, y los estudios preclínicos muestran que estas mutaciones confieren actividad transcripcional libre de hormonas y resistencia relativa al tamoxifeno y al tratamiento con fulvestrant (54).

### **Raloxifeno**

El clorhidrato de raloxifeno (RLX) es un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM) de segunda generación que pertenece a la clase de benzotiofeno y tiene efectos agonistas de estrógenos sobre el metabolismo óseo y del colesterol. Por el contrario, tiene efectos antagonistas del estrógeno en las glándulas mamarias y el tejido uterino. Tiene eficacia comprobada en la prevención de la pérdida ósea y el cáncer de seno. RLX fue el primer SERM aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento y la prevención de la osteoporosis posmenopáusica en 1997. También recibió la aprobación de la FDA para reducir el riesgo de cáncer de seno en mujeres posmenopáusicas en 2007 (55).

### **Reductores selectivos de receptor de estrógeno (SERD)**

**Fulvestrant** (nombre comercial Faslodex) .Fulvestrant es un medicamento que actúa por efecto antagonista sobre los receptores de estrógeno y se encuentra indicado para tratar a mujeres en edad postmenopáusica que presenten cáncer de mama en fase avanzada, únicamente en caso de que el tumor tenga receptores hormonales positivos y la enfermedad no responda a otros medicamentos bloqueantes de estrógenos, como el tamoxifeno (54). Fulvestrant es un degradador selectivo del receptor de estrógeno que bloquea la dimerización del receptor de estrógeno y la unión al ADN, aumenta la renovación del receptor de estrógeno e inhibe la captación nuclear del receptor (56).

## **Inhibidores de aromatasa (AI)**

Los AI bloquean la enzima aromatasa, que normalmente convierte los andrógenos naturales en compuestos estrogénicos, principalmente en los tejidos periféricos. Su uso finalmente conduce a un estrógeno menos disponible para estimular el crecimiento de células de cáncer de mama positivo para HR (57). En el tratamiento hormonal adyuvante de pacientes con cáncer de mama posmenopáusico, la mayoría de los ensayos han demostrado la superioridad de los inhibidores de aromatasa sobre el tamoxifeno (58). El exemestano es un IA esterooidal que se une irreversiblemente a la aromatasa, mientras que los IA no esteroideos, como el anastrozol y el letrozol, han demostrado unirse reversiblemente a la enzima. (59). El letrozol es un inhibidor más potente de la aromatasa que el anastrozol en sus dosis convencionales, y conduce a una inhibición más completa de la aromatasa de todo el cuerpo (54). A pesar de los datos *in vitro* y farmacodinámicos que indican una mayor potencia de la inhibición de la aromatasa con letrozol, ningún dato clínicamente significativo ha demostrado una superioridad de los resultados en las comparaciones de letrozol con los otros AI (57).

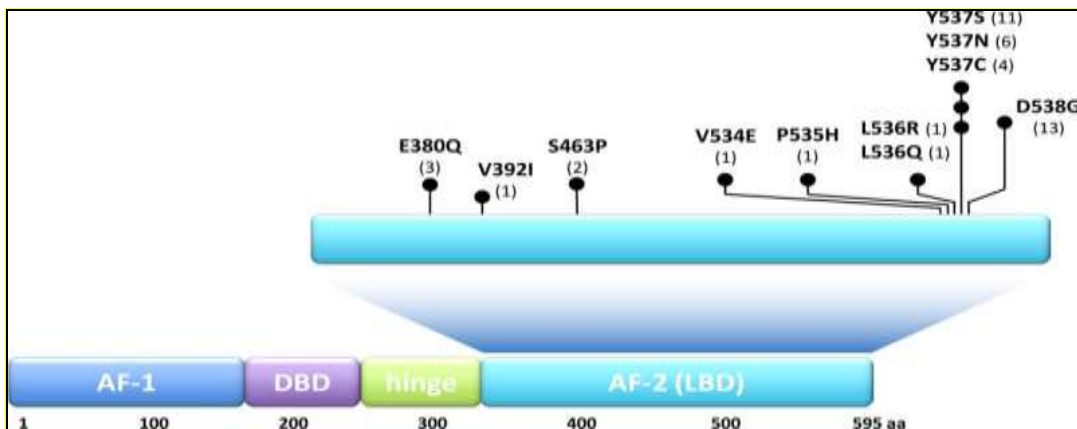
## **Mecanismos de resistencia a la terapia endocrina**

Los mecanismos de resistencia a los medicamentos incluyen muchos factores, incluida la disminución de la concentración de fármaco intracelular que podría resultar del aumento de la salida del fármaco a través de los transportadores de casete de unión a ATP (ABC) como la glicoproteína MDR-1 / P. Además, la disminución de la conversión del fármaco en una forma activa, y la cantidad alterada del fármaco objetivo o el tipo de objetivo alterado podrían influir en la resistencia. La EMT podría conducir a un aumento en la motilidad, capacidades metastásicas invasivas de las células cancerosas (60). Otras posibles causas de la resistencia intrínseca y adquirida a la terapia endocrina incluyen las propiedades farmacológicas de los tratamientos antiestrógenos, las alteraciones en la expresión y la función de ER- $\alpha$ , las interacciones de los tumores con el microambiente local y las alteraciones genéticas de las células tumorales (61). Aunque la expresión reducida de ER- $\alpha$  es un factor contribuyente conocido a la resistencia endocrina, el mecanismo de regulación negativa de ER- $\alpha$  en la resistencia

endocrina todavía no se comprende completamente. El estudio de Li et al , encontró que Slug se sobreexpresa en los cánceres de mama y próstata de alto grado. También evidenció la función de novo de Slug, donde se une directamente a las cajas E de la región promotora de ER $\alpha$  y disminuye la síntesis de ER $\alpha$ . Además, Slug contribuye a la resistencia a los medicamentos y al fenotipo EMT en las líneas celulares de cáncer de mama. (60) ZEB1 está asociado con la deficiencia de ER-  $\alpha$  en células de cáncer de mama y, por lo tanto, confiere resistencia antiestrógeno. Mecánicamente, ZEB1 reprime la transcripción de ER-  $\alpha$  formando un complejo ZEB1 / DNA metiltransferasa (DNMT) 3B / histona desacetilasa (HDAC) 1 en el promotor ER-  $\alpha$  , lo que lleva a la hipermetilación del ADN y al silenciamiento de ER-  $\alpha$ . Por lo tanto, el ZEB1 ectópico regula negativamente la expresión de ER-  $\alpha$  y posteriormente atenúa la inhibición del crecimiento celular por los antiestrógenos, tales como tamoxifeno y fulvestrant. En particular, el agotamiento de ZEB1 por la interferencia de ARN provoca la desmetilación del promotor ER-  $\alpha$ , restaura la expresión de ER-  $\alpha$  y aumenta la capacidad de respuesta de las células de cáncer de mama al tratamiento antiestrógeno. Al estudiar especímenes de una gran cohorte de sujetos con cáncer de mama, encontramos una fuerte correlación inversa entre la expresión de la proteína ZEB1 y ER-  $\alpha$  (61).

Recientemente, se han postulado mutaciones activadoras de ESR1 como los mecanismos potenciales clave que subyacen al fracaso de las terapias endocrinas. Las mutaciones ESR1 se identificaron por primera vez en estudios de xenoinjerto de pacientes informados hace casi dos décadas y los estudios de secuenciación de próxima generación (NGS) revelaron que las mutaciones puntuales ESR1 en un punto caliente confinado a Tyr537 y Asp538 actúan como un impulsor de la resistencia a la terapia endocrina. En particular, las cuatro mutaciones representativas del "punto caliente" del dominio de unión al ligando ESR1 (LBD), ESR1 Y537S, Y537N, Y537C y D538G, que cubren más del 80% de las mutaciones de ESR1 asociadas con la resistencia adquirida al tratamiento antiestrógeno (62). Los esfuerzos de secuenciación de próxima generación (NGS) a gran escala en los tejidos cáncer de mama metastásicos revelaron que estas mutaciones están enriquecidas en pacientes con cáncer de mama metastásicos tratados con agentes endocrinos, mientras que estas

variantes no están presentes o solo a frecuencias muy bajas en el tejido tumoral primario. Es importante destacar que esto implica que su presencia debe evaluarse en lesiones metastásicas o en "biopsias líquidas", como el ADN circulante libre de células (ADNc) como representante de las células tumorales metastásicas (63). Varios estudios paralelos recientes revelaron mutaciones recurrentes de ESR 1 de ganancia de función en hasta el 20% de los pacientes con enfermedad ER + metastásica que recibieron terapias endocrinas, que en muchos casos incluyeron un inhibidor de aromatasa. Estas mutaciones, agrupadas en un punto de acceso dentro del dominio de unión al ligando (LBD), conducen a una actividad ER independiente del ligando y al crecimiento tumoral, resistencia parcial al tamoxifeno y fulvestrant, y una capacidad metastásica potencialmente incrementada. (7). Las mutaciones en el ADN tumoral circulante plasmático basal de ensayos clínicos completados sugieren que estas mutaciones son pronósticas y predicen la resistencia a los inhibidores de la aromatasa en la enfermedad metastásica. Actualmente, nos faltan estudios prospectivos para confirmar estos resultados y determinar las combinaciones de tratamiento óptimas para pacientes con mutaciones ESR1 (64).



**Figura 15.** Diagrama estructural / funcional del producto de la proteína ESR1 ER $\alpha$  con la posición y el número de casos de mutaciones puntuales del dominio de unión al ligando (LBD) ESR1 informadas en los cánceres de mama ER + metastásicos. Los círculos negros indican cada mutación en la posición específica de la proteína; los números entre paréntesis indican el número total de muestras que se informa que albergan las mutaciones específicas indicadas. Abreviaturas: AF-1, función de activación-1;

DBD, dominio de unión a ADN; AF-2, función de activación-2 (tomado de Jeselsohn R. et al. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer).

### Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST)

Para evitar continuar el tratamiento contra el cáncer sin eficacia, la evaluación precisa de la respuesta terapéutica es esencial. Los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) (Tabla 3) son los criterios más utilizados para evaluar la respuesta tumoral (65), se desarrollaron y publicaron en el año 2000 con en base en las directrices originales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicadas por primera vez en 1981. En el 2009 se realizaron revisiones (RECIST versión 1.1), que incorporaron cambios importantes, incluida una reducción en el número de lesiones a evaluar, un nuevo método de medición para clasificar los ganglios linfáticos como patológicos o normales, la aclaración del requisito para confirmar una respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR), y nuevas recomendaciones para la evaluación de la progresión de la enfermedad (66).

**Tabla 3.** Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST versión 1.1)

<b>RECIST 1.1</b>	
RESPUESTA	DEFINICIÓN RECIST 1.1
<b>Evaluación de lesiones diana</b>	
RC	Desaparición de todas las lesiones diana o adenopatías de menos de 10 mm de eje corto
RP	Disminución de al menos el 30% en la suma de los diámetros mayores de las lesiones diana con respecto a la obtenida en el estudio basal
PE	Aumento de al menos el 20% en la suma de los diámetros de las lesiones diana tomando como referencia la menor suma obtenida durante el seguimiento (incluido el estudio basal si ésta es la menor) La suma de los diámetros debe haber aumentado en al menos 5 mm Aparición de una o más lesiones nuevas
EE	No cumple ninguno de los criterios anteriores
<b>Evaluación de lesiones no diana</b>	
RC	Desaparición de lesiones no diana y normalización de los marcadores tumorales
PE	Progresión inequívoca de las lesiones no diana existentes
No-RC / No-PE	Persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento de los marcadores tumorales por encima del límite alto de la normalidad



### 3. 3. 2. Estado del arte

En el cáncer de mama, la transición epitelial a mesenquimatosa (EMT) se ha asociado en con la potencia del tumor, la metástasis y la resistencia al tratamiento. Como ya se mencionó, la EMT se ejecuta en respuesta a factores de señalización pleiotrópicos que inducen la expresión de factores específicos de transcripción (como, SNAIL, ZEB, TWIST, y otros). Numerosos estudios se han realizado en busca de la asociación de estos factores de transcripción en la resistencia a terapia en cáncer.

Ang L. et al. investigaron la expresión de BCL6, homeobox de unión a E-box de dedo de zinc (ZEB) 1 y ZEB2 y sus asociaciones en cáncer de mama. La expresión de ARNm y proteína de BCL6, ZEB1 y ZEB2 se evaluó utilizando hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, respectivamente, en 228 pacientes con cáncer de mama y 80 pacientes con enfermedad benigna de mama. Además, analizaron la asociación entre la expresión de BCL6, ZEB1 y ZEB2 y las características clinicopatológicas y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama. La expresión de ARNm y proteína de BCL6, ZEB1 y ZEB2 fue significativamente mayor en los tejidos de cáncer de mama en comparación con los tejidos benignos de enfermedad de mama ( $P < 0.05$ ). La expresión de BCL6, ZEB1 y ZEB2 se correlacionó significativamente positivamente con el tamaño del tumor, la metástasis de los ganglios linfáticos y un estadio tumoral más alto ( $P < 0.05$ ). Además, los pacientes con tumores primarios positivos a la proteína BCL6, ZEB1 y ZEB2 tuvieron tasas de supervivencia global significativamente más bajas ( $P = 0.001$ ,  $0.002$  y  $0.001$ , respectivamente) y supervivencia sin recaídas ( $P = 0.002$ ,  $0.001$  y  $0.003$ , respectivamente).  $r_s = 0.326$ ,  $P < 0.001$ ) y ZEB2 ( $r_s = 0.382$ ,  $P < 0.001$ ) se correlacionaron significativamente positivamente con la expresión de ARNm de BCL6 y las expresiones proteicas de ZEB1 ( $r_s = 0.449$ ,  $P < 0.001$ ) y ZEB2 ( $r_s = 0.669$ ,  $P < 0.001$ ) se correlacionaron significativamente positivamente con la expresión de la proteína BCL6. Ellos concluyeron que sus resultados sugieren que BCL6, ZEB1 y ZEB2 son biomarcadores potenciales para la invasión, metástasis y pronóstico del cáncer de mama, y que BCL6 puede ser un regulador de la Familia ZEB (67).

Tian M. et al. demostraron que la EMT estimulada por TGF- $\beta$  promueve la resistencia antiestrógeno activando la señalización ER- $\alpha$  no genómica dependiente de EGFR-, IGF1R- y MAPK. Ellos tomaron células MCF-7 y BT474 las cuales fueron estimuladas con TGF- $\beta$  para inducir programas EMT, en cuyo punto se determinaron la expresión de ER- $\alpha$ , la localización y las interacciones no genómicas con los receptores de tirosina quinasas y MAP quinasas (MAPK). También investigaron la sensibilidad celular a los antiestrógenos tanto antes como después de atravesar el programa EMT. TGF- $\beta$  estimuló a las células MCF-7 y BT474 a adquirir fenotipos EMT, lo que mejoró la acumulación citoplasmática de ER- $\alpha$  sin alterar su expresión. Las células post-EMT exhibieron (i) expresión elevada de EGFR e IGF1R, que junto con Src formaron complejos citoplasmáticos con ER- $\alpha$ ; (ii) acoplamiento mejorado de EGF, IGF-1 y estrógeno a la activación de MAPK; y (iii) sensibilidad reducida al tamoxifeno, un evento revertido por la administración de inhibidores de moléculas pequeñas contra los receptores de TGF- $\beta$ , EGF e IGF-1, así como aquellos contra MAPK. Ellos demostraron que las células MCF-7 pasaron fácilmente de morfologías epiteliales a mesenquimales cuando se estimularon con TGF- $\beta$ 1. Además, estas alteraciones morfológicas exhibidas por las células MCF-7 coincidieron con su (i) expresión downregulated del marcador epitelial E-cadherina en cultivos 3D y (ii) expresión upregulated de marcadores mesenquimales vimentina, N-cadherin, Cox-2 y MMP-9, así como la de los factores de transcripción EMT maestros, Snail, Twist, Zeb1 y Zeb2. Del mismo modo, las células MCF-7 post-EMT mostraron una sorprendente pérdida de  $\beta$ -catenina de la membrana plasmática (68).

Bhat-Nakshatri P. et al. Demostraron en su estudio que las células cancerosas que han sufrido una transición epitelial a mesenquimal (EMT) muestran el fenotipo CD44 + / CD24-, las cuales expresan niveles más altos de genes asociados a células madre / progenitoras. Las células epiteliales de mama MCF-10A, una subpoblación de las cuales adquieren espontáneamente el fenotipo CD44 + / CD24-, se usaron para identificar genes que se expresan diferencialmente en células CD44 + / CD24- y CD44- / CD24 +. Ellos identificaron redes de señalización que unían genes expresados diferencialmente. Dos genes asociados a EMT elevados en las células CD44 + / CD24-

SLUG y Gli-2, se sobreexpresaron en la subpoblación CD44- / CD24 + de las células MCF-10A y MCF-7, que son CD44- / CD24 +. Los ensayos de citometría de flujo y de mamografía se usaron para evaluar los marcadores de la superficie celular y las propiedades similares a las células madre, respectivamente. En los resultados encontraron que dos mil treinta y cinco genes se expresaron diferencialmente entre las subpoblaciones CD44 + / CD24- y CD44- / CD24 + de MCF-10A. Treinta y dos genes asociados a EMT incluyendo SLUG, Gli-2, ZEB-1 y ZEB-2 se expresaron a niveles más altos en células CD44 + / CD24 -(69).

Hugo HJ. et al. Realizaron ensayos para estudiar la interacción entre EMT y el control de proliferación por MYB en células de cáncer de mama. En su metodología, los niveles de expresión de MYB, ZEB1 y CDH1 se manipularon mediante derribo / sobreexpresión mediada por ARN lentiviral de horquilla pequeña (shRNA), y se verificaron con transferencia Western, inmunohistoquímica y qRT-PCR. La proliferación se evaluó con marcado de pulso de bromodesoxiuridina y citometría de flujo, y ensayos de sulforhodamina B. EMT se indujo con factor de crecimiento epidérmico durante 9 días o por exposición a hipoxia (1% de oxígeno) durante hasta 5 días, y se evaluó con qRT-PCR, morfología celular y morfología de colonias. La expresión de proteínas en cánceres de mama humanos se evaluó con inmunohistoquímica. La unión y represión del promotor ZEB1-MYB se determinaron con el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina y un ensayo de indicador de luciferasa, respectivamente. En los resultados encontraron que las células parentales PMC42-ET mostraron una mayor expresión de ZEB1 y una menor expresión de MYB que la variante epitelial PMC42-LA. La caída de ZEB1 en células PMC42-ET y MDA-MB-231 provocó una mayor expresión de MYB y una transición a un fenotipo más epitelial, que en las células PMC42-ET se combinó con una mayor proliferación. De hecho, observaron una relación inversa entre la expresión MYB y ZEB1 en dos modelos in vitro de células EMT, en tumores de mama humanos coincidentes y metástasis de ganglios linfáticos, y en líneas celulares de cáncer de mama humano. La caída de MYB en células PMC42-LA (MYBsh-LA) condujo a cambios morfológicos y expresión de proteínas consistentes con una EMT. La

expresión de ZEB1 se elevó en células MYBsh-LA y se reprimió significativamente en células MDA-MB-231 que sobreexpresan MYB, que también mostraron una migración aleatoria reducida y un cambio de la morfología de colonias mesenquimatosas a epiteliales en cultivos monocapa de dos dimensiones. Finalmente, detectaron la unión de ZEB1 al promotor MYB en células PMC42-ET, y la sobreexpresión de ZEB1 reprimió la actividad del promotor MYB (70)

Moreno B. et al. investigaron el papel del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre la TEM inducida en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama. En su estudio se emplearon la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y los cultivos primarios MBCD25 y MBCDF. Indujeron la TEM mediante el tratamiento continuo con EGF. evaluaron si las células habían sido inducidas a un fenotipo mesenquimatoso con EGF mediante la técnica de western blot, midiendo la fosforilación de STAT3, el nivel de STAT3, y la represión de los marcadores como E-cadherina, así como la expresión del factor de transcripción Snail. Sus resultados demostraron que el tratamiento con EGF induce la fosforilación de STAT3 sin cambios en sus niveles totales en células MBCDF, MBCD25 y MCF-7. Asimismo, el tratamiento con EGF por 5 días indujo una TEM, que se demostró por la pérdida de E-cadherina y la expresión de Snail. Ellos concluyeron que en los cultivos primarios MBCD25 y MBCDF, así como en la línea celular MCF-7, el EGF es capaz de inducir TEM y en consecuencia producir un fenotipo más agresivo de las células de cáncer de mama (71).

### **3. 4. OBJETIVOS**

#### **3. 4. 1. Objetivo general**

Evaluar la asociación entre la expresión, a nivel de proteína, de los genes *Slug* y *Zeb1* en el tejido tumoral, y la evolución clínica representada por el desarrollo de resistencia a la terapia hormonal, en casos de cáncer de mama de un centro oncológico de referencia del caribe colombiano.

#### **3. 4. 2. Objetivos específicos**

- Determinar el perfil de expresión inmunohistoquímica de los genes *Slug* y *Zeb1* en los casos de adenocarcinoma de mama tratados con terapia hormonal durante un período de cinco años, en un centro oncológico de referencia del caribe colombiano.
- Comparar el perfil de expresión inmunohistoquímica de los genes *Slug* y *Zeb1* entre el tejido con adenocarcinoma de mama sensible a la terapia hormonal, y el tejido con adenocarcinoma de mama resistente a dicha terapia.
- Establecer si existen asociaciones entre la expresión de los genes *Slug* y *Zeb1* en el tejido tumoral y la respuesta a la terapia hormonal en el cáncer de mama.
- Describir las características clínico-patológicas de los casos de cáncer de mama tratados con terapia hormonal, en un centro oncológico de referencia del caribe colombiano.
- Establecer si existen asociaciones entre la expresión de los genes *Slug* y *Zeb1* en el tejido tumoral y las características clínico-patológicas de los casos de cáncer de mama tratados con terapia hormonal, durante un período de cinco años, en un centro oncológico de referencia del caribe colombiano.

### **3. 5. METODOLOGÍA PROPUESTA**

#### **3. 5. 1. Diseño de investigación**

Se realizará un estudio analítico de corte transversal donde se revisará y recolectará la información de las historias clínicas de la Organización clínica Bonnadona de la ciudad de Barranquilla, Colombia. La población de estudio serán los casos diagnosticados con cáncer de mama y que recibieron terapia hormonal con tamoxifeno durante un periodo de tiempo de 5 años. Se seleccionarán los casos de cáncer de mama a los que se les realizó mastectomía o cuadrantectomía y se les instauró terapia endocrina. Se obtendrán los datos clínico-patológicos incluyendo el tipo histológico tumoral y la expresión de ER, PR, HER2 y Ki67 en el tejido tumoral, y se evaluará la expresión de

los genes en estudio, mediante ensayos de inmunohistoquímica en el tejido tumoral de los casos seleccionados. Se tomarán dos grupos: un grupo con los casos que no hicieron resistencia y otro con los que presentaron progresión de su patología durante el periodo estudiado y se comparará la expresión de los genes entre los dos grupos. Además, se comparará la expresión de los genes entre los estadios moleculares luminal A y luminal B.

### **3. 5. 2. Población**

#### **3. 5. 2. 1. Población marco o referencia**

Pacientes que fueron diagnosticadas con cáncer de mama y que recibieron terapia hormonal por un periodo de tiempo de 5 años.

#### **3. 5. 2. 2. Población sujeto de estudio**

Los casos que fueron diagnosticadas con cáncer de mama y que recibieron terapia hormonal en un periodo de tiempo de 5 años en un centro oncológico de referencia del caribe colombiano y que cumplan con los siguientes criterios de selección.

##### **Criterios de inclusión**

Todos los casos de cáncer de mama manejados con terapia hormonal en la Clínica Bonnadona que recibieron terapia hormonal por 5 años, de los que se tenga información de seguimiento según protocolo institucional.

Casos con tejido tumoral obtenido de especímenes quirúrgicos (cuadrantectomía y/o mastectomía) que tengan disponibles las láminas con los cortes histológicos y los bloques de parafina, en buen estado de conservación.

##### **Criterios de exclusión**

Casos sin seguimiento clínico o aquellos en los que no se puede acceder a la historia clínica

Casos que recibieron radioterapia y/o inmunoterapia.

Casos en los que el material de patología este incompleto o deteriorado.

### 3. 5. 3. Muestra

Se tomará una muestra por conveniencia en donde se incluirán todos los casos que cumplan con los criterios de inclusión.

### 3. 5. 4. Operacionalización de variables

Variable	Definición	Tipo	Categorías	Rango
Edad	N de años cumplidos por el paciente al momento del diagnostico	Cuantitativa continua	Años	Mayor 18 años
H-Score		Cuantitativa	10 negativo, 10-100 débilmente positivo 101-200 moderadamente positivo 201-300 intensamente positivo	0-300
Estatus hormonal	Característica con relación a la menopausia	Cualitativa nominal	Premenopausica Postmenopausica	NA
Tabaquismo	Consumo de cigarrillo	Cuantitativa	Fumadora No Fumadora	NA
Fertilidad	Número de embarazos	Cuantitativa	Nulipara Multípara	NA
Antecedentes familiares de cáncer de mama	Positivo o negativo	Cualitativa nominal	Positivo Negativo	NA
Estadio clínico según la TNM al momento del diagnóstico	Según TNM	Cualitativa nominal	Según TNM	NA
Expresión de ER	Estado del receptor	Cualitativa nominal	Positivo Negativo	NA
Expresión de PR	Estado del receptor	Cualitativa nominal	Positivo Negativo	NA
Expresión de HER2	Estado del receptor	Cualitativa nominal	Positivo Negativo	NA

Expresión de Ki67	Informa índice de proliferación celular.	Cuantitativa	Menor de 14 Mayor de 14	NA
Tratamiento hormonal previo a la cirugía	Tamoxifeno, Inhibidores de la aromatasa, Fulvestrant	Cualitativa nominal	Si No	NA
Presencia de metástasis al momento del diagnóstico		Cualitativa nominal	Si No	NA
Tratamiento hormonal postquirúrgico	Fármaco hormonal utilizado	Cualitativa nominal	Tamoxifeno, Inhibidores de la aromatasa, Fulvestrant	NA
Desarrollo de enfermedad a distancia		Cualitativa nominal	Si No	NA
Resistencia a terapia hormonal definida de acuerdo con el protocolo institucional		Cualitativa nominal	Si No	NA

### 3. 5. 5. Obtención de la información

#### 3. 5. 5. 1. Recolección de la información

Se revisará de la base de datos de la clínica Bonnadona de los años 2014 a 2018 de acuerdo con los criterios de inclusión anotados, los datos obtenidos se registrarán en el instrumento de recolección de datos diseñado para el estudio (formato de recolección de variables en Microsoft Excel).

#### Evaluación histológica

Se tomarán las láminas con los cortes histológicos coloreados con coloración de rutina de los especímenes tumorales de los casos incluidos en el estudio, las cuales se analizarán con microscopio de luz por parte de un Patólogo experto, para escoger los



cortes con áreas representativas de tejido tumoral que se usarán para los ensayos de evaluación de expresión de los genes *Slug* y *Zeb1*.

### **Procedimiento de inmunohistoquímica**

Se tomarán nuevos cortes en las áreas de tejido tumoral seleccionadas en la evaluación histológica. A los nuevos cortes realizados a los tejidos fijados e incluidos en parafina, se les realizara tinción de inmunohistoquímica. Los cortes serán desparafinados e hidratados para posteriormente recuperar los antígenos mediante la aplicación de los anticuerpos en estudio según protocolo descrito en los anexos (Ver Anexo 1).

### **Evaluación de la inmunohistoquímica**

Para dar un valor cuantitativo a la expresión de estos marcadores, se medirá la tinción inmunohistoquímica mediante una escala semicuantitativa: Histo-score (H-score), en el que se considera el porcentaje de células positivas para la tinción y la intensidad de la misma. La intensidad se evalúa en 4 categorías, siendo 0: ausencia de tinción, 1: tinción débil, 2: tinción moderada, y 3: tinción fuerte o intensa. El Histo-score se calcula aplicando un factor de corrección al porcentaje en cada una de las intensidades de expresión, de acuerdo con la siguiente fórmula:  $H\text{-score} = (\text{expresión baja } \%) \times 1 + (\text{expresión moderada } \%) \times 2 + (\text{expresión fuerte } \%) \times 3$ .

### **3. 5. 6. Análisis estadístico**

El análisis descriptivo de las variables se realizará con porcentajes para las variables cualitativas y con medias o medianas y rangos para las cuantitativas. El análisis de asociación entre variables se realizará con la prueba t de Student para comparación de medias de variables cuantitativas entre dos grupos y la prueba Chi cuadrado para valorar la asociación entre variables cualitativas. Las comparaciones entre los subtipos tumorales se realizará con prueba de Anova. En las determinaciones de las cohortes de biopsias de pacientes, se realizarán diferentes análisis relacionando las características clínicas e inmunohistoquímica de los pacientes con los marcadores de interés. Todos los

análisis estadísticos se realizarán utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 7, un valor de  $p < 0,05$  será considerado estadísticamente significativo.

### 3. 5. 7. Aspectos éticos

El estudio se realizará con la aprobación de ética local y de acuerdo con las normas y objetivos de la Declaración de Helsinki, adoptada en la 18ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (Helsinki, Finlandia, junio de 1964), revisada por la 29ª Asamblea Médica Mundial (Tokio, Japón, octubre de 1975) y por la 35ª Asamblea Médica Mundial (Venecia, Italia, octubre de 1983) (World Medical Association).

### 3. 6. Cronograma de actividades

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES															
ETAPAS	ACTIVIDADES	TIEMPO												PRODUCTO	
		MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	MES 11	MES 12		
ETAPA 1	Revisión bibliográfica														Anteproyecto documentado. Sustentación
ETAPA 2	Consecucion de las proteínas para deteccion de expresion de las mismas														Anticuerpos para realizar el estudio
ETAPA 3	Búsqueda de la muestra (casos que cumplen con criterios de inclusion)														Listado de casos que cumplen con los criterios de inclusion
ETAPA 4	Recoleccion de las muestras de tejido tumoral de los casos que cumplen con los criterios de inclusion														Muestras para realizar inmunohistoquímica
ETAPA 5	Realizaion de Inmunohistoquímica														Resultados de Inmunohistoquímica
ETAPA 6	Aplicar pruebas estadísticas														Datos analizados con sus pruebas estadísticas
ETAPA 7	Redactar el informe final														Informe final y sustentacion ante jurado evaluador.

### **3. 7 Resultados/Productos esperados y potenciales beneficiarios:**

Este proyecto de investigación pretende arrojar nuevos conocimientos acerca de la resistencia a la terapia hormonal en cáncer de mama desde la perspectiva de la biología molecular del cáncer. Los potenciales beneficiarios de estos resultados son las pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, en quienes podrían ampliarse los biomarcadores a estudiar previo a instaurar la terapéutica, igualmente, los resultados favorecerían a la comunidad científica y académica para ampliar sus conocimientos en el tema, la maestría de farmacología también se ve beneficiada aportando nuevo conocimiento.

#### **Generación de nuevo conocimiento**

Este proyecto busca generar nuevo conocimiento acerca de la resistencia a la terapia hormonal en cáncer de mama en cuanto a la biología del cáncer para aplicarse a la creación de nuevas dianas terapéuticas.

#### **Fortalecimiento de la comunidad científica**

A partir de esta investigación se pretende aportar nuevos conocimientos sobre la biología del cáncer de mama con receptores hormonales positivos, los cuales ayudarían a enriquecer publicaciones científicas de gran impacto, de manera que pueden servir como base para investigaciones futuras relacionadas con el tema.

#### **Apropiación social del conocimiento**

Este proyecto busca identificar nuevos biomarcadores que permitan predecir la evolución y respuesta a la terapia instaurada en cáncer de mama con el fin de individualizar la terapia y obtener mejores respuestas farmacológicas en las mujeres portadoras de esta patología.

#### **Impactos esperados a partir del uso de los resultados:**

El impacto que se busca con los resultados de este trabajo es la identificación de nuevos biomarcadores que ayuden a predecir la respuesta a la terapia hormonal en el cáncer de mama previniendo recaídas y progresión de la enfermedad. Estos biomarcadores además pueden ayudar a diseñar nuevas estrategias farmacológicas diseñadas a la medida de la firma biológica de cada cáncer.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mercè M., Vela C. Sobrediagnóstico en cáncer. Atención Primaria Volume 50, Supplement 2, November 2018, Pages 51-56
2. GLOBOCAN 2018 (IARC), available from <http://gco.iarc.fr/>; The World Bank Group Indicators; available from <https://data.worldbank.org/indicator/NY.GDP.PCAP.CD>
3. Palomeras S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Apuntar a las células madre del cáncer de mama para superar la resistencia al tratamiento. *Moléculas* . 2018; 23 (9): 2193. Publicado el 30 de agosto de 2018 doi: 10.3390 / moléculas23092193
4. Tecalco-Cruz AC, Ramírez-Jarquín JO. Polyubiquitination inhibition of estrogen receptor alpha and its implications in breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2018;9(4):60-70.
5. Sánchez R. César, Valenzuela V. Yasna, Pérez-Sepúlveda Alejandra, Villarroel P. Alejandra, Medina A. Lidia, Camus A. Mauricio et al . Cáncer de mama avanzado receptor de estrógeno positivo: Manejo sistémico actual. *Rev Chil Cir* [Internet]. 2018 [citado 2019 Nov 18] ; 70( 5 ): 464-473. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-40262018000500464&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-40262018000500464&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-40262018000500463>.
6. Stone A, Zotenko E, Locke WJ, et al. DNA methylation of oestrogen-regulated enhancers defines endocrine sensitivity in breast cancer. *Nat Commun*. 2015;6:7758. Published 2015 Jul 14. doi:10.1038/ncomms8758
7. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(10):573–583. doi:10.1038/nrclinonc.2015.117
8. Gyórfy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Pruebas pronósticas multigénicas en cáncer de mama: pasado, presente, futuro. *Res de Cáncer de Mama* . 2015; 17 (1): 11. Publicado el 27 de enero de 2015. doi: 10.1186 / s13058-015-0514-2
9. Wang D, Lu P, Zhang H, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014;5(21):10803-15.
10. Chen B, Chen B, Zhu Z y col. Valor pronóstico de ZEB-1 en tumores sólidos: un metaanálisis. *BMC Cancer* . 2019; 19 (1): 635. Publicado el 27 de junio de 2019. doi: 10.1186 / s12885-019-5830-a
11. Ganesan R, Mallets E, Gomez-Cambronero J. Los factores de transcripción Slug (SNAI2) y Snail (SNAI1) regulan el promotor de fosfolipasa D (PLD) en formas opuestas hacia la invasión de células cancerosas. *Mol Oncol* . 2016; 10 (5): 663–676. doi: 10.1016 / j.molonc.2015.12.006
12. Phillips S, Kuperwasser C. SLUG: Critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer. *Cell Adh Migr* . ;8(6):578–587. doi:10.4161/19336918.2014.972740
13. Siegel, R., Miller, K., & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2015; 65(1), 5- 29. doi:10.3322/caac.21254
14. , *FEBS Letters* , 589 , doi: 10.1016 / j.febslet.2015.05. Bill, Ruben y Christofori, Gerhard. La relevancia de la EMT en la metástasis del cáncer de mama: ¿correlación o causalidad?002
15. Lambertini E, Lolli A, Vezzali F, Penolazzi L, Gambari R, Piva R. Correlación entre el factor de transcripción Slug y miR-221 en células de cáncer de mama MDA-MB-231. *BMC Cancer* . 2012; 12: 445. Publicado el 2 de octubre de 2012 doi: 10.1186 / 1471-2407-12-445
16. Santaballa A. Cáncer de mama. SEOM Sociedad Española de Oncología Medica. 2017.
17. González I. et al. Cáncer de mama con receptores hormonales positivos: tratamiento adyuvante, primera línea en cáncer metastásico y nuevas estrategias (inhibición de mTOR). *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2015;14(5):277---292.

18. Vargas R., Navarro E. Cancer incidence and mortality in Barranquilla, Colombia. 2008-2012. Colombia Médica, North America, 49, apr. 2018. Available at: <<http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/3627/3544>>. Date accessed: 05 Feb. 2019.
19. Chabner B. et al. Harrison Manual de Oncología. oncología de mama. McGraw-hill interamericana editores, s.a. 2009. Pág. 511-536. ISBN 13: 978-970-10-7285-1
20. Palmero EI, Alemar B, Schüler-Faccini L, et al. Detección de mutaciones de la línea germinal BRCA1, BRCA2, TP53 y CHEK2 en familias en riesgo de cáncer de mama hereditario identificado en un estudio basado en la población del sur de Brasil [la corrección publicada aparece en Genet Mol Biol. 16 de marzo de 2017;; 0]. Genet Mol Biol . 2016; 39 (2): 210–222. doi: 10.1590 / 1678-4685-GMB-2014-0363
21. Rebbeck TR, Friebel TM, Friedman E, et al. Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations. Hum Mutat. 2018;39(5):593–620. doi:10.1002/humu.23406
22. Vogel WH. Síndrome de Li-Fraumeni. J Adv Pract Oncol . 2017; 8 (7): 742–746.
23. Espinosa M. Cancer de mama. Revista medica sinergia vol 2 (1), Enero 2017
24. Estadificación del carcinoma de mama de la AJCC (American Joint Committee on Cancer) 8th Edition.
25. Martínez-Navarro J, Socorro-Castro C. Inmunohistoquímica en el cáncer de mama. Herramienta necesaria en la actualidad. Medisur [revista en Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/3647>
26. Gerson R. et al. Recurrencia y supervivencia en cáncer de mama temprano en relación a la expresión de Ki-67. Gaceta Mexicana de Oncología. 2014;13(1):4-11
27. OA Bonilla OA. Matute G. Severiche C. Clasificación en subtipos intrínsecos de los carcinomas de mama analizados en un centro de patología de Medellín en el año 2011. Revista CES MEDICINA Volumen 29 No. 1 enero - Junio / 2015
28. Ades F, Zardavas D., et al. Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. Journal of Clinical Oncology 2014 32:25, 2794-2803
29. N. Ramírez-Torres, et al.: Clasificación molecular por inmunohistoquímica en cáncer de mama avanzado. Evaluación de la clasificación molecular por inmunohistoquímica en cáncer de mama avanzado tratado con epirubicina docetaxel: diferencias clínicas, patológicas, terapéuticas y pronósticas. Gaceta Mexicana de Oncología. 2018;17
30. Imigo G., F., Mansilla S., E., Delama G., I., Poblete S., M., & Fonfach Z., C. Clasificación molecular del cáncer de mama. Cuadernos De Cirugía, 2018. 25(1), 67-74. doi:10.4206/cuad.cir.2011.v25n1-10.
31. Santillán J. et al. Expresión génica y receptores hormonales en cáncer mamario. "El camino hacia la búsqueda de terapias preventivas". revista de Medicina e investigación 2013;1(1):17-24.
32. Hewitt, Sylvia C y col. "Novedades en la acción del receptor de estrógenos en el tracto reproductor femenino". Journal of molecular endocrinology 56 2 (2016): R55-71.
33. Rondón-Lagos, M., Villegas, V. E., Rangel, N., Sánchez, M. C., & Zaphiropoulos, P. G. (2016). Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. International journal of molecular sciences, 17(8), 1357. doi:10.3390/ijms17081357.
34. Brunton L., Lazo J., Parker K. Estrógenos y progestágenos. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª edición. ISBN 970-10-5739-2. Pag.

35. Meneses-Morales I, Tecalco-Cruz AC, Barrios-García T, et al. SIP1 / NHERF2 mejora la transactivación alfa del receptor de estrógenos en las células de cáncer de mama. *Acidos Nucleicos Res* . 2014; 42 (11): 6885–6900. doi: 10.1093 / nar / gku311
36. Hernandez D. Biología del cáncer de mama. *Revista venezolana de oncología*, vol. 28, núm. 3, 2016.
37. Si Tu, Y Xiao, W wang, K Yearsley, JX Gao, B Shetuni & SH BarskyA. La señalización ER $\alpha$  a través de babosas regula la E-cadherina y la EMT.
- 38 Geng SQ, Alexandrou AT, Li JJ. Células madre del cáncer de mama: múltiples capas en metástasis tumorales. *Cáncer Lett* . 2014; 349 (1): 1–7. doi: 10.1016 / j.canlet.2014.03.036. *Oncogene* ,Marzo 2010. páginas 1451 - 1462.
- 39 Siddharth S, Das S, Nayak A, Kundu CN. SOBREVIVIR como marcador para células madre de cáncer de mama quiescentes: una fase intermedia, adherente y de requisito previo de la metástasis del cáncer de mama. *Clin Exp Metastasis*. 2016 Oct; 33 (7): 661-75. doi: 10.1007 / s10585-016-9809-7.
40. Shao S, Zhao X, Zhang X, et al. Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner. *Mol Cancer*. 2015;14(1):28. Published 2015 Feb 3. doi:10.1186/s12943-015-0295-3
41. Lee YS, Kim SM, Kim BW y col. Efectos anticancerígenos de HNHA y lenvatinib por la supresión de la resistencia a los medicamentos mediada por EMT en células madre cancerosas. *Neoplasia* . 2018; 20 (2): 197–206. doi: 10.1016 / j.neo.2017.12.003
42. Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett JM. EMT en la revisión del carcinoma de mama-A. *J Clin Med* . 2016; 5 (7): 65. Publicado el 14 de julio de 2016 doi: 10.3390 / jcm5070065
43. Lin Y, Wang Y, Shi Q, et al. Stabilization of the transcription factors slug and twist by the deubiquitinase dub3 is a key requirement for tumor metastasis. *Oncotarget*. 2017;8(43):75127–75140. Published 2017 Aug 24. doi:10.18632/oncotarget.20561
44. Guo W. , Keckesova Z. , Donaher JL , Shibue T. , Tischler V. , Reinhardt F. , Itzkovitz S. , Noske A. , Zürcher-Härdi U. , Bell G. , Tam WL , Mani SA , van Oudenaarden A. , Weinberg RA. Slug y Sox9 determinan cooperativamente el estado de las células madre mamarias. *Cell* 148, 1015–1028, March 2, 2012 ©2012 Elsevier Inc
45. Katsura A, Tamura Y, Hokari S, et al. Fenotipo inflamatorio regulado por ZEB1 en células de cáncer de mama. *Mol Oncol* . 2017; 11 (9): 1241–1262. doi: 10.1002 / 1878-0261.12098
46. Noman MZ, Janji B, Abdou A, et al. The immune checkpoint ligand PD-L1 is upregulated in EMT-activated human breast cancer cells by a mechanism involving ZEB-1 and miR-200. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1263412. Published 2017 Jan 23. doi:10.1080/2162402X.2016.1263412
47. Caramel J., Ligier M., Puisieux A. Roles pleiotrópicos para ZEB1 en cáncer. *Cancer Res*; 78(1) January 1, 2018
48. Reinert T. , Ramalho S. , Gonçalves R. , Barrios CH. , Graudenz MS 5 , Bines J . Enfoque multidisciplinario para la terapia endocrina neoadyuvante en el cáncer de mama : una revisión integral. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2016 Dic; 38 (12): 615-622. doi: 10.1055 / s-0036-1597579. Epub 2016 21 de diciembre.
49. Brunton L, Lazo J, Parker K. Quimioterapia del cáncer: hormonas y fármacos relacionados. En: Goodman & Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11a. edición. 2007. Quimioterapia de enfermedades neoplásicas. *Farmacos antineoplásicos. Terapia Antiestrogénica*. 1382-1387.
50. DeVita, Hellman, and Rosenberg's. *Cancer Principles & Practice of Oncology* 11th edition. 2018. Vol. 106, Issue 10 | dju283 | October 8, 2014
51. Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, et al. Guía del Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica (CPIC) para CYP2D6 y terapia con tamoxifeno. *Clin Pharmacol Ther* . 2018; 103 (5): 770–777. doi: 10.1002 / cpt.1007.

52. Maximov P. et al. Pharmacological Relevance of Endoxifen in a Laboratory Simulation of Breast Cancer in Postmenopausal Patients. *Rev. JNCI J Natl Cancer Inst* (2014) 106(10): dju283 doi:10.1093/jnci/dju283
53. Gao P, Wang X, Jin Y, et al. El receptor Nogo-B aumenta la resistencia al tamoxifeno en las células de cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo. *Res de Cáncer de Mama* . 2018; 20 (1): 112. Publicado el 12 de septiembre de 2018 doi: 10.1186 / s13058-018-1028-5
54. Fanning SW, Jeselsohn R, Dharmarajan V, et al. El bazedoxifeno SERM / SERD altera la hélice 12 de ESR1 para superar la resistencia hormonal adquirida en las células de cáncer de mama. *Elife* . 2018; 7: e37161. Publicado el 29 de noviembre de 2018. doi: 10.7554 / eLife.37161.
55. Ahmed OA, Badr-Eldin SM. Misemgel in situ como plataforma multifuncional de doble absorción para el suministro nasal de clorhidrato de raloxifeno: formulación, caracterización y rendimiento in vivo. *Int J Nanomedicina* . 2018; 13: 6325-6335. Publicado el 11 de octubre de 2018 doi: 10.2147 / IJN.S181587.
56. Di Leo A, Jerusalem G, Petruzella L, et al. Final overall survival: fulvestrant 500 mg vs 250 mg in the randomized confirm trial. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:djt337.
57. Matutino A. et al. . Hormone receptor–positive, HER2-negative metastatic breast cancer: redrawing the lines. *Current Oncology*, Vol. 25, Supp. 1, 131-141. June 2018 © 2018 Multimed Inc.
58. Şendur M. et al. ¿Todos los inhibidores de aromatasa tienen una eficacia y seguridad similares?. *Future oncology* vol. 13, n ° 19. 2017 <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0228>
59. Sánchez R. César, Valenzuela V. Yasna, Pérez-Sepúlveda Alejandra, Villarroel P. Alejandra, Medina A. Lidia, Camus A. Mauricio et al . Cáncer de mama avanzado receptor de estrógeno positivo: Manejo sistémico actual. *Rev Chil Cir* [Internet]. 2018 [citado 2019 Nov 05] ; 70( 5 ): 464-473. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-40262018000500464&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-40262018000500464&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-40262018000500463>
60. Li Y, Wu Y, Abbatiello TC, et al. Slug contribuye a la progresión del cáncer mediante la regulación directa de la vía de señalización ER $\alpha$ . *Int J Oncol* . 2015; 46 (4): 1461–1472. doi: 10.3892 / ijo.2015.2878
61. Zhang J, Zhou C, Jiang H, y col. ZEB1 induce la hipermetilación del promotor ER- $\alpha$  y confiere resistencia a los antiestrógenos en el cáncer de mama. *Cell Death Dis* . 2017; 8 (4): e2732. Publicado el 6 de abril de 2017 doi: 10.1038 / cddis.2017.154
62. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, et al. Importancia clínica de la monitorización de mutaciones ESR1 en ADN circulante libre de células en pacientes con cáncer de mama positivo para receptores de estrógenos. *Oncotarget* . 2016; 7 (22): 32504–32518. doi: 10.18632 / oncotarget.8839
63. Angus L, Beijer N, Jager A. Martens J, Sleijfer S. ESR1 mutations: Moving towards guiding treatment decision-making in metastatic breast cancer patients. *Cancer Treatment Reviews* 52 (2017) 33–40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.11.001>.
64. Jeselsohn, R., De Angelis, C., Brown, M. y col. El papel evolutivo de las mutaciones de los receptores de estrógenos en el cáncer de mama resistente a la terapia endocrina. *Curr Oncol Rep* 19, 35 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0591-8>
65. Min S., Jang h., Kim J. Comparación de los criterios RECIST y PERCIST en tumores sólidos: un análisis y revisión agrupados. *Oncotarget*. 10 de mayo de 2016; 7 (19): 27848–27854. Publicado en línea el 28 de marzo de 2016. doi: 10.18632 / oncotarget.8425. PMID: PMC5053692
66. Schwartz, L., Litière S. et al. RECIST 1.1 - Actualización y aclaración: del Comité RECIST. *Eur J Cancer*. Manuscrito del autor; disponible en PMC 2017 20 de diciembre. Publicado en forma editada final como: *Eur J Cancer*. 2016 julio; 62: 132-137. Publicado en línea el 14 de mayo de 2016 doi: 10.1016 / j.ejca.2016.03.081

PMCID: PMC5737828.

67. Ang L, Zheng L, Wang J, et al. Expression of and correlation between BCL6 and ZEB family members in patients with breast cancer. *Exp Ther Med*. 2017;14(5):3985–3992. doi:10.3892/etm.2017.5101

68. Tian M, Schiemann WP. La estimulación de TGF- $\beta$  de los programas de EMT provoca actividad ER- $\alpha$  no genómica y resistencia antiestrógeno en células de cáncer de mama. *J Tratamiento de metástasis de cáncer*. 2017; 3: 150-160. doi: 10.20517 / 2394-4722.2017.38

69. Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, et al. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer*. 2010;10:411. Published 2010 Aug 6. doi:10.1186/1471-2407-10-411

70. Hugo HJ, Pereira L, Suryadinata R, et al. Direct repression of MYB by ZEB1 suppresses proliferation and epithelial gene expression during epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2013;15(6):R113. Published 2013 Nov 27. doi:10.1186/bcr358.

71. Moreno B., Esparza J., Castro A., et al. El factor de crecimiento epidérmico induce transición epitelio-mesénquima en cultivos primarios de cáncer de mama. *Gaceta Mexicana de Oncología* Volume 15, Issue 1, January–February 2016, Pages 10-15



#### 4. PRESUPUESTO

PRESUPUESTO GLOBAL (en pesos \$ colombianos)

RUBROS	FUENTES				Total
	Universidad de Cartagena		Otras instituciones		
	Efectivo	Especie	Efectivo	Especie	
PERSONAL	0	14.500.000	0	5.000.000	19.500.000
EQUIPOS	0	3.400.000	0	0	3.400.000
SOFTWARE	0	0	0	0	
MATERIALES Y SUMINISTROS	5.500.000	0	0	0	5.500.000
SALIDAS DE CAMPO	0	0	0	0	
MATERIAL BIBLIOGRÁFICO	0	0	0	0	
PUBLICACIONES Y REGISTROS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL O INTELLECTUAL	0	0	0	0	
SERVICIOS TÉCNICOS	0	0	0	0	
VIAJES	0	0	0	0	
MANTENIMIENTO	0	0	0	0	
<b>TOTAL</b>	<b>5.500.000</b>	<b>17.900.000</b>	<b>0</b>	<b>5.000.000</b>	<b>28.400.000</b>

**TABLAS DE ANEXO AL PRESUPUESTO**

**Tabla 4.1. Descripción de los gastos de personal**

Nombre del Investigador / Experto/ Auxiliar	Formación Académica	Función dentro en el proyecto	Institución de afiliación	Tipo de vinculación	DEDICACIÓN Horas/semana	FUENTES				Total
						Universidad de Cartagena		Otras instituciones		
						Efectivo	Especie	Efectivo	Especie	
Belkis Palacio Villalba	Estudiante de Maestría	Autor	Universidad de Cartagena	Estudiante	20	0	0	0	0	0
Inés Benedetti	Ph.D.(c)	Director	Universidad de Cartagena	Docente	4	0	14500000	0	0	14500000
Ángel Hernández	Oncólogo Clínico	Co-investigador	Organización clínica Bonnadona	Clínico-investigador	1	0	0	0	4.000.000	50000
<b>Totales</b>						<b>0</b>				<b>19500000</b>

**Tabla 4.2. Descripción de equipos a adquirir y del uso de equipos\***

Equipos	Justificación	FUENTES				Total
		Universidad de Cartagena		Otras instituciones		
		Efectivo	Especie	Efectivo	Especie	
Equipos de laboratorio de patología	Necesarios para realizar las inmunohistoquímicas	0	3400000	0	0	3400000
<b>Totales</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3400000</b>

\*Valorar el uso de equipos hasta por el 10% del valor comercial del equipo

**Tabla 4.6. Descripción de materiales y suministros**

Descripción de materiales y suministros	Justificación	FUENTES				Total
		Universidad de Cartagena		Otras instituciones		
		Efectivo	Especie	Efectivo	Especie	
Anticuerpos y kit de detección ultravision Quanto (hrp)	Aislamiento de las proteínas en estudio	5500000				5500000
<b>Totales</b>		<b>5500000</b>				<b>5500000</b>

## Formato de resumen de hoja de vida de los integrantes del proyecto

RESUMEN DE HOJA DE VIDA	
<b>IDENTIFICACIÓN DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL O COINVESTIGADOR:</b> favor diligenciar datos de identificación (Nombre completo y cédula de ciudadanía) según consta en documento de identidad	
<b>Apellidos:</b> PALACIO VILLALBA	<b>Fecha de nacimiento:</b> 30-12-1971
<b>Nombres:</b> BELKIS DE LA CANDELARIA	<b>Nacionalidad:</b> colombiana
<b>Correo electrónico:</b> belkispalacio@hotmail.com	<b>Documento de Identidad:</b> 32.751.079
<b>TITULOS ACADÉMICOS OBTENIDOS</b> (área/disciplina, Universidad, Año)	
Medico magister en Toxicologia de la universidad de Cartagena, 2018.	
<b>CAMPOS DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA EN LOS CUALES ES EXPERTO</b>	
Toxicologia	
<b>CARGOS DESEMPEÑADOS</b> (Tipo de posición, institución, fecha) en los últimos 5 años	
<b>PUBLICACIONES RECIENTES</b> (Por lo menos las cinco publicaciones más importantes que haya hecho en los últimos cinco años)	
<b>PATENTES, PROTOTIPOS U OTRO TIPO DE PRODUCTOS TECNOLÓGICOS O DE INVESTIGACIÓN OBTENIDOS EN LOS ÚLTIMOS CINCO AÑOS</b>	

HOJA DE VIDA (RESUMEN)	
<b>IDENTIFICACION DE INVESTIGADOR:</b>	
<b>Apellidos:</b> BENEDETTI PADRON	<b>Nombre:</b> ESTEBANA INES
<b>Fecha de Nacimiento:</b> 19/09/1966	<b>Nacionalidad:</b> Colombiana
<b>Correo electrónico:</b> <a href="mailto:ebenedettip1@unicartagena.edu.co">ebenedettip1@unicartagena.edu.co</a>	
<b>Documento de identidad:</b> 30650647	
<b>Entidad donde labora:</b> Universidad de Cartagena	<b>Tel/fax:</b> 6698176 Ext. 129

<p><b>Cargo o posición actual: Profesor Titular, Facultad de Medicina</b>  <b>Profesor, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Cartagena</b></p>
<p><b>TITULOS ACADEMICOS OBTENIDOS (área, disciplina, universidad, año):</b>  Doctorado en Ciencias Biomédicas  Universidad de Cartagena, 2011-2017  Especialización en Docencia Universitaria.  Universidad Santo Tomas - Bogotá, USTB, Distrito Capital, Colombia. 2000 - 2001  Especialización-Residencia médica.  Universidad de Cartagena, Bolívar, Colombia.  Residencia médica en: Patología. 1994 - 1997  Pregrado/Universitario en Medicina.  Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia. 1982 - 1988</p>
<p><b>CAMPOS DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGIA EN LOS CUALES ES EXPERTO</b>  Anatomía Patológica y Citología  Biología molecular del cáncer</p>
<p><b>CARGOS DESEMPEÑADOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS (tipo de posición, institución; fecha):</b>  <b>Universidad de Cartagena</b>  Profesor Titular. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, 2006 – Actual  Profesor, Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Cartagena  <b>Centro de Diagnóstico Citopatológico - CENDIPAT</b>  Agosto 2016- Julio 2017</p>
<p><b>PUBLICACIONES RECIENTES</b>  Ines Benedetti Padron, Angelo De Marzo, Jan Geliebter, Niradiz Reyes Ramos, "<b>CXXC5 expression in prostate cancer: implications for cancer progression</b>", International Journal of Experimental Pathology, v.98 fasc. p.234 - 243 ,2017, DOI: 10.1111/iep.1224  Ines Benedetti Padron, Angelo De Marzo, Javier Baena Del Valle, Jan Geliebter and Niradiz Reyes, "<b>Fibromodulin expression in human prostate cancer tissue: Implications for prostate cancer progression</b>". Cancer Res 2017;77 (13 Suppl): Abstract nr 2414. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-2414  Ines Benedetti Padron, Alfonso Bettin, Niradiz Reyes Ramos, "<b>Inflammation and focal atrophy in prostate needle biopsy cores and association to prostatic adenocarcinoma</b>", Annals of Diagnostic Pathology, v.24 p.55 - 61 ,2016, DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2016.04.010  Niradiz Reyes Ramos, Alfonso Bettin, Juan Rebollo, Ines Benedetti Padron, Jan Geliebter, "<b>The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue</b>" Cancer Biomarkers, v.16 fasc.1 p.191 - 202 ,2016  Niradiz Reyes Ramos, Ines Benedetti Padron, "<b>CXXC5 is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue</b>", Cancer Research, v.76 fasc.14 p.1849 - 1849 ,2016, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-1849  Ines Benedetti Padron, Lía Barrios García, Luis Alvis Estrada, "<b>Presencia del componente de la zona de transformación del cuello uterino en citologías anormales en la Clínica de Maternidad Rafael Calvo de Cartagena (Colombia) entre 2009 y 2012</b>", Medicina &amp; Laboratorio, v.22 fasc.7-8 p.355-364, 2016  Ines Benedetti Padron, Lía Barrios García, Barbara Arroyo Salgado, Orlando Borre Arrieta, "<b>Infección por el virus de papiloma humano en hombres parejas de mujeres con lesión intraepitelial escamosa del cérvix</b>"</p>

Revista Urologia Colombiana, v.24 fasc.3 p.143 - 149 ,2015

Ines Benedetti Padron, Niradiz Reyes Ramos, "**Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático**", Iatreia, v.28, p.420 - 433 ,2015

Dalgys Graciela Martinez De La Ossa, Leonardo Puerta Llerena, Ines Benedetti Padron, Luis Caraballo, "**Evaluation of the immune response induced by a mite derived fusion protein in BALB/c mice**", World Allergy Organization Journal, v.8 fasc.1 p.18 - 18 ,2015, DOI: 10.1186/1939-4551-8-S1-A18

Ines Benedetti Padron, Julián Hoyos Castillo, "Hiperplasia nodular linfoide asociada a colitis ulcerativa. Descripción de un caso y revisión de la literatura", Revista Colombiana De Gastroenterología, v.31 fasc.3 p.288 - 291 ,2016

Ines Benedetti, Oscar Correa, Jan Geliebter, Raj Tiwari, Niradiz Reyes. **Prostatic inflammation and proliferative inflammatory atrophy: Are there any associations with prostatic cancer.** [abstract]. Cancer Research 04/2013; 73(8).

Inés Benedetti-Padrón, Niradiz Reyes, **Atrofia inflamatoria proliferativa: potencial lesión precursora de adenocarcinoma prostático**, Revista Ciencias Biomédicas, Vol 5, No.1, 2014

---

**NOMBRE Y FIRMA DEL DIRECTOR DEL PROYECTO**