



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Maestría en Ciencias Biomédicas

Expresión de E-cadherina, α -SMA, Hic-5 y su correlación con el índice pronóstico Nottingham (IPN) en cáncer de mama

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Q.B.P. TANIA NÁJERA VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. MARCO ANTONIO LEYVA VÁZQUEZ

CO-DIRECTORA DE TESIS: Dra. OLGA LILIA GARIBAY CERDENARES



Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, noviembre de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 19 días del mes de junio de dos mil dieciocho se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Expresión de E-cadherina, a-SMA, Hic-5 y su correlación con el índice pronóstico Nottingham (IPN) en cáncer de mama", presentada por la alumna Tania Nájera Vázquez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
Dirección de tesis

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres
Codirección de tesis

Dr. Napoleón Navarro Tito

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Dr. Marco Antonio Jiménez López

Vo. Bo

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
Ciencias Químico Biológicas
Coordinación 2014-2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
DIRECCIÓN 2018-2021
Dr. Osca del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en Chilpancingo Guerrero, en el Laboratorio de Patología del Instituto Estatal de Cancerología (IECan) Dr. Arturo Beltran Ortega de Acapulco Guerrero, y en el Laboratorio de Investigación en Citopatología e Inmunohistoquímica de la FCQB, de la UAGro.

Bajo la dirección de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

La co-dirección de

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

La asesoría de

Dr. Marco Antonio Jiménez López

Dr. Napoleón Navarro Tito

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Este proyecto se desarrolló bajo un convenio general entre el IECan “Dr. Arturo Beltrán Ortega” y el Laboratorio de Biomedicina Molecular.

Durante el periodo en que cursó la maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Tania Najera Vazquez recibió beca (773948), otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a los programas de posgrados de calidad (PNPC).

Formando además parte del “Programa de Incorporación de Mujeres Indígenas a Posgrados para el Fortalecimiento Regional del Estado de Guerrero” perteneciente al CONACyT, convocatoria 2016.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, gracias por permitirme realizar este proyecto bajo su dirección, gracias por confiar en mí y por recibirme en su laboratorio.

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares, creo que no terminaría de agradecer todo su apoyo tanto en la escuela como en lo personal, siempre con las palabras adecuadas para cada ocasión, y dispuesta a apoyar siempre, además de una excelente Dra. es una persona increíble.

Dr. Marco Antonio Jiménez López, por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo, siempre con un trato amable y dispuesto a apoyar siempre. Gracias.

Dr. Napoleón Navarro Tito, le agradezco por su valiosa aportación para la realización de este trabajo, por todo su apoyo, sus sugerencias han sido de gran ayuda.

Dr. Julio Ortiz Ortiz, por su gran apoyo y por su valiosa aportación para realizar este trabajo, las sugerencias realizadas han enriquecido este trabajo, gracias.

Dra. Eugenia Flores Alfaro, mi maestra de seminario, gracias por todas sus sugerencias para mejorar mi trabajo, siempre con una palabra de aliento y motivarnos aún las circunstancias.

Dr. Eduardo Castañeda, por todo su apoyo en la realización de este trabajo, muchas gracias.

Dra. Luz del Carmen Alarcón, gracias por aceptarme en su laboratorio para poder trabajar en este proyecto, y por todo su apoyo.

Maestra Mónica Saavedra y Monserrat Campos, gracias por su gran apoyo y por permitir estar en su laboratorio.

Maestro Saúl, gracias por apoyarme en el análisis estadístico, su aportación fue de gran ayuda.

DEDICATORIAS

A mis padres Fausta y Moisés: por ser los principales motores de mis sueños, gracias porque nunca me han dejado sola, cuando estoy con ustedes no me preocupa nada, nunca terminaría de agradecer por todo lo que han hecho por mí **LOS AMO CON TODO MI CORAZÓN.**

A mis hermanas (Mary, LuzMa, Yari y Candy), y es que con el apoyo de ustedes todo ha sido más fácil, gracias por sus palabras de aliento, porque nunca me han negado ninguna ayuda, mejores hermanas por siempre las amo.

Luis, gracias por todo tu apoyo en todos los aspectos, porque cuando algo andaba mal estuviste para dar una palabra de aliento, mil gracias. Te quiero.

Mateo, te amo tanto, este logro también es para ti, sé que algún día entenderás la razón por la que no estuve a tu lado mucho tiempo, no ha sido fácil, sin embargo algún día estarás orgulloso de saber que tu mamá no se dio por vencida.

Doña Lucy, no me canso de agradecer el haberla conocido, usted ha estado siempre para apoyarme a mí y a mi Mateo, por eso y más, gracias.

A mis amigas y amigo (Laura, Leylani, Angy, Oscar), por los cafés a cualquier hora y lugar, esas pláticas con ustedes serán siempre increíbles, gracias por siempre apoyar y por siempre tener las palabras adecuadas en cada momento para alentarnos unos a otros.

A mis compañeros de laboratorio (Hugo, Blanquis, Isabella, Guillermo y Walter), por siempre apoyar en cualquier momento, por hacer el trabajo más ameno y por compartir agradables momentos.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1. Población de estudio.....	6
4.2. Inmunohistoquímica y cuantificación.....	6
4.3. Determinación del índice pronóstico Nottingham.....	7
4.4 Análisis estadístico.....	7
V. RESULTADOS.....	9
5.1. Obtención del índice pronóstico Nottingham.....	9
5.2. Inmunohistoquímica para E-cadherina, α -SMA y Hic-5.....	12
5.3. Relación de la expresión de E-cadherina, α -SMA y Hic-5 con el índice pronóstico Nottingham.....	19
VI. DISCUSIÓN.....	24
VII. CONCLUSIONES.....	30
VIII. REFERENCIAS.....	32

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El cáncer de mama (CaMa) es una enfermedad heterogénea que comprende diferentes características moleculares, comportamiento, apariencia morfológica y respuesta a la terapia. El seguimiento clínico rutinario de las pacientes con CaMa incluye factores pronósticos clínicos y patológicos consistentes para respaldar la toma de decisiones para el manejo adecuado de las pacientes. El índice pronóstico Nottingham (IPN) emplea un sistema de clasificación de tres niveles que estratifica a las pacientes en grupos de pronóstico bueno, moderado y malo. El objetivo de este trabajo fue utilizar la Inmunohistoquímica para determinar la expresión de E-cadherina, α -SMA y Hic-5 y ver la relación con IPN y clasificación molecular. **METODOLOGÍA:** A través de un convenio con el Instituto Estatal de Cancerología Dr. Arturo Beltrán Ortega se colectaron un total de 55 biopsias de pacientes con diagnóstico histológico y molecular de cáncer de mama. La determinación de los marcadores se realizó mediante Inmunohistoquímica. **RESULTADOS:** Se tienen 16 pacientes en el grupo bueno, 33 en el moderado y 6 en el grupo de mal pronóstico. De acuerdo con el análisis de correspondencia simple y múltiple, el grupo de pacientes con mal pronóstico, se asocia con pacientes con los tipos moleculares triple negativo y Her2+, además de relacionarse con pacientes que presentan niveles de expresión de E-cadherina (leve), α -SMA y Hic-5 (intenso), este grupo incluye a los tipos más agresivos en cáncer de mama. Las pacientes que presentaron niveles de expresión E-cadherina (intensa), α -SMA y Hic-5 (leve), se asocian con pacientes con el tipo Luminal A, además de pertenecer al grupo de buen pronóstico y que han sido considerados como los de mejor respuesta. **CONCLUSIONES:** La expresión intensa de α -SMA y Hic-5, se asocia con los tipos moleculares triple negativo y Her2+ y se encuentran dentro de un grupo de mal pronóstico, haciendo a este grupo de pacientes las de peor pronóstico.

Palabras clave: cáncer de mama, índice pronóstico Nottingham, E-cadherina, Hic-5 y α -SMA, Inmunohistoquímica.

II. ABSTRACT

INTRODUCTION: Breast cancer (BrCa) is a heterogeneous disease that includes different molecular characteristics, behavior, morphological appearance and response to therapy. The routine clinical follow-up of patients with BrCa includes consistent clinical and pathological prognostic factors to support decision-making for the proper management of patients. The Nottingham Prognostic Index (NPI) employs a three-level classification system that stratifies patients into groups of good, moderate and poor prognosis. The objective of this work was to use Immunohistochemistry to determine the expression of E-cadherin, α -SMA and Hic-5 and to see the relationship with NPI and molecular classification.

METHODOLOGY: Through an agreement with the State Institute of Cancerology Dr. Arturo Beltrán Ortega, a total of 55 biopsies of patients with histological and molecular diagnosis of breast cancer were collected. The determination of the markers was carried out by Immunohistochemistry.

RESULTS: There are 16 patients in the good group, 33 in the moderate group and 6 in the group with poor prognosis. According to the simple and multiple correspondence analysis, the group of patients with a poor prognosis is associated with patients with the triple negative and Her2 + molecular types, in addition to relating to patients with levels of E-cadherin expression (mild), α -SMA and Hic-5 (intense), this group includes the most aggressive types in breast cancer. Patients who had levels of E-cadherin expression (intense), α -SMA and Hic-5 (mild), are associated with patients with the Luminal A type, as well as belonging to the group of good prognosis and who have been considered as of best response.

CONCLUSIONS: The intense expression of α -SMA and Hic-5, is associated with the triple negative and Her2 + molecular types and they are within a group of poor prognosis, making this group of patients the worst prognosis.

Key Words: Breast cancer, Nottingham Prognostic Index, E-cadherin, α -SMA, Hic-5, Immunohistochemistry.

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) es el principal problema de salud en mujeres a nivel mundial y representa un grupo heterogéneo de tumores en términos del genotipo, fenotipo, comportamiento y respuesta al tratamiento (Green, *et al.*, 2016). Se sabe que los tumores de mama del mismo tipo histológico, muestran un comportamiento clínico notablemente diferente, probablemente como resultado de un patrón distintivo de alteraciones moleculares (Albergaria *et al.*, 2011). Por esta razón, para la toma de decisiones clínicas se requiere una estratificación de las pacientes con CaMa, para mejorar el pronóstico, la predicción de recurrencia y el tratamiento de la enfermedad. Se han desarrollado métodos para apoyar la toma de decisiones clínicas en el manejo del CaMa, por ejemplo, el índice pronóstico de Nottingham (IPN) (Rakha *et al.*, 2014). El IPN se basa en características histopatológicas como tamaño tumoral, ganglios linfáticos positivos y estadio tumoral, que refleja el comportamiento metastásico, la tasa de crecimiento y la inestabilidad genética de los tumores. El IPN se utiliza para estratificar a las pacientes con CaMa de fase temprana operable en grupos pronóstico (Green *et al.*, 2016). Emplea tres sistemas de clasificación que se dividen en grupos de bueno (≤ 3.4), moderado (3.41 - 5.4) y mal pronóstico (> 5.4) (Albergaria *et al.*, 2011; Serrero *et al.*, 2016).

Los paneles de marcadores de proteínas, a través de inmunohistoquímica (IHC), pueden ser usados para caracterizar varios subtipos de tumores, confirmando el tejido de origen, distinción de un tumor *in situ* de uno invasivo, además de proveer información adicional que puede ser importante para el pronóstico y predicción a la respuesta terapéutica (Zaha, 2014). Debido a que la terapia del CaMa se basa en criterios clínicos y patológicos convencionales, existe la necesidad urgente de mejorar los biomarcadores pronósticos a través de un enfoque combinado de los criterios clínico-patológicos y los criterios moleculares, con el fin de tener una estratificación más confiable de las pacientes (Laurinavicius *et al.* 2012).

En el proceso de progresión tumoral de un carcinoma se presenta el evento de transición epitelio mesénquima (TEM), donde las células epiteliales pierden la adhesión célula-célula y ocurre la separación de los contactos epiteliales entre células, es decir, uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones

gap, se presenta una pérdida de polaridad apical-basal, la arquitectura de la actina se reorganiza y las células adquieren motilidad y capacidades invasivas al formar lamelipodios, filopodios e invadopodios, y al expresar metaloproteinasas de matriz (MMP) que pueden degradar las proteínas de la matriz extracelular (MEC) y con ello incrementar la migración e invasión. Experimentan además cambios en los programas de señalización que definen la forma de la célula y reprograman la expresión génica; aumentando la motilidad de las células individuales y permitiendo el desarrollo de un fenotipo invasivo (Chung, *et al.*, 2013; Lamouille, *et al.*, 2014).

E-cadherina desempeña un papel importante en la adhesión de las células epiteliales y la pérdida de su función contribuye de manera importante a la progresión del cáncer y la TEM. E-cadherina es una proteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio (Ca^{2+}) de 120 kDa es una glicoproteína transmembranal, y se asocia al citoesqueleto de actina por un dominio intracelular a través de α -catenina, β -catenina, γ -catenina y p120-catenina (Ming *et al.*, 2018).

La actina del músculo liso α (α -SMA, ACTA2) desempeña un papel importante en la motilidad celular ya que es un constituyente principal del citoesqueleto de los fibroblastos asociados a cáncer y este papel en cáncer de mama promueve la progresión tumoral y la metástasis de las células tumorales. La principal isoforma de actina estudiada en el contexto de la carcinogénesis es α -SMA que se expresa en las células musculares lisas normales, en las células mioepiteliales y en los miofibroblastos, incluidos los fibroblastos asociados a cáncer (Amornsapak *et al.*, 2017).

Se ha evaluado el papel de HIC-5 en la promoción de la progresión del tumor y metástasis en el cáncer de mama a través de la regulación de la deposición mediada por fibroblastos asociados a cáncer y la remodelación de la MEC. La proteína de andamiaje/adaptadora de adhesión focal, HIC-5 (TGF β 1I1) es un miembro de la familia paxilina que son proteínas con dominio LIM (dominios estructurales de proteínas compuestos por dos motivos de dedos de zinc contiguos) que ha sido implicada en la contractilidad fibroblástica de la piel y la formación de tejido cicatricial hipertrófico (Goreczny *et al.*, 2016).

Con base en estas observaciones, en este proyecto se evaluó la expresión de los marcadores de TEM: E-cadherina, α -SMA y Hic-5, que ya han sido estudiados en CaMa, además de su relación con la clasificación molecular y el IPN, con la finalidad de evaluar su uso potencial en la estratificación pronóstica de las pacientes con CaMa.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Población de estudio

La cohorte de pacientes con CaMa utilizada para este estudio consistió en 55 casos, las cuales fueron diagnosticadas de primera vez y captadas en el año 2017. El estudio fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” (IECan) de Acapulco, Gro. Con folio FO-INV-AUT.

Después del examen histopatológico, 55 casos de CaMa fueron incluidos en este estudio, los cuales fueron preservados hasta su fijación en PBS estéril a -70°C . Todos los casos contenían información sobre características del tumor requeridos para la determinación del IPN. Las biopsias fueron fijadas en buffer formalina neutra al 10% y fueron seccionadas en cortes de 5 micrómetros (μm).

Las pacientes que aceptaron participar en el estudio lo hicieron con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, basado en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, y firmaron consentimiento informado, los nombres de las pacientes y números de expediente se mantienen confidenciales, se asignaron códigos para su manejo en el Laboratorio de Biomedicina Molecular (LBM) de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

4.2. Inmunohistoquímica y cuantificación

La expresión de las proteínas fue medida por Inmunohistoquímica. Para cada caso las secciones individuales de 5 μm en portaobjetos electrocargados (BIOCare Medical, Concord, CA) fueron desparafinados en estufa a 60°C por 15 minutos y con Xilol (Hycel, México), los tejidos fueron rehidratados a través de una serie graduada de etanol de manera descendente (Absoluto, 96° , 70° , H_2O). La recuperación antigénica se realizó durante 10 minutos a 120°C en tampón de citrato pH 6.0 o en amortiguador EDTA pH 10 en olla Pascal. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó con H_2O_2 al 3%. Los anticuerpos empleados fueron E-cadherina (Cell Signalling Technology, Danvers, MA), α -SMA (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg Germany), HIC-5 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg Germany). Se utilizó el Kit MACH 1 Universal HRP-Polymer Detection (BIOCare Medical, Pacheco, CA) el cual incrementa la sensibilidad de la tinción para anticuerpos anti-ratón y anti-conejo. La reacción se detectó usando

Diaminobencidina (DAB) del mismo Kit. Los portaobjetos se lavaron y se contrañeron con Hematoxilina de Harris por 30 segundos para su posterior análisis.

Las laminillas se analizaron en el microscopio Olympus BX43 y la captura de las imágenes de IHC se realizó con el Programa Q Capture Pro7™. El análisis densitométrico se realizó con el Programa Image-Pro Plus 6.0.

4.3. Determinación del índice pronóstico Nottingham

La información sobre el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos y el grado del tumor para cada paciente provisto en la base de datos fue utilizado para determinar su IPN usando la fórmula: $IPN = \text{Tamaño (cm)} \times 0.2 + \text{grado (1-3)} + \text{puntuación del ganglio linfático (1-3)}$. Los valores de referencia utilizados para el IPN se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de estratificación del IPN de las pacientes

IPN*	
Valor	Pronóstico
≤ 3.4	Bueno
3.41 a 5.4	Moderado
> 5.4	Mal
*IPN= tamaño del tumor en cm x 0.2 + grado histológico (1-3)+ número positivo de ganglios linfáticos (1=0 ganglios; 2=1-3 ganglios y 3 >3).	

4.4 Análisis estadístico

- Parámetros para la evaluación de la expresión de las proteínas

Se obtuvieron 5 campos representativos de cada laminilla para cada una de las proteínas, se realizó la cuantificación de la intensidad de señal (señal del DAB), y se obtuvo la densidad media para cada laminilla (Software Image Pro Plus ver 6.0) medido como unidades arbitrarias de intensidad neta, los datos fueron exportados al programa Excel donde se obtuvieron promedios de la densidad media de los 5 campos. Los valores se categorizaron en terciles (1ºtercil= Leve, 2ºtercil=

Moderado, 3ºtercil= Intenso) para las tres proteínas. La agrupación en terciles se realizó con base en las siguientes operaciones (tabla 2).

Tabla 2. Cálculos para la obtención de terciles de la expresión de las proteínas

Valor máximo-valor mínimo/3=X
1er tercil (leve)=valor mínimo+1x
2do tercil (moderado)=valor mínimo+2x
3er tercil (intenso)=valor mínimo+3x
E-cadherina 1er tercil= min-27.23, 2do tercil=27.24-54.08, 3er tercil= 54.09-max
α-SMA 1er tercil=min-38.414, 2do tercil= 38.415-71.76, 3er tercil= 71.77-max
Hic-5 1er tercil= min-39.235, 2do tercil=39.236-73.494, 3er tercil= 73.495-max

- Análisis de correspondencia

La relación entre la expresión de las proteínas, el IPN y la clasificación molecular se realizó por el método de análisis de correspondencia simple y múltiple, el cual es usado para analizar frecuencias formadas por dos o más variables categóricas a partir de una tabla de contingencia como la que se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Valores considerados para la generación de la tabla de contingencia

Tabla de Contingencia		VARIABLE Y (ejemplo: Expresión de E-cadherina)		
		Cat Y1	Cat Y2	Cat Y3
VARIABLE X (ejemplo: IPN)	Cat X1	Frec(X1,Y1)	Frec(X1,Y2)	Frec(X1,Y3)
	Cat X2	Frec(X2,Y1)	Frec(X2,Y2)	Frec(X2,Y3)
	Cat X3	Frec(X3,Y1)	Frec(X3,Y2)	Frec(X3,Y3)

Con los datos obtenidos en la tabla de contingencia se calculan puntuaciones de factores (coordenadas) para los puntos de fila (en el ejemplo es: IPN) y columna (en el ejemplo es: expresión de E-cadherina) de la tabla de contingencia. Estas coordenadas se utilizan para visualizar gráficamente la asociación entre los elementos de fila y columna en la tabla de contingencia. Los puntos de categorías cercanos nos indican mayor relación.

El análisis se realizó en los programas estadísticos STATA ver 13.0, SPSS ver 23.0, RStudio ver 1.1.383. y Excel 2013.

V. RESULTADOS

5.1. Obtención del índice pronóstico Nottingham

Las biopsias incluidas en este estudio fueron obtenidas de pacientes guerrerenses que acudieron por primera vez al Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltran Ortega (IECan), de Acapulco, Gro., con diagnóstico de CaMa.

A partir de los expedientes clínicos de las pacientes se generó una base de datos con información como las características histopatológicas y demográficas de las pacientes. En la tabla 4, se muestran las frecuencias del diagnóstico histológico de la población con respecto a la clasificación molecular (50 casos de carcinoma ductal infiltrante y 4 casos de carcinoma lobulillar infiltrante), en la clasificación molecular muestran una mayor frecuencia en el tipo Luminal A, seguido del Luminal B, Triple negativo y Her2+ (tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia del diagnóstico histológico con relación a la clasificación molecular del CaMa.

Diagnóstico histológico n (%)	Clasificación molecular				Total
	Luminal A	Luminal B	Her2 positivo	Triple negativo	
*Carcinoma ductal infiltrante (CDI)	21 (91.30)	12 (100.00)	7 (77.78)	10 (100.00)	50
Carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)	2 (8.70)	0 (0)	2 (22.22)	0 (0)	4

Los datos se reportan en frecuencia absoluta y relativa n (%).

*Dentro de este tipo histológico de CaMa se tiene: 1 CDI de tipo basaloide de localización retroareolar; 1 CDI con patrón tubular y focos de comedo, y un carcinoma papilar sólido sin borde específico.

Se calculó el IPN con la información obtenida de la base de datos y en la tabla 5 se muestran los datos que se requieren para realizar el cálculo y el resultado. Se presenta también el resultado del cálculo del IPN, y la distribución de las pacientes en grupos de bueno, moderado y mal pronóstico. De acuerdo a los resultados de la estratificación de las pacientes se tienen 16 pacientes dentro del grupo bueno, 33 en el grupo moderado y 6 en el grupo de mal pronóstico (tabla 6).

Tabla 5. Datos clínicos para calcular el IPN.

Folio	Etapas clínicas	Tamaño tumoral (cm)	Ganglios linfáticos positivos	Calculo del IPN*	Interpretación del IPN
20170691	IA	1.5	0	2.3	Bueno
20170865	IIA	1.5	0	3.3	Bueno
20171081	IIA	2	0	3.4	Bueno
20170321	IA	1.5	0	2.3	Bueno
20170262	IA	2	0	2.4	Bueno
20170731	IA	2	0	2.4	Bueno
20171182	IIA	0.5	0	3.1	Bueno
20170646	IIA	1.2	0	3.24	Bueno
20170014	IIA	1.5	0	3.3	Bueno
20171101	IIA	1.5	0	3.3	Bueno
20170227	IIB	1.8	0	3.36	Bueno
20170208	IIA	2	0	3.4	Bueno
20170228	IB	2	1	3.4	Bueno
20170645	IIA	2	0	3.4	Bueno
20170879	IIA	2	0	3.4	Bueno
20170974	IIA	2	0	3.4	Bueno
20170210	IIA	2.5	0	3.5	Moderado
20170763	IIA	2.5	0	3.5	Moderado
20170209	IIA	3	0	3.6	Moderado
20170597	IIA	3	0	3.6	Moderado
20171146	IIA	2	1	4.4	Moderado
20170684	IIB	3	0	3.6	Moderado
20170979	IIA	3.5	1	4.7	Moderado
20170737	IIA	3	0	3.6	Moderado
20170741	IIA	3	0	3.6	Moderado
20170885	IIA	3	0	3.6	Moderado
20170751	IIA	3.5	0	3.7	Moderado
20170815	IIA	4	0	3.8	Moderado
20170489	IIA	4.5	0	3.9	Moderado
20170420	IIB	1.2	1	4.24	Moderado
20170169	IIB	2	1	4.4	Moderado
20170277	IIB	2	1	4.4	Moderado
20170300	IIB	2	1	4.4	Moderado
20170342	IIA	2	1	4.4	Moderado
20170821	IIA	2	1	4.4	Moderado
20170942	IIA	2	1	4.4	Moderado
20171062	IIB	2	1	4.4	Moderado
20170458	IIB	3	2	4.6	Moderado
20170466	IIB	3	1	4.6	Moderado
20170588	IIA	3	1	4.6	Moderado
20170813	IIA	3	1	4.6	Moderado
20170883	IIB	3	1	4.6	Moderado
20170886	IIB	3	1	4.6	Moderado
20170939	IIB	3	1	4.6	Moderado
20170329	IIB	4	1	4.8	Moderado
20170852	IIB	4	1	4.8	Moderado
20170989	IIB	1.5	1	4.3	Moderado
20171057	IIB	2.5	1	4.5	Moderado
20170207	IIA	4.5	1	4.9	Moderado
20170037	IIIB	3.5	1	5.7	Mal
20171258	IIIA	3.5	1	5.7	Mal
20170255	IIIB	4	2	5.8	Mal
20170746	IIIA	5.5	1	6.1	Mal
20170529	IIIA	6	1	6.2	Mal
20170951	ND	3	1	5.6	Mal

*IPN= tamaño del tumor en cm x 0.2 + grado histológico (1-3)+ número de ganglios linfáticos positivos (1=0 ganglios; 2=1-3 ganglios y 3 >3). Interpretación: ≤3.4= Bueno, 3.41 a 5.4= Moderado, >5.4= Mal. ND=No determinado.

Tabla 6. Estratificación de las pacientes en grupos pronóstico de acuerdo al IPN

Datos para el cálculo del IPN n	IPN		
	Bueno ≤ 3.4	Moderado 3.41 a 5.4	Mal > 5.4
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Etapas clínicas ◆ Tamaño tumoral ◆ Ganglios linfáticos positivos 	16	33	6

Una vez realizada la estratificación de las pacientes de acuerdo al IPN se hizo una relación con las características clínicas de las pacientes de acuerdo a su grupo pronóstico (tabla 7). Se observa que las pacientes que se encuentran en el grupo de buen pronóstico son pacientes en etapas (IA, IB, IIA, IIB), las que se encuentran en grupo de pronóstico moderado son aquellas en etapas (IIA, IIB) y las que se encuentran en grupo del mal pronóstico son pacientes en etapas avanzadas (IIIA, IIIB) y estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.005$). En cuanto al tamaño del tumor se observa que este va en aumento a medida que el IPN es mayor con un valor de $p < 0.005$.

Tabla 7. Frecuencias y medias de las variables histopatológicas y clasificación molecular con respecto al IPN.

Variable	Índice Pronóstico Nottingham (IPN)			Valor de p
	Bueno (≤ 3.4)	Moderado (3.41 a 5.4)	Mal (> 5.4)	
Edad (años)	57 \pm 12.8	58.8 \pm 12.3	56.8 \pm 14.7	0.855 ²
Etapas clínicas n (%)				
IA	4 (100)	0 (0)	0 (0)	<0.001¹
IB	1 (100)	0 (0)	0 (0)	
IIA	10 (35.71)	18 (64.29)	0 (0)	
IIB	1 (6.25)	15 (93.75)	0 (0)	
IIIA	0 (0)	0 (0)	4 (100)	
IIIB	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
Clasificación molecular n (%)				
Luminal A	8 (34.78)	13 (56.52)	1 (8.70)	0.269 ¹
Luminal B	2 (16.67)	10 (83.33)	0 (0)	
Her2 positivo	1 (11.11)	6 (66.67)	2 (22.22)	
Triple negativo	4 (40)	4 (40)	2 (20)	
Tamaño del tumor	1.8 \pm 0.5	2.8 \pm 0.8	3.9 \pm 2	

Los datos se reportan en medias \pm desviación estándar y en frecuencia absoluta y relativa n (%).

¹ Prueba exacta de Fisher

² Anova

5.2. Inmunohistoquímica para E-cadherina, α -SMA y Hic-5

Para la Inmunohistoquímica, en el caso de los controles positivos, se empleó una laminilla de tejido de cérvix libre de cáncer para E-cadherina, una laminilla de tejido fibras musculares lisas para α -SMA y una laminilla de cáncer cervical para Hic-5 (figura 1). La expresión de E-cadherina se localizó en la membrana ya que ésta proteína forma parte de la adhesión célula-célula en células epiteliales, la expresión de Hic-5 en el citoplasma de las células tumorales cervicales y α -SMA se localizó en el citoplasma de las fibras musculares lisas.

La expresión de las tres proteínas en los 55 tejidos de CaMa se comparó entre las etapas clínicas del CaMa (figura 2). La expresión de E-cadherina se observa en etapas tempranas en las uniones adherentes de células luminales, mioepiteliales, y células tumorales de los ductos mamarios, también se observa en los acinos que conforman los lóbulos y a medida que avanza la etapa clínica la tinción se vuelve débil en la membrana y comienza a verse más señal en el citoplasma de las células tumorales, se muestra una desorganización celular con un infiltrado de células tumorales en el estroma del tejido, las células comienzan a tener un fenotipo mesenquimal (forma alargada), y hay pérdida en la relación núcleo citoplasma (figura 2,B1, 2, 3, 4, 5).

La expresión de α -SMA se observa en etapas tempranas del cáncer en células mioepiteliales de los ductos y lóbulos mamarios y a medida que el cáncer progresa, la expresión de esta proteína se hace evidente en el citoplasma de la mayoría de las células estromales del tejido y en células luminales de los ductos y lóbulos, donde se observan con una morfología mesenquimal, hay también una desorganización en la morfología del tejido y gran cantidad de células infiltradas e invadiendo el estroma mamario (Figura 2, C1, 2, 3, 4, 5).

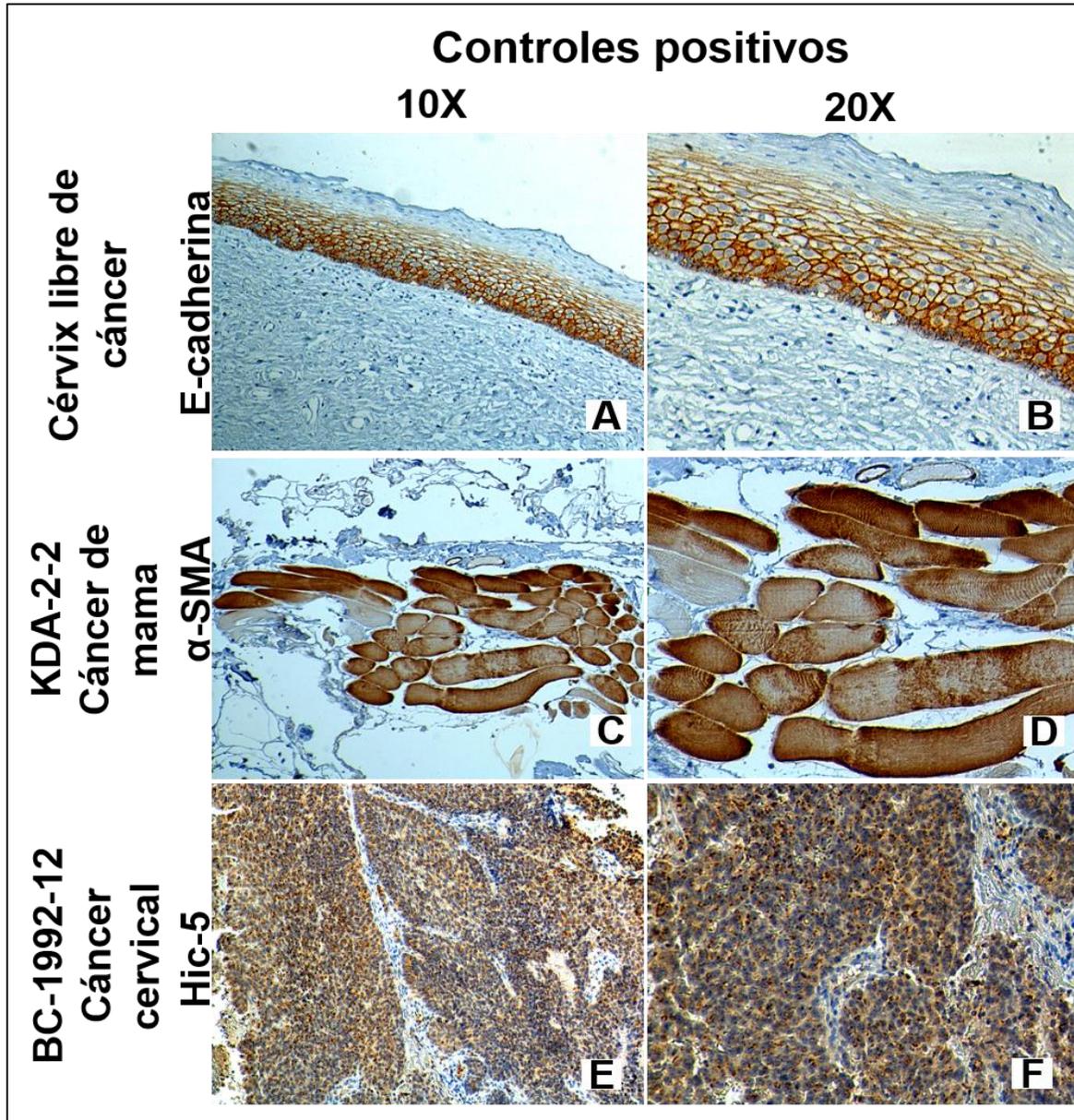


Figura 1. Controles positivos para E-cadherina, α -SMA y Hic-5. La expresión de α -SMA (coloración café) fue localizada en citoplasma de células de fibras musculares con objetivos 10X (A), 20X (B). La expresión de E-cadherina (coloración café) fue localizada en la membrana de células del epitelio cervical con objetivos 10X (C), 20X (D). La expresión de Hic-5 (coloración café) fue localizada en citoplasma y núcleo de células del epitelio cervical con objetivos 10X (E), 20X (F).

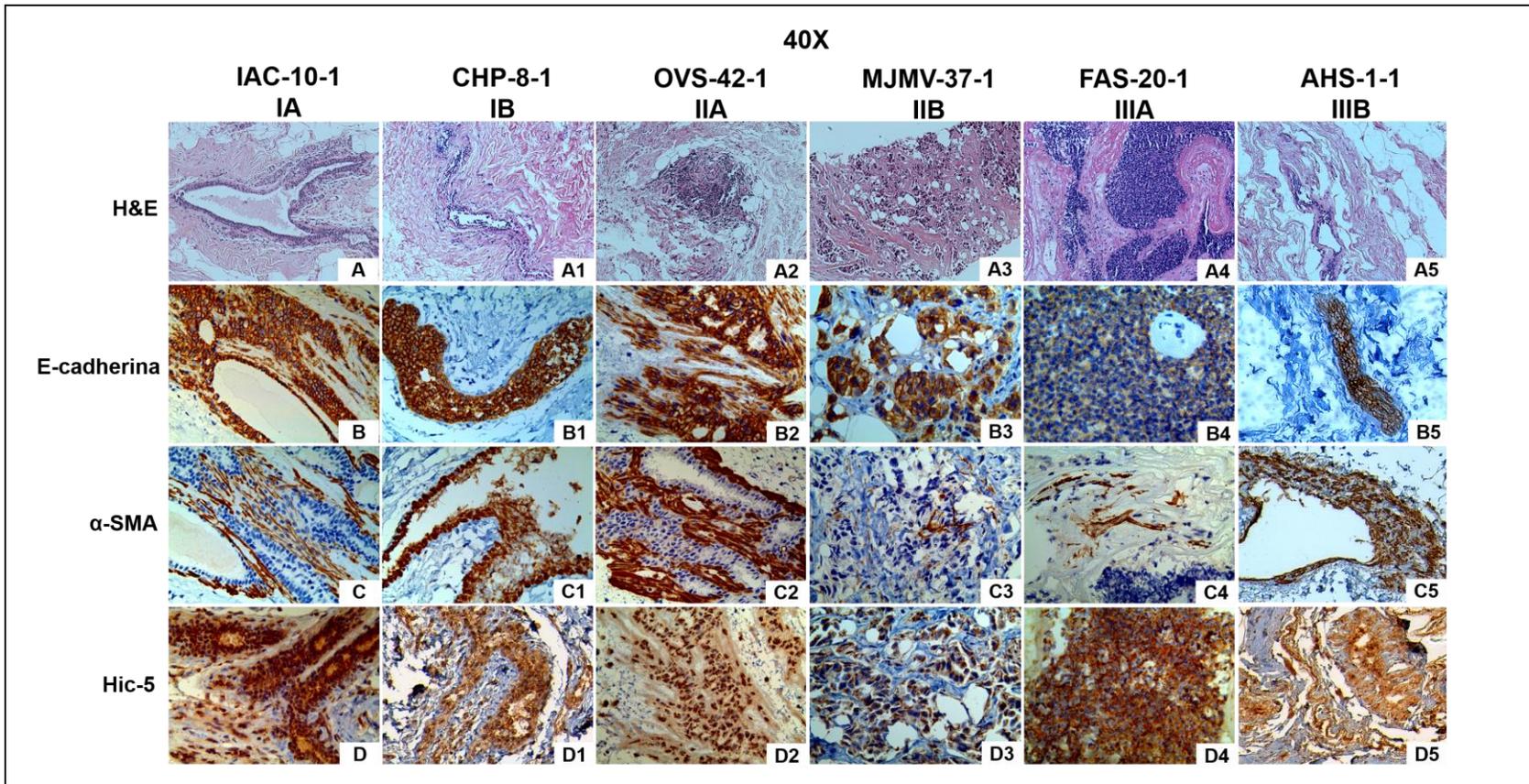


Figura 2. Expresión de E-cadherina, α -SMA y Hic-5 en diferentes etapas clínicas. La expresión de E-cadherina (coloración café) fue localizada en la membrana y citoplasma de células luminales y mioepiteliales. La expresión de α -SMA (coloración café) fue localizada en el citoplasma de células mioepiteliales, células del estroma, tumorales y luminales. La expresión de Hic-5 (coloración café) fue localizada en el citoplasma v núcleo de células luminales, mioepiteliales, células del estroma v tumorales.

La expresión de Hic-5 se observa en la mayoría de los casos desde etapas tempranas del cáncer en citoplasma y núcleo de las células luminales, mioepiteliales de los conductos mamarios y lóbulos, además las células tumorales y del estroma mamario también muestran señal de expresión de esta proteína en citoplasma (figura 2 D, 2, 3, 4, 5).

En la figura 3 se muestra la inmunohistoquímica de las diferentes clasificaciones moleculares de cáncer de mama. Para el tipo Luminal A, E-cadherina se expresa en las uniones celulares y citoplasma de un ducto segmentado alrededor se observa un infiltrado de células y estas no muestran tinción positiva a esta proteína, α -SMA se está expresando en citoplasma de células mioepiteliales y en el infiltrado que se encuentra alrededor del ducto segmentado en citoplasma de células estromales y tumorales, y para Hic-5 se expresa en núcleo y citoplasma de células mioepiteliales, luminales, células estromales y en el infiltrado celular que se encuentra alrededor del ducto segmentado (figura 3, B, C, D).

En el tipo Luminal B la tinción de E-cadherina se encuentra en mayormente en el citoplasma de células luminales observándose una desorganización del tejido y un infiltrado celular, α -SMA se encuentra en citoplasma de células luminales, mioepiteliales, células estromales y tumorales, en cuanto a Hic-5 la expresión se encuentra en núcleo y citoplasma de células luminales, mioepiteliales, células estromales y tumorales presentes en el estroma mamario (figura 3, B1, C1, D1).

En el tipo Her2+, E-cadherina se expresa en citoplasma de las células tumorales, α -SMA se expresa en células del estroma y Hic-5 en citoplasma de células luminales, en este tipo en particular se observan los núcleos de las células tumorales más agrandados en comparación con los otros tipos moleculares (figura 3, B2, C2, D2).

En el caso del tipo triple negativo la expresión de E-cadherina se encuentra en citoplasma de las células tumorales, α -SMA se encuentra expresada en células luminales, y células del estroma y Hic-5 se encuentra altamente expresado en todo el tejido en células tumorales y en células estromales (figura 3, B3, C3, D3).

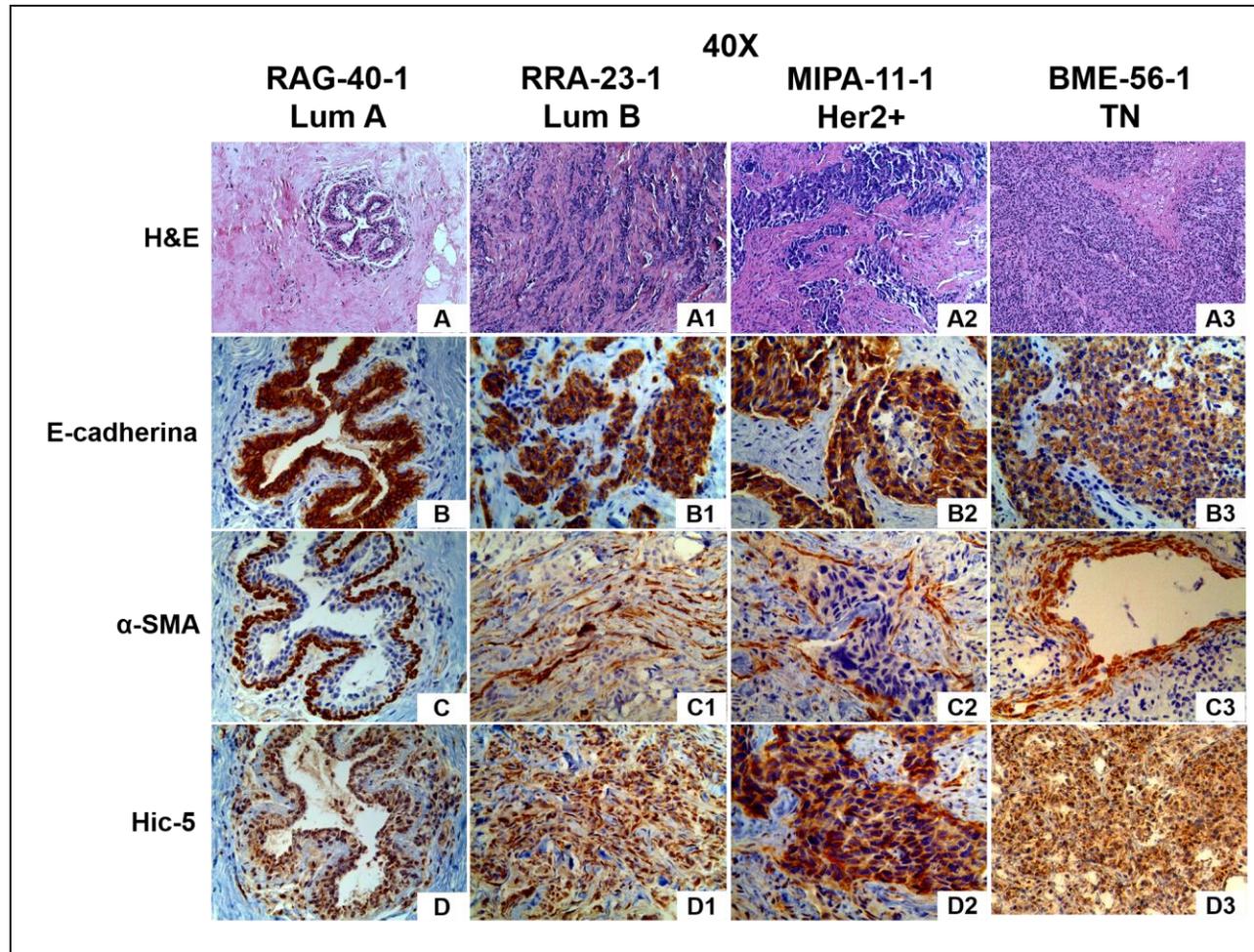


Figura 3. Expresión de E-cadherina, α -SMA y Hic-5, en los 4 tipos de clasificación molecular. En el tipo Lum A, E-cadherina se encuentra en membrana y citoplasma. α -SMA en citoplasma de células mioepiteliales. Hic-5 en citoplasma y núcleo de células mioepiteliales y luminales. En el caso del tipo Lum B, E-cadherina se encuentra en membrana y citoplasma. α -SMA en el citoplasma de células estromales. Hic-5 en citoplasma y núcleo de células mioepiteliales y luminales. En el caso de Her2+ E-cadherina se encuentra en membrana y citoplasma. α -SMA en citoplasma de células estromales y Hic-5 se encuentra en citoplasma y núcleo de células mioepiteliales y luminales. En el caso de TN, E-cadherina se encuentra en membrana y citoplasma. α -SMA en citoplasma de células estromales. Hic-5 se encuentra expresada en citoplasma y núcleo de células mioepiteliales y luminales.

En la figura 4 se observa la expresión de las tres proteínas en los diferentes grupos pronóstico. La expresión de E-cadherina en la membrana es intensa en el grupo de buen pronóstico limitándose únicamente en células luminales de los acinos que conforman el lóbulo, α -SMA se expresa en células mioepiteliales y Hic-5 se encuentra en células luminales y mioepiteliales de los acinos (figura 4, B, C, D), en el grupo de pronóstico moderado la expresión de E-cadherina se encuentra en membrana y citoplasma de células tumorales, α -SMA se expresa en células mioepiteliales, y Hic-5 en citoplasma de células tumorales (figura 4, B1, C1, D1), y para el grupo de mal pronóstico la expresión de E-cadherina se observa en membrana y citoplasma de células luminales y mioepiteliales, α -SMA en células luminales y mioepiteliales y Hic-5 en células del estroma en citoplasma y núcleo (figura 4 B2, C2, D2).

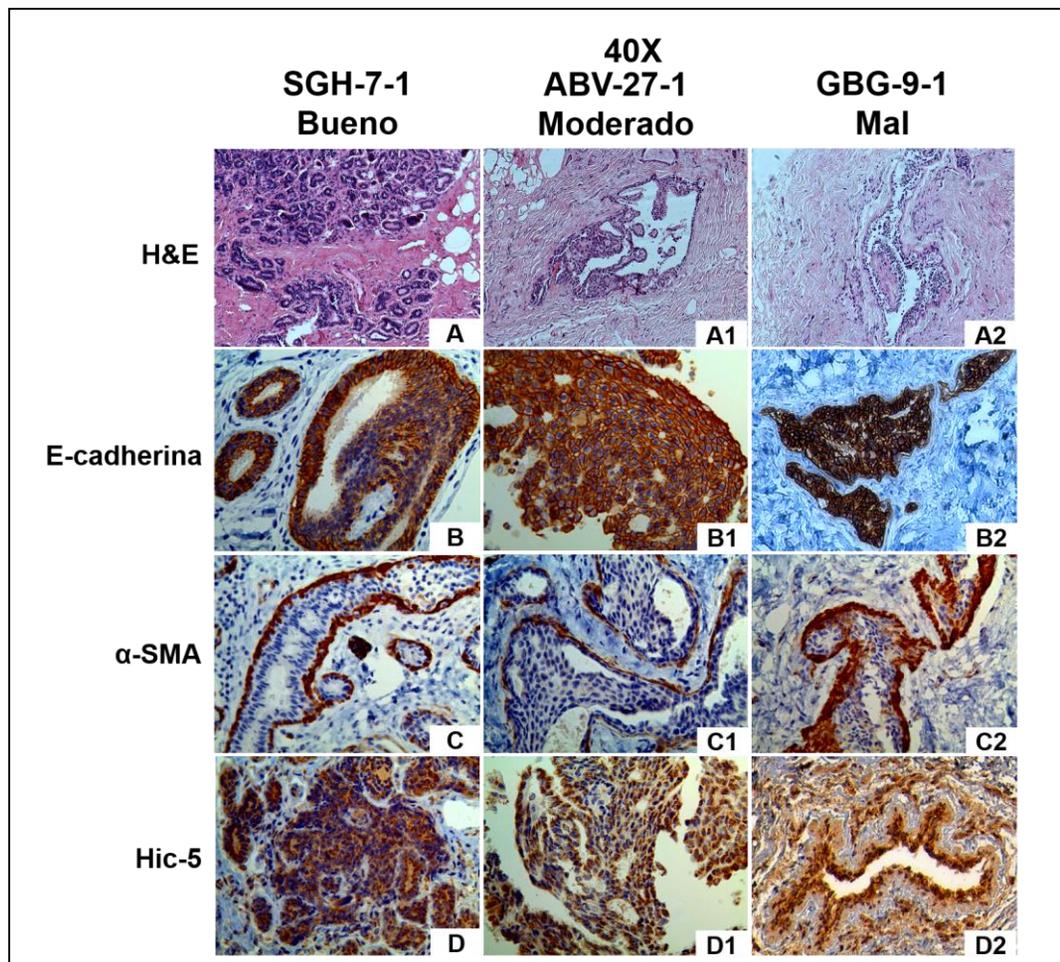


Figura 4. Expresión de E-cadherina, α -SMA y Hic-5, en los tres grupos pronóstico. En el caso de E-cadherina la expresión se encuentra en la membrana y citoplasma. α -SMA en citoplasma de células mioepiteliales. Hic-5 en citoplasma y núcleo de células mioepiteliales y luminales. En el grupo de pronóstico moderado E-cadherina se expresa en membrana y citoplasma de células tumorales. α -SMA en citoplasma de células mioepiteliales. Hic-5 en citoplasma y núcleo de células tumorales. En el grupo de mal pronóstico E-cadherina se encuentra en membrana y citoplasma de células luminales y mioepiteliales. α -SMA en citoplasma de células mioepiteliales y del estroma y Hic-5 en citoplasma y núcleo de células del estroma.

5.3. Relación de la expresión de E-cadherina, α -SMA y Hic-5 con el índice pronóstico Nottingham

Para evaluar la probable relación de la expresión de las tres proteínas con el índice pronóstico Nottingham se realizó un análisis de correspondencia el cual se usó para analizar frecuencias formadas por dos variables categóricas en este caso la expresión de E-cadherina con el IPN. En la figura 5 se muestra una gráfica bidimensional, la cual proporciona puntuaciones de factores (coordenadas) para los puntos de fila y columna de la tabla de contingencia. Estas coordenadas se utilizan para visualizar gráficamente la asociación o relación entre las variables.

Una alta expresión de E-cadherina se asocia con pacientes que se encuentran el grupo de buen pronóstico (esta asociación se muestra con los elipses), mientras que las pacientes que presentan una señal de esta proteína moderada se relacionan con el grupo de pronóstico moderado, y las pacientes que tienen una señal leve de la proteína son pacientes que se asocian con el grupo de mal pronóstico (figura 5).

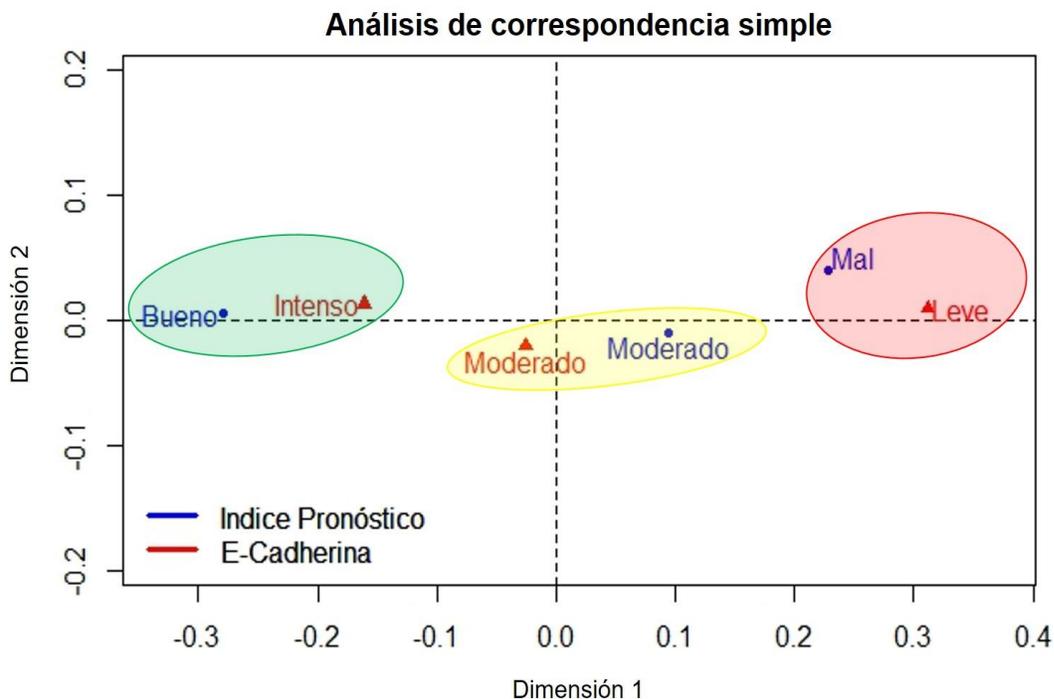


Figura 5. Relación de la expresión de E-cadherina con el IPN. El grupo de pacientes con buen pronóstico se asocia con pacientes que presentan niveles de expresión intenso, por el contrario al grupo de mal pronóstico que se relaciona con pacientes que presentan niveles de expresión leve para esta proteína.

En la figura 6 se muestra la asociación de la expresión de α -SMA con el IPN, en donde pacientes con una señal intensa de la proteína se asocian con pacientes que se encuentran en el grupo de mal pronóstico, una señal moderada con pacientes que se encuentran en el grupo de pronóstico moderado y una señal leve se relaciona con pacientes que están en el grupo de buen pronóstico (figura 6).

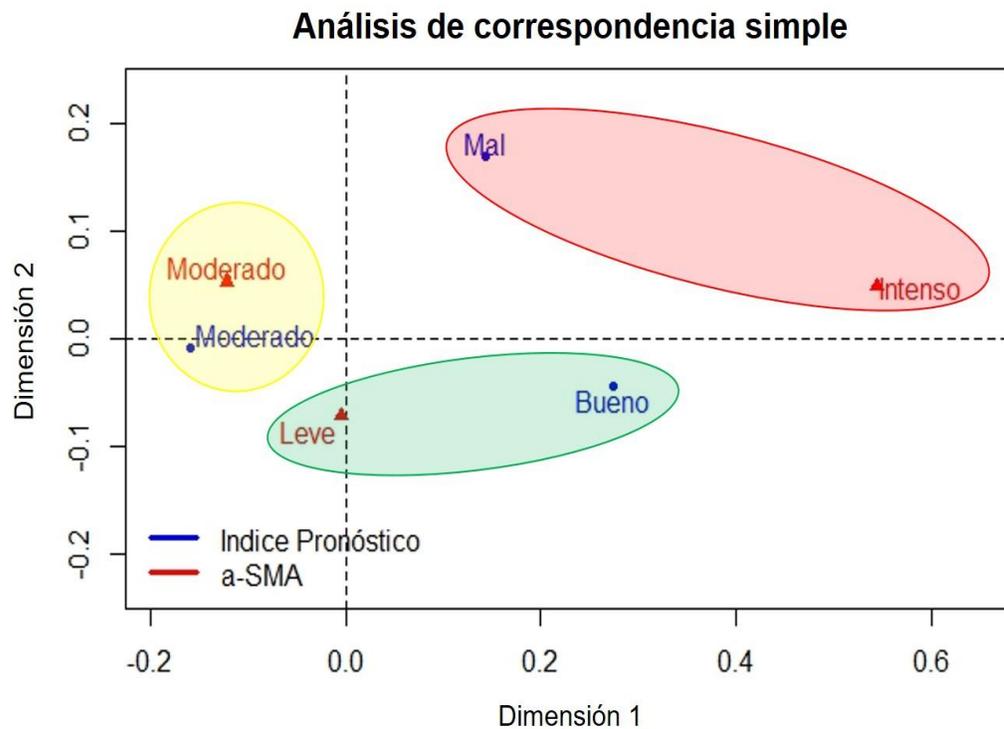


Figura 6. Relación de la expresión de α -SMA con el IPN. El grupo de pacientes con buen pronóstico se asocia con pacientes que presentan niveles de expresión leve, por el contrario al grupo de mal pronóstico que se relaciona con pacientes que presentan niveles de expresión intensa para esta proteína.

En la figura 7 se muestra la asociación de la expresión de Hic-5 con el IPN, en donde una señal intensa de la proteína se asocia con pacientes que se encuentran en el grupo de mal pronóstico, una señal moderada con pacientes que se encuentran en el grupo de buen pronóstico y una señal leve con pacientes que están en el grupo de pronóstico moderado (figura 7).

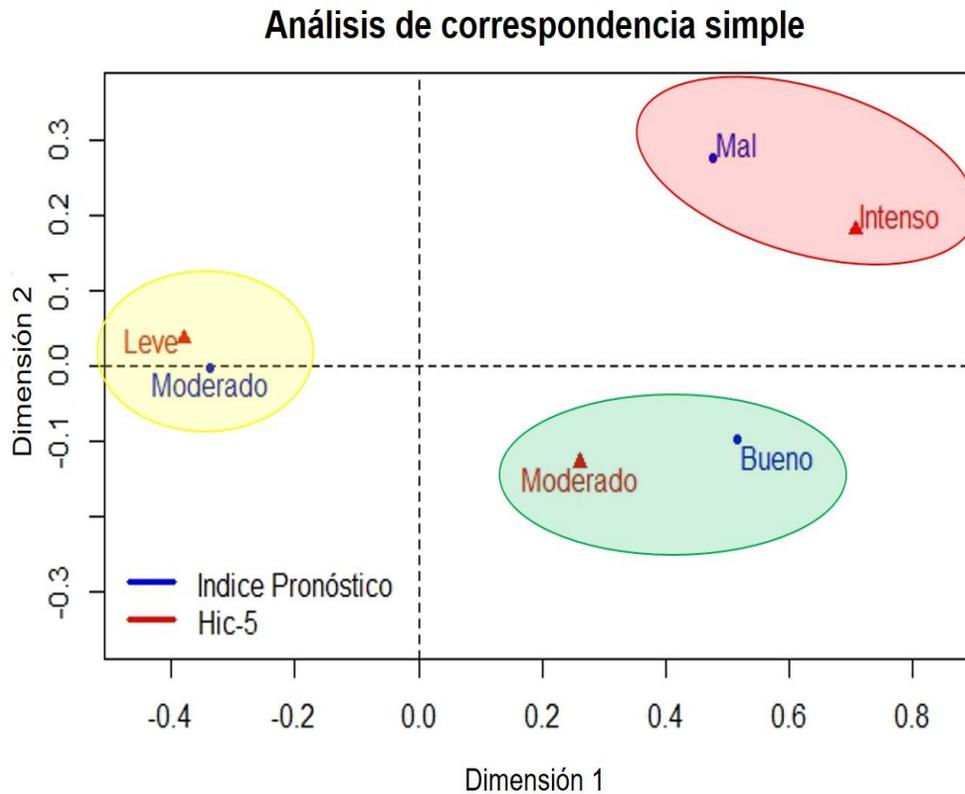


Figura 7. Relación de la expresión de Hic-5 con el IPN. El grupo de pacientes con buen pronóstico se asocia con pacientes que presentan niveles de expresión moderada y leve, por el contrario al grupo de mal pronóstico que se relaciona con pacientes que presentan niveles de expresión intensa para esta proteína.

Se realizó también una asociación entre los diferentes tipos de clasificaciones moleculares con el IPN. El tipo Luminal A se asocia con pacientes que se encuentran en el grupo de buen pronóstico, el Luminal B se asocia con el grupo de pacientes que se encuentran en el de pronóstico moderado mientras que los tipos Her2+ y Triple Negativo se asocian con pacientes que se encuentran en el grupo de mal pronóstico (figura 8).

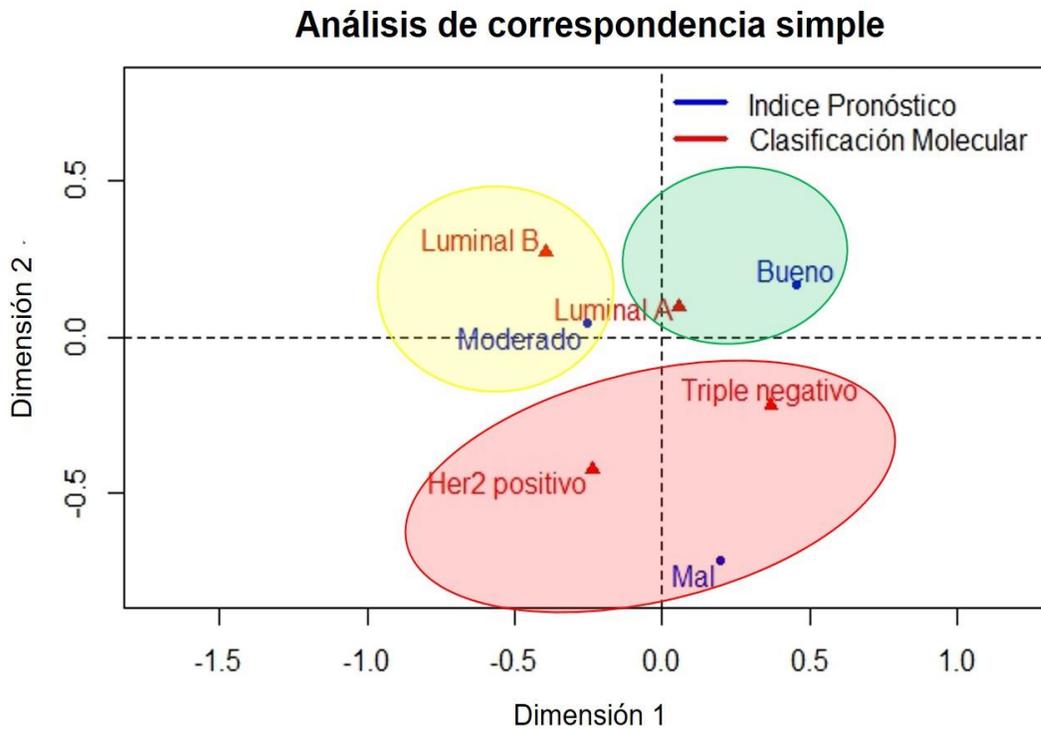


Figura 8. Relación de los diferentes tipos de clasificación molecular con el IPN. El grupo de pacientes con buen pronóstico se asocia con pacientes que presentan el tipo molecular Luminal A, el grupo de pronóstico moderado con el tipo Luminal B y el grupo de mal pronóstico se relaciona con pacientes que presentan los tipos tipos Triple negativo y Her2+.

Un análisis de correspondencia múltiple se realizó para ver la relación de la expresión de las tres proteínas, la clasificación molecular y el índice pronóstico Nottingham. Aquellas mujeres que se encuentran en grupo de buen pronóstico, se asocian con el grupo de clasificación molecular luminal A, con los grupos de intensidad de señal leve para α -SMA y Hic-5, y señal moderada e intensa para E-cadherina. Otra relación se muestra en el grupo de pronóstico moderado, donde la asociación se observa con el tipo molecular luminal B y una moderada señal para α -SMA y Hic-5. El grupo donde se encuentran las pacientes de mal pronóstico se asocian con los tipos moleculares Triple negativo y Her2+, y una señal intensa de α -SMA y Hic-5.

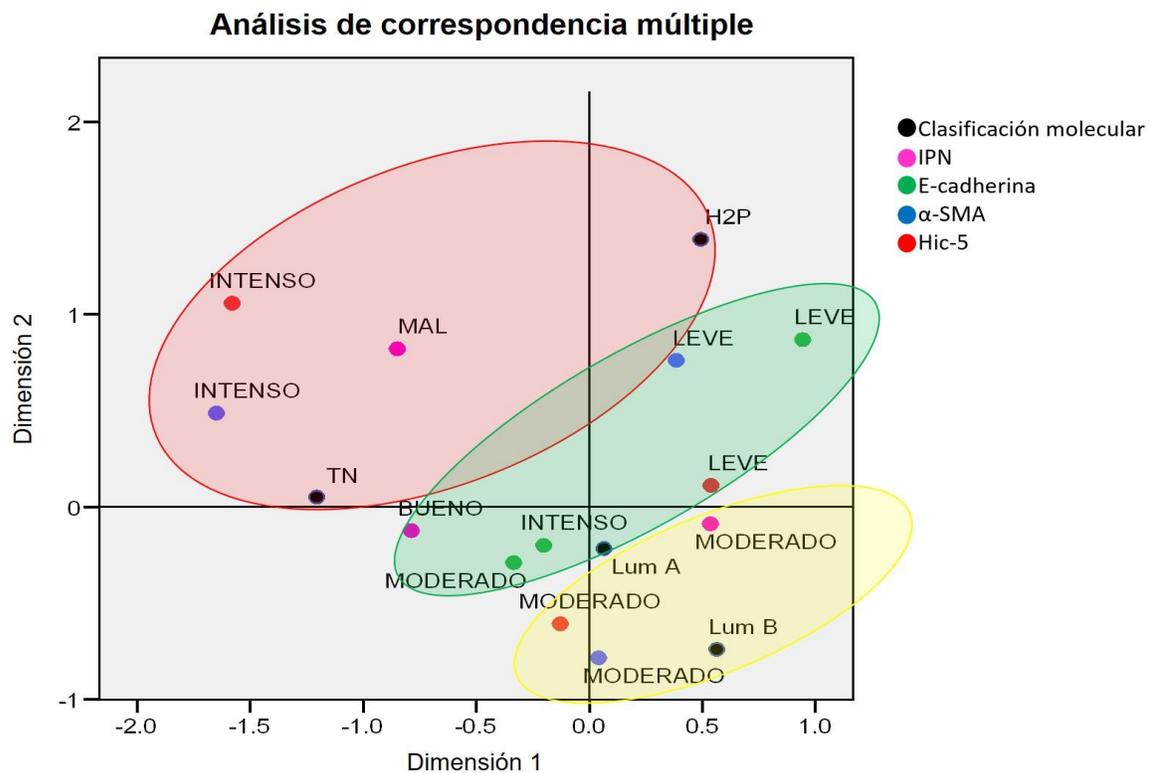


Figura 9. Relación de los grupos pronóstico, clasificación molecular, y la expresión de E-cadherina, α -SMA y Hic-5. En esta gráfica se muestra una asociación múltiple de las tres variables donde se observan asociaciones similares que se muestran en el análisis de correspondencia simple.

VI. DISCUSIÓN

El cáncer de mama (CaMa) representa un problema de salud en mujeres a nivel mundial. El CaMa presenta una gran variabilidad molecular, con diferentes características genóticas, fenotípicas, comportamiento y respuesta al tratamiento (Rakha *et al*, 2014). En vista de una necesidad urgente de identificar proteínas que puedan ser usadas para predecir el comportamiento tumoral, se han realizado estudios donde evalúan la expresión de algunas proteínas y además lo han relacionado con un índice pronóstico que ha ayudado a estratificar a las pacientes y esto sirva de ayuda para la toma de decisiones clínicas.

En este trabajo se obtuvieron 50 casos de carcinoma ductal infiltrante y 4 casos de carcinoma lobulillar infiltrante, y en cuanto a la clasificación molecular hay mayor frecuencia en el tipo Luminal A seguida por Luminal B, Triple negativo y el menos frecuente Her2+ (tabla 4) y esto concuerda con datos reportados por varios autores, Makki en el 2015 y Malhotra *et al.*, 2010 que reportan al carcinoma ductal como el más frecuente, así como en la clasificación molecular el tipo Luminal A (Malhotra *et al.*, 2010; Makki, 2015).

De acuerdo a la estratificación de las pacientes en este trabajo, en varios estudios se ha realizado este tipo de estratificación como los realizados por Kurshumliu y colaboradores en 2014 y Green y colaboradores en 2016, donde hacen la estratificación de acuerdo a la fórmula utilizada en este trabajo: $IPN = \text{Tamaño (cm)} \times 0.2 + \text{grado (1-3)} + \text{puntuación del ganglio linfático (1-3)}$.

En el presente trabajo se observa que en etapas tempranas del CaMa, las pacientes se encuentran en grupos bueno y moderado y en etapas avanzadas se encuentran grupo de mal pronóstico, con respecto al tamaño tumoral, se observa un aumento de tamaño a medida que incrementa el IPN. En cuanto a la edad no se observan diferencias entre los tres grupos pronóstico, pero si mencionando que la media de edad de las pacientes se encuentra entre los 56 y 58 años de edad. En la clasificación molecular tampoco se observan diferencias entre los grupos pronóstico, probablemente se deba a que las frecuencias no son iguales para cada tipo molecular, estas asociaciones se han realizado en otros trabajos como el

realizado por AbdElmonein y Zaghloul en el 2011, en donde la edad de las pacientes varió de 39 a 71 años y la media fue de 52 años y para las características clínico-patológicas de las pacientes no hubo una correlación significativa entre la expresión de ninguna proteína estudiada y el grupo de edad o el tipo histológico.

Se evaluaron tres proteínas mediante inmunohistoquímica una de ellas fue E-cadherina, esta proteína se encuentra formando parte de las uniones adherentes de células epiteliales en condiciones normales (Reed, 2015), sin embargo, en varios tipos de cáncer incluyendo el CaMa la pérdida de la función y de la expresión de E-cadherina es acompañada por la expresión de cadherinas mesenquimales como N-cadherina y cadherina 11 (Cavallaro y Christofori, 2004). La pérdida de E-cadherina puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, uno es la acumulación de mutaciones en el genoma cerca de los genes que codifican para cadherinas resultando en una inactivación específica en la expresión de cadherinas y que puede conducir a cáncer (Andrews *et al.*, 2012).

En el presente trabajo observamos que la expresión de E-cadherina en la membrana formando parte de las adhesiones adherentes en células de tipo luminal y mioepitelial disminuye a medida que el cáncer avanza, sin embargo se empieza a observar una mayor expresión de esta proteína en citoplasma de las células tumorales, la disminución de E-cadherina es un evento importante en la Transición Epitelio Mesénquima (TEM), además los cambios en la expresión de E-cadherina/N-cadherina se correlacionan positivamente con la evitación de anoikis y un aumento en la invasión celular (Škovierová, *et al.* 2017). Wheelock y colaboradores en 2007 mencionan que el cambio de E-cadherina por N-cadherina, donde esta última compite por la unión de p120 catenina y favorece la internalización de E-cadherina para que esta sea degradada en citoplasma (Wheelock *et al.*, 2007).

En otros trabajos como los realizados por Younis y colaboradores en 2007 y Singhai y colaboradores en 2011 han utilizado la expresión de E-cadherina para diferenciar entre carcinoma lobulillar y el carcinoma ductal, ya que en el primero E-cadherina es negativa en la mayoría de los casos (Younis, *et al.*, 2007; Singhai, *et al.*, 2011)

El estroma está compuesto de componentes no celulares y diversos tipos de células, incluidas células endoteliales, células inmunes y fibroblastos, que se propone que se activen en las etapas tempranas de la tumorigénesis y que sean el tipo de célula más abundante dentro del estroma del tumor de mama (Luo *et al.*, 2015). Funcionalmente, los fibroblastos sintetizan la matriz extracelular (MEC), regulan la inflamación y también desempeñan papeles críticos en la cicatrización de heridas. Aproximadamente el 80% de los fibroblastos en el estroma del cáncer de mama adquieren un fenotipo agresivo y contribuyen a la progresión del cáncer, incluido el crecimiento tumoral, la invasión y la metástasis directa o indirectamente a través de la activación parácrina por diversos factores de crecimiento, citocinas, proteasas y hormonas (Mao *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta los tumores como heridas que nunca cicatrizan, los fibroblastos predominantes en el tejido del cáncer de mama comparten algunas similitudes, como la expresión de actina del músculo liso α (α -SMA, ACTA2) (Hinz *et al.*, 2012). α -SMA normalmente es expresada por células del músculo liso, en células mioepiteliales y en fibroblastos asociados a cáncer (FACs) (Dugina, et al., 2015).

En el presente trabajo la expresión de α -SMA se observó en etapas tempranas en el citoplasma de células mioepiteliales, se observan también algunas células con morfología mesenquimal positivas a esta proteína, y a medida que la lesión progresa, la expresión de α -SMA se observó en el citoplasma de células luminales y tumorales. En etapas IIB, IIIA y IIB se observa expresión de esta proteína en células del estroma las cuales presentan una morfología fibroblastoide.

Yu y colaboradores en 2013, demostraron que los fibroblastos asociados a cáncer, podrían promover el potencial metastásico de células de CaMa con diferentes características incluyendo células luminales (MCF-7), células de tipo basal (MDA-MB-231) y células con ambas características luminales y mioepiteliales (PMC42-LA) a través de la inducción de la transición epitelio mesénquima por señalización parácrina de TGF- β (Yu, et al., 2013).

La Matriz Extracelular (MEC) provee un soporte estructural a las células y es rica en factores de crecimiento. Las adhesiones focales son sitios de adhesión célula-MEC

que tienen un papel importante en el mecanismo de detección por transducción de señales de la MEC que regulan el comportamiento celular (Goreczny *et al.*, 2016). La proteína de andamio/adaptadora de adhesión focal, HIC-5 (TGF β 1I1) se ha detectado en células mesenquimales incluyendo fibroblastos y osteoblastos, sin embargo, su expresión es baja en células epiteliales (Shibanuma *et al.*, 2011).

La expresión de Hic-5 en los tejidos se observó a partir de etapas tempranas expresándose en el citoplasma y algunos núcleos de células luminales, mioepiteliales, tumorales, células endoteliales y células del estroma, la expresión fue aumentando a medida que la etapa clínica era mayor.

De acuerdo con la localización de HIC-5 en las adhesiones focales, las proteínas identificadas con las que interactúa, son aquellas que se encuentran en el complejo de integrinas del dominio citoplásmico y que están involucradas en transducción de señales de integrinas y/o en el control de la dinámica del citoesqueleto de actina en las fibras de estrés. Las adhesiones focales no sólo son una estructura física sino también un mecanismo molecular que sensa la adhesión entre las células a la MEC y envía señales al interior de la célula, coordinando así, su motilidad, sobrevivencia y proliferación celular en respuesta al anclaje (Shibanuma *et al.*, 2011).

La expresión de Hic-5 se ha encontrado sobre expresada en fibroblastos asociados a cáncer de CaMa y lo han asociado a la TEM y formación de invadopodios (protrusiones de células tumorales ricas en F-actina) (Jena and Janjanam, 2018).

La localización de Hic-5 en núcleo ha sido reportada por varios autores entre ellos Van De Water y colaboradores en 2013 y por Shibanuma y colaboradores en 2012, donde mencionan que Hic-5 se transloca al núcleo de las células tumorales y puede ser retenido en él bajo condiciones altas de especies reactivas de oxígeno (H₂O₂) y sirve como un corregulador transcripcional de múltiples genes que promueven la supervivencia de la célula tumoral (Shibanuma, *et al.*, 2012; Van De Water, *et al.*, 2013).

Un análisis de correspondencia simple y múltiple se realizó para ver la relación entre el IPN, expresión de las proteínas y clasificación molecular. En la figura 5 en la gráfica bidimensional se observa que en aquellas pacientes donde hay una

expresión intensa de E-cadherina, hay relación con aquellas que se encuentran en el grupo de buen pronóstico, las que tienen expresión moderada se asocian con el grupo de moderado pronóstico y pacientes que tienen una expresión leve de E-cadherina, se relacionan con pacientes que se encuentran en grupo de mal pronóstico, estos resultados son coherentes con lo que se ha reportado de esta proteína, ya que al ser considerada como una proteína supresora de tumor, en un proceso tumoral se espera la disminución o pérdida de esta proteína por el cambio de N-cadherina (Lecuit and Yap, 2015; Andrews, *et al.*, 2012).

En la figura 6 se observa en el análisis de correspondencia, que aquellas pacientes que se encuentran en grupo de buen pronóstico se asocian con pacientes que tienen una expresión leve de α -SMA, las que se encuentran en grupo de moderado pronóstico con pacientes que tienen expresión moderada, y pacientes que tienen una expresión intensa de α -SMA con pacientes que se encuentran en grupo de mal pronóstico. En un estudio realizado por Amornsapak y colaboradores en 2017 el incremento de la expresión de α -SMA en células estromales de pacientes con cáncer de mama, se correlacionó con una tasa de supervivencia pobre (Amornsapak, *et al.*, 2017) y una sobreexpresión después de la quimioterapia predice una pobre respuesta al tratamiento (Wang, *et al.*, 2016).

El análisis de correspondencia para Hic-5 se muestra en la figura 7 que las pacientes que se encuentran en grupo de buen pronóstico se asocian con pacientes que tienen una expresión moderada de esta proteína, las que se encuentran en grupo de moderado pronóstico con las que tienen expresión leve, y pacientes con una expresión intensa de Hic-5 son pacientes que se relacionan con pacientes que se encuentran en el grupo de mal pronóstico. Hay pocos estudios sobre la expresión de Hic-5 en CaMa, sin embargo, el papel de esta proteína en varios tipos de cáncer incluyendo mama se ha encontrado que esta proteína induce la degradación de la matriz extracelular, migración celular e invasión vía TGF- β (Pignatelli, *et al.*, 2012). Con respecto a la clasificación molecular la cual se muestra en la figura 8, las pacientes que están en grupo de buen pronóstico son pacientes con el tipo Luminal A, las que se encuentran el grupo de pronóstico moderado son pacientes con el tipo Luminal B, y pacientes que se encuentran en el grupo de mal pronóstico son

pacientes con el tipo Her2+ y Triple negativo. En la última década, se han realizado esfuerzos por suplementar la clasificación molecular del CaMa, la cual ha servido para la predicción del comportamiento y de la respuesta al tratamiento, además de que nos provee una apreciación de la heterogeneidad del CaMa. Se han considerado dentro de los de buen pronóstico a el tipo Luminal A y Luminal B, y los que tienen un mal pronóstico son los tipo Her2+ y los Triple negativo (Makki 2015) tal como lo hemos encontrado en el presente trabajo.

VII. CONCLUSIONES

El índice pronóstico Nottingham se utiliza para estratificar a las pacientes con CaMa de fase temprana operable y se basa en características histopatológicas como tamaño tumoral, ganglios linfáticos positivos y estadio tumoral, que reflejan el comportamiento metastásico, la tasa de crecimiento y la inestabilidad genética de los tumores, las pacientes consideradas en el estudio se encuentran estratificadas dentro del grupo de buen, moderado y mal pronóstico.

El carcinoma ductal es el tipo histológico más frecuente, seguido del lobulillar, con respecto a la clasificación molecular, la mayor frecuencia lo ocupa el tipo Luminal A, seguido del Luminal B, Triple negativo y Her2+.

La relación entre las características clínicas y el IPN, mostró que las pacientes en etapas tempranas IA, IB, IIA se encuentran en grupos de bueno y moderado pronóstico, mientras que las de etapas avanzadas IIB, IIIA, IIIB son pacientes que se encuentran en el grupo de mal.

Las pacientes con una elevada expresión de E-cadherina se relacionan con pacientes que están en el grupo de buen pronóstico, las de expresión leve se relacionan con las que se encuentran en el grupo de mal pronóstico. Una leve expresión de α -SMA y Hic-5 se asocian con pacientes que se encuentran en el grupo de buen pronóstico mientras que una expresión intensa se relaciona con pacientes que se encuentran en el grupo de mal pronóstico.

Con respecto a la clasificación molecular, las pacientes con el tipo Luminal A se asocian con el grupo de buen pronóstico, las de tipo Luminal B con el grupo de moderado, y las que son triple negativo y Her2+ son pacientes que se relacionan con el grupo de mal pronóstico.

La pérdida de E-cadherina y la sobreexpresión de α -SMA y Hic-5 en el cáncer de mama desempeñan un papel central en la transición epitelio mesénquima. Estas proteínas, principalmente α -SMA y Hic-5 podrían proporcionar un valor adicional al IPN, de acuerdo al resultado de la expresión por inmunohistoquímica de ambos

biomarcadores, se podría sugerir una reconsideración en aquellas pacientes estratificadas en los grupos de bueno y moderado pronóstico.

VIII. REFERENCIAS

1. Abd ElMoneim, H, M., Zaghloul, N, M. (2011). Expression of e-cadherin, n-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *CLINICAL SCIENCE*. 10.1590/S1807-59322011001000015. 2011; 66(10):1765-1771.
2. Albergaria, A., Ricardo, S., Milanezi, F., Carneiro, V., Amendoeira, I., Vieira, D., *et al.* (2011). Nottingham Prognostic Index in Triple-Negative Breast Cancer: a reliable prognostic tool? *BMC Cancer*. 11:299. doi: 10.1186/1471-2407-11-299.
3. Amornsupak, K., Jamjuntra, P., Warnnissorn, M., O-Charoenrat, p., Sa-nguanraksa, D., Thuwajit, P., Eccles, S, A., and Thuwajit, C. (2017). High ASMA+ Fibroblasts and Low Cytoplasmic HMGB1+ Breast Cancer Cells Predict Poor Prognosis. *Clinical Breast Cancer*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2017.04.007>.
4. Andrews, J.L., Kim, A.C., and Hens, J.R. (2012). The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast Cancer Research*. 14:203. doi: 10.1186/bcr3065.
5. Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signaling by cadherins and IG-CAMS in cancer. *Nature*. 10.1038/nrc1276.
6. Chung, B.M., Rotty, J.D., and Coulombe, P.A. (2013). Networking galore: intermediate filaments and cell migration. *Current opinion in cell biology*. 25(5):600-12. doi: 10.1016/j.ceb.2013.06.008.
7. Dugina, V., Khromova, N., Rybko, V., Blisniukov, O., Shagieva, G., Chaponnier, C., Kopnin, B., and Kopnin, P. (2015). Tumor promotion by γ and suppression by β non-muscle actin isoforms. *Oncotarget*, Vol. 6, No. 16.
8. Goreczny, G.J. Ourderkirk-Pecone, J.L., Olson, E.C., Krendel, M., and Turner, C.E. (2016). Hic-5 remodeling of the stromal matrix promotes breast tumor progression. *Oncogene*. 10.1038/onc.2016.422.
9. Green, A.R., Soria, D., Stephen, J., Powe, D.G., Nolan, C.C., Kunkler, I., *et al.* (2016). Nottingham prognostic index plus: validation of a clinical decision making tool in breast cancer in an independent series. *The journal of pathology: clinical research*. 2(1):32-40, doi: 10.1002/cjp2.32.
10. Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., *et al.* (2012). Recent Developments in Myofibroblast Biology Paradigms for Connective Tissue Remodeling. *The American Journal of Pathology*. 10.1016/j.ajpath.2012.02.004.
11. Jena, M, K., Janjanam, J. (2018). Role of extracellular matrix in breast cancer development: a brief update. *F1000 RESEARCH*. 10.12688/f1000research.14133.2. 7:274.
12. Kurshumliu, F., Gashi-Luci, L., Kadare, S., Alimehmeti, M., and Gozalan, U. (2014). Classification of patients with breast cancer according to Nottingham Prognostic Index highlights significant differences in immunohistochemical marker expression. *World Journal of Surgical Oncology*. 10.1186/1477-7819-12-243. 12:243.
13. Laurinavicius, A., Laurinaviciene, A., Ostapenko, V., Dasevicius, D., Jarmalaite, S. and Lazutka, J. (2012). Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagnostic Pathology*. 7:27. doi: 10.1186/1746-1596-7-27.
14. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews*. 15(3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758.
15. Lecuit, T., and Yap, A, S. (2015). E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *NATURE CELL BIOLOGY*. Vol.17.5.
16. Luo, h., Tu, G., Liu, Z., and Liu, M. (2015). Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. 1; 361(2):155-63. doi: 10.1016/j.canlet.2015.02.018
17. Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*. 10.4137/CPath.S31563.
18. Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy* V. 10.4161/cbt.10.10.13879.
19. Mao, Y., Keller, E.T., Garfield, D.H., Shen, K., and Wang, J. (2012). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 10.1007/s10555-012-9415-3.

20. Ming, S.H., Mun, C., Hong, L., Onn, C., and Ching, S. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 121, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010>.
21. Pignatelli, J., Tumbarello, D. A., Schmidt, R. P., and Turner, C. E. (2012). Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF- β -induced epithelial–mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201108143. Vol. 197 No. 3 421–437
22. Rakha, E.A., Soria, D., Green, A.R., Lemetre, C., Powe, D.G., Nolan, C.C., *et al.* (2014). Nottingham Prognostic Index Plus (NPI): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *British Journal of Cancer*. 110(7):1688-97. doi: 10.1038/bjc.2014.1
23. Reed, A.E.M., Kutasovic, J.R., Lakhani, S.R. and Simpson, P.T. (2015). Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research*. 10.1186/s13058-015-0519-x.
24. Serrero, G., Hawkins, D.M., Bejarano, P.A., Loffe, O., Tkaczuk, K.R., Elliott, R.E. *et al.* (2016). Determination of GP88 (progranulin) expression in breast tumor biopsies improves the risk predictive value of the Nottingham Prognostic Index. *Diagnostic Pathology*. 11(1):71. doi: 10.1186/s13000-016-0520-4.
25. Shibanuma, M., Mori, K., and Nose, K. (2011). HIC-5: A Mobile Molecular Scaffold Regulating the Anchorage Dependence of Cell Growth. *International Journal of Cell Biology*. 10.1155/2012/426138.
26. Singhai, R., Patil, V. W., Jaiswal, S. R., Patil, S. D., Tayade, M. V., and Patil, M. V. (2011). E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *North American Journal of Medical Sciences*. 10.4297/najms.2011.3227. 2011; 3: 227-233.
27. Škovierová, H., Okajčková, T., Strnádel, J., Vidomanová, E., and Halašová, E. (2017). Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 10.3892/ijmm.2017.3320. 41: 1187-1200.
28. Van De Water, L., Varney, S., and Tomasek, J. J. (2013). Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention. *ADVANCES IN WOUND CARE*. 10.1089/wound.2012.0393. Vol.4.
29. Wang, T., Srivastava, S., Hartman, M., Buhari, S. A., Chan, C. W., lau, P., Khin, L. W., *et al.* (2016). High expression of intratumoral stromal proteins is associated with chemotherapy resistance in breast cancer. *Oncotarget*. Vol.7 No.34.
30. Wheelock, Y., Shintani, Y., Fukumoto, Y., and Johnson, K.R. (2007). Cadherin switching. *Cell science*. 121: 727-735. Doi: 10.1242/jcs.000455.
31. Younis, L. K., El Sakka, H., and Haque, I. (2007). The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. *International Journal of Health Sciences*. Vol. 1, No.1.
32. Yu, Y., Xiao, C.H., Tan, L.D., Wang, Q.S., Li, X.Q., and Feng, Y.M. (2013). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-b signaling. *British Journal of Cancer*. 10.1038/bjc.2013.768. 110, 724–732.
33. Zaha, D.C. (2014). Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*. 5(3):382-92. 10.5306/wjco.v5.i3.382.

