

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

***Detección de la expresión de los marcadores MMG y MAGE-A3,  
en células metastásicas, de ganglios linfáticos axilares  
histológicamente negativos incluidos en parafina y en tejidos frescos,  
de pacientes con cáncer de mama, mediante la PCR.***

**Autoras:** Avilés, Yessenia  
Balza, María

**Tutor:** Dr. Aldo Reigosa

**Asesor Metodológico:** Lic. Amarily Perelli

Valencia, octubre 2005



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
 FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
 ESCUELA DE BIOANALISIS  
 DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PROFESIONAL  
 ASIGATURA TRABAJO DE INVESTIGACION

**INSTRUCTIVO PARA EVALUAR EL CUARTO LAPSO**

Título del Trabajo:

DETERMINACION DE LA EXPRESION DE LOS MARCADORES HER2 Y HER3 EN CELULAS METASTASICAS DE CANCEROS LINFATICOS HISTOLOGICAMENTE NEGATIVOS INCLUIDOS EN PARAFINA Y EN FRESCO DE PACIENTES CON CANCER DE MAMA, MEDIANTE LA TECNICA DE P.C.R.

La calificación obtenida en la presentación y defensa del Trabajo fue:

Estudiante	P. Escrita (30%)	Diseño de la P. (10%)	P. Oral (20%)	Defensa y Discusión (10%)	Total
Br. AVILES YESSSENIA	20	20	20	20	20
Br. BALZA MARIA	20	20	20	20	20
Br.					
Br.					

ANARILY PERELLI	Liliana Castro	JOSE ESPINAL
Nombre:	Nombre:	Nombre:
C.I.: 3665286	C.I.: 6-882353	C.I.: 3.570.893
Firma	Firma	Firma

Valencia, 19 de 10 de 2005

Instrumento Diseñado por las Profesoras Rosalina González y Yunedy Marcano. Actualizado por las Profesoras Vita Calzolaio y Anarily Perelli



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

***Detección de la expresión de los marcadores MMG y MAGE-A3,  
en células metastásicas, de ganglios linfáticos axilares  
histológicamente negativos incluidos en parafina y en tejidos frescos,  
de pacientes con cáncer de mama, mediante la PCR.***

**Autoras:** Avilés, Yessenia  
Balza, María

**Tutor:** Dr. Aldo Reigosa

**Fecha:** Octubre 2005

**RESUMEN**

La detección histológica de metástasis en los ganglios linfáticos axilares es un parámetro de mayor valor pronóstico en cáncer de mama. Un 30 % de pacientes con ganglios linfáticos negativos tienen recaída en cinco años, sugiriendo que, este estudio no es suficiente para detectar todas las metástasis. En el presente estudio, se determinó la expresión de marcadores mamoglobina y MAGE-A3, en ganglios axilares histológicamente negativos de pacientes con cáncer de mama, mediante reacción en cadena polimerasa transcriptasa-reversa, a fin de detectar células tumorales aisladas o micrometástasis. La expresión mamoglobina y MAGE-A3 se detectaron en 55,6 % y 33,3 %, respectivamente. Se amplificó el ARN de mamoglobina y MAGE-A3 en ganglios histológicamente positivos en un 72,7 % y 54,5 %, respectivamente. Se relacionó la presencia o ausencia de células tumorales en ganglios negativos con tamaño tumoral, grado histológico, émbolos neoplásicos vasculares, obteniendo resultados no concluyentes, no se logró distribución equitativa de las muestras. Estos resultados muestran que la mamoglobina y MAGE-A3 son útiles para detección de células tumorales aisladas en ganglios axilares negativos.

**Palabras clave:** Cáncer, mama, diagnóstico, ganglios linfáticos axilares, mamoglobina, MAGEA3.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El carcinoma mamario es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la mujer, alcanzado la tercera posición entre los diagnósticos de cáncer en los países desarrollados y la quinta en los países en vías de desarrollo (Capote, 1996).

Se estima que constituye el 22% de los cánceres femeninos, 26% en países desarrollados, en los cuales es más del doble la ocurrencia de cáncer en mujeres. Las áreas de alto riesgo son las poblaciones de Norte América, Europa y Australia, donde el 6% de las mujeres desarrollan cáncer invasor antes de los 75 años. El riesgo de cáncer de mama es bajo en regiones menos desarrolladas como África y el Sur-Este de Asia (Ellis, 2003).

Su incidencia tiende a aumentar en todo el mundo independientemente de las variables raza, edad, costumbres, estado socioeconómico o cultural. En contraste, los índices de mortalidad han variado muy poco, probablemente como consecuencia de varios factores, entre los cuales se encuentran una estimación más precisa de la incidencia, el conocimiento de los factores de riesgo, diagnóstico precoz y un avance en el tratamiento (MSDS, 1999).

En Venezuela se ha observado un aumento progresivo de su incidencia llegando a alcanzar 25x100000 mujeres, es decir, que el riesgo de tener cáncer de mama se estima en 2,5 a 3%, lo cual indica que una de cada 30 mujeres en Venezuela tendría cáncer de glándula mamaria en el curso de su vida. Para el año 1999 ocurrieron 1019 defunciones por esta patología,

diagnosticándose 2497 casos; ubicando el cáncer de mama como tercera causa de muerte por cáncer en el país (MSDS, 1999).

El cáncer por definición consiste en la transformación de células benignas en células malignas que crecen en forma autónoma y desordenada, ocasionado por una mutación o alteración de un gen. Las células alteradas proliferan hasta conformar el tumor, en forma de nódulo o masa, el cual, en el caso de la mama, puede derivarse de los diferentes tejidos o elementos que constituyen la anatomía de la glándula mamaria (Tavassoli, 2001).

Una de las características de malignidad del cáncer es su capacidad de diseminarse a otros tejidos a partir de un tumor primario (metástasis), por una de las tres vías siguientes: implantaciones en órganos, propagación a través de la sangre y propagación linfática. Esta última es la principal vía de invasión del cáncer mamario. La primera estación de la diseminación linfática la constituyen los ganglios linfáticos axilares (Donegan y Spratt, 1982).

La etiología del cáncer de mama es multifactorial e involucra, el sexo, la dieta, factores reproductivos, desbalances hormonales, alteraciones genéticas, antecedentes familiares tales como, la predisposición genética heredada y la incidencia familiar de cáncer de mama, mujeres que hayan padecido una enfermedad proliferativa previa. Todos estos factores importantes para la identificación de la paciente de “alto riesgo”, son fundamentales para ofrecer controles preventivos (Contreras, 2001).

Para una paciente la evolución del cáncer de mama es impredecible. Algunas mueren de enfermedad metastásica en un año, mientras que otras sobreviven varias décadas. Debido a la variabilidad del curso clínico de la enfermedad, ha sido de mucho interés identificar las características predictivas del comportamiento tumoral o factores pronósticos. Entre los factores pronósticos reconocidos para el cáncer de mama se encuentran:

Tamaño del tumor: Es el más simple de medir, el más económico y tan bueno que junto con el estado de los ganglios axilares y la existencia o no de metástasis, es la base de la clasificación TNM (Tamaño del tumor, Numero de ganglios y Metástasis). El aumento del tamaño del tumor está relacionado con una mayor probabilidad de ganglios positivos; además, representa un mayor riesgo de recaída y de mortalidad (Contreras, 2001).

Tipo histológico: Ciertos tipos histológicos de cáncer se asocian con un mejor pronóstico que otros, y su identificación por el médico es importante. Los tumores con histología favorables son reconocidos sobre la base de sus características macroscópicas y microscópicas. Comparados con el carcinoma ductal infiltrante, los tumores se clasifican en los de mejor pronóstico: papilar, medular, mucinoso, adenoideo quístico y tubular y los de peor pronóstico: metaplásico, y células en anillo de sello (Kumar, Cotran y Robbins, 1997).

Grado histológico: Esta característica puede ofrecer una información pronóstica muy importante, ya que valora tres factores: primero, el grado de formación de túbulos, segundo, regularidad en el tamaño, forma y carácter de tinción del núcleo y tercero la actividad mitótica. A cada uno de estos parámetros se les asignó una valoración del 1 al 3, pudiéndose alcanzar una calificación total de 3 a 9 para un determinado tumor. Una calificación de 3 a 5 etiqueta a los carcinomas como un tumor de grado I (bien diferenciado) 6 a 7 como grado II (moderadamente diferenciado) y 8 a 9 como grado III (poco diferenciado) (Bloom y Richarson, 1957).

Finalmente, Helpap (1989) propuso una modificación del método de Bloom y Richarson para incluir los hallazgos nucleares tales como su frecuencia, tamaño, número y localización.

Metástasis en los ganglios linfáticos axilares: Esta es la variable pronóstica más importante. Las metástasis pueden ser macro y micro metástasis, estas

últimas son definidas por su tamaño; el cual no puede ser mayor de 2 mm de diámetro, es decir, una célula única o un grupo de células cuyo tamaño no exceda de 2 mm. Otro grupo de autores definen micrometástasis cuando menos del 20% del ganglio linfático está comprometido por la metástasis (Kumar, 1997).

El número de ganglios linfáticos comprometidos es inversamente proporcional a la sobrevida del paciente. Si los ganglios linfáticos axilares metastásicos son separados en niveles pueden obtenerse datos de mayor significado pronóstico. Sin embargo, el número total de ganglios linfáticos comprometidos, más que el nivel de compromiso, sigue siendo el factor de mayor significado pronóstico (Díaz, 1996).

Por otro lado, si la infiltración metastásica de los ganglios linfáticos puede ser detectada macroscópicamente, el pronóstico es peor, que si las metástasis son de tamaño microscópico. La extensión de las metástasis al tejido extraganglionar se asocia con un pronóstico desfavorable. Los pacientes con metástasis “ocultas” demostradas por sección seriada de los ganglios linfáticos axilares, que inicialmente fueron catalogadas como libres de metástasis por histología, tienen una sobrevida a los cinco años similar a la de los pacientes con ganglios sin metástasis (Ellis y Tavassoli, 2003).

Invasión vascular: Los vasos sanguíneos y los linfáticos que se encuentran alrededor de un carcinoma ductal infiltrante pueden estar invadidos por células tumorales. Su identificación es importante ya que tiene un significativo valor de predicción sobre la recurrencia local precoz y metástasis distantes, indicando también una mayor probabilidad de fracaso terapéutico (Nime, Rosen y Thaler, 1997).

En vista de la heterogeneidad que presenta el carcinoma mamario en términos de su perfil biológico y progresión clínica, se hace necesario determinar

el estadio clínico, el cual se realiza mediante el sistema internacional TNM, que incluye el análisis del tamaño, extensión del tumor (T), el número de ganglios linfáticos afectados (N) y la presencia de metástasis (M); permitiendo agrupar el cáncer de mama en cuatro estadios clínicos: Estadio I, tumor primario pequeño (<2cm) sin afectación ganglionar. Estadio II, tumor primario mayor de 2cm y/o con afectación ganglionar. Estadio III, tumor primario mayor de 5cm y/o con afectación extensa de los ganglios linfáticos. Estadio IV, metástasis a distancia. Esta clasificación sirve para tener una mayor orientación hacia un pronóstico certero y un tratamiento eficaz (Singletary, 2002).

El diagnóstico del cáncer de mama, comienza por una exhaustiva historia clínica y un examen físico, que incluye la inspección y palpación de las mamas. Posteriormente se realiza el estudio imagenológico y luego el histológico, el cual consiste en la evaluación de una sección del tejido tumoral o de una metástasis a través de una biopsia. Los principales factores limitantes son el número de cortes que pueden ser examinados por histología, la variabilidad biológica de las células malignas y el hecho de que las micrometástasis puede ser tan pequeña que pasen desapercibidas por el anatomopatólogo, aun cuando se estudien muestras seriadas de tejido ganglionar (Ellis, 2003).

El pronóstico se ensombrece considerablemente en pacientes con metástasis en los nódulos linfáticos axilares. Estudios retrospectivos han sugerido que un número considerado de pacientes con nódulos linfáticos histológicamente negativos, pueden desarrollar cáncer a través del tiempo, sugiriendo que los métodos de rutina son inadecuados para identificar precozmente estas metástasis. Se han establecido tres situaciones para dichos pacientes: aquéllos con bajo riesgo de recaída, los que responden a las terapias específicas y los de alto riesgo. En estos últimos se ha demostrado el efecto beneficioso de la quimioterapia. Por lo tanto, será de un gran valor clínico poder identificar con certeza a los pacientes de alto riesgo (Musé y Sabini, 1996).



Actualmente en el plano de la investigación científica, se han venido implementando principios y técnicas de biología molecular más sensibles y específicas, que permiten caracterizar las alteraciones moleculares causadas por el cáncer. Una de estas técnicas es la RT-PCR, procedimiento *in vitro* que permite la amplificación y localización de una cantidad de moléculas dianas de ARN (ARNm o ARN total), de marcadores tumorales, evaluando así gran cantidad de tejido (Marchetti, 2001).

En tal sentido Noguchi y cols., (1996), investigaron metástasis oculta en nódulos linfáticos a través del marcador keratina 19 (CK-19) por la técnica RT-PCR en pacientes con cáncer de mamas. Utilizando tres grupos de muestra: pacientes con ganglios linfáticos negativos por histología y por PCR (metástasis negativa), pacientes con ganglios histológicamente negativos-PCR positivos (metástasis oculta positiva), y pacientes con ganglios linfáticos histológicamente positivos (metástasis positiva); para estudiar varios parámetros histológicos como tamaño del tumor, tipo y grado histológico e invasión vascular. Demostrando que no había una diferencia significativa entre los parámetros histológicos estudiados en el grupo de pacientes con metástasis positivas y el grupo con metástasis oculta. Por el contrario, si encontraron que el tamaño del tumor es mayor en pacientes con metástasis (detectable y oculta) que, en el grupo sin metástasis, concluyendo que las características histológicas de los pacientes con metástasis son similares a las de pacientes con metástasis detectables por PCR, sin embargo, ambos presentaron diferencias histológicas con respecto a los pacientes que no muestran metástasis.

En el año 1999 Watson y cols., en su estudio “Expresión de mamaglobina (MMG) en metástasis primaria y metástasis oculta”, evaluaron la frecuencia con la cual la expresión de MMG puede ser detectada en tumores primarios y en células tumorales de mama presentes en circulación periférica. 10 de 11 nódulos linfáticos metastásicos de pacientes con cáncer de mama contenían ARNm de MMG por RT-PCR, mientras que la expresión de ésta en nódulos linfáticos no

comprometidos fue indetectable. Este resultado, sugiere que la detección de MMG podría ser considerado como una herramienta útil para el diagnóstico de pacientes con cáncer de mama.

En ese mismo año Leygue y cols., estudiaron la expresión de MMG en 20 tumores primarios de mama y sus correspondientes ganglios linfáticos, encontrando que los 13 ganglios positivos y ninguno de los 7 ganglios negativos para metástasis por histología, fueron positivos a MMG por PCR. Estos resultados sugieren que la MMG, puede ser un marcador de metástasis en ganglios linfáticos axilares.

Posteriormente, en el año 2001, Manzotti y cols., identificaron a través de RT-PCR, marcadores ARNm de MASPIN, citoqueratina 19, MMG-1, antígeno carcinoembrionario (CEA) y MUC-1, para la detección de metástasis en nódulos linfáticos centinelas de pacientes con cáncer de mamas. Luego compararon la sensibilidad de dichos marcadores con la precisión diagnóstica de un examen histopatológico de estos nódulos. Cuando analizaron individualmente los marcadores observaron que ninguno fue lo suficientemente sensible, además de no encontrar concordancia con los estudios histopatológicos. Finalmente concluyeron que cuando se expresó un mínimo de dos de tres marcadores (MASPIN, citoqueratina 19 y MMG) se lograba una mayor sensibilidad y exactitud que con el estudio histológico.

En ese mismo año Marchetti y cols., investigaron la expresión de 7 marcadores (CEA, CK-19, c-MET, MMG, MUC1, B1-GalNac-t y p97), en nódulos linfáticos axilares de 248 pacientes con cáncer de mama con y sin evidencia histológica de metástasis. 97% de los pacientes con metástasis expresaron ARNm de MMG, mientras que un 79% expresó ARNm de CEA. Los otros marcadores demostraron no ser específicos para cáncer de mama. En los pacientes con ganglios histológicamente negativos fue expresado un 29% de MMG y un 20% de CEA, indicando la presencia de metástasis no detectada por examen histológico.

Estos resultados demuestran que la sensibilidad de la MMG es superior a la del CEA, permitiendo el diagnóstico de metástasis oculta en aproximadamente uno de tres casos.

Por otro lado, Washer y cols., (2001), evaluaron por medio de la prueba RT-PCR, la utilidad del MAGE-A3 como un marcador molecular valioso para la detección de células tumorales metastásicas, en nódulos linfáticos centinelas de pacientes con cáncer de mama, con estadíos I-III. El ARNm de MAGE-A3, fue expresado en 22 de 48(46%) nódulos linfáticos centinelas que resultaron positivos a metástasis por histología e inmunohistoquímica; y en 28 de 73 (38%) nódulos linfáticos centinelas histológicamente negativos por histología e inmunohistoquímica. Debido a la alta especificidad demostrada, estos investigadores, llegaron a la conclusión de que el MAGE-A3, es un potente marcador para el estudio de células metastásicas de cáncer de mama.

Al respecto, Bossolasco y cols., en el año 2002, detectaron células micrometastásicas con genes de MMG en medula ósea y sangre periférica de 60 pacientes con cáncer de mama, a través de RT-PCR para el estadiage de la enfermedad. Por otra parte, examinaron varios controles positivos y negativos para probar la especificidad de este marcador. Los pacientes con metástasis por histología, expresaron MMG en un 23% y los pacientes sin metástasis expresaron mamaglobina en un 9%, estos últimos desarrollaron posteriormente el tumor. Debido a esto el PCR parece ser un buen predictor de recaídas. Los genes de MMG se perfilan como marcadores sensibles y específicos, para detectar micrometástasis en células de pacientes con cáncer de mama y su presencia se correlaciona con el estadio de la enfermedad.

Basados en los resultados obtenidos de los trabajos antes descritos, se seleccionaron para la realización de este estudio los marcadores moleculares MMG y MAGE-A3. La MMG se expresa principalmente en células epiteliales de mama y se sobreexpresa en muchos tipos de tumores de mama; este hecho ha

sido utilizado para detectar células cancerosas de mama en, circulación periférica, medula ósea y metástasis oculta en nódulos linfáticos axilares de pacientes con cáncer de mama. Es por ello que la expresión de este marcador, podría proveer evidencias suficientes que garanticen un amplio estudio clínico, una detección temprana del cáncer de mama, un estadiage preciso, un mejor pronóstico y un monitoreo adecuado de la paciente. Sin embargo, el papel de la MMG es completamente desconocido (Nuñez, 2003).

El gen de MAGE-A3 es uno de los marcadores tumorales que no se expresa en tejido normal, excepto en la placenta y células germinales masculinas. Por otra parte, los péptidos y proteínas del gen de MAGE-3 son inmunogénicos, y pueden inducir citotoxicidad en los linfocitos T y anticuerpos en el paciente. Usualmente es utilizado para la detección de células cancerosas de mama en nódulos linfáticos axilares (Washer, 2001).

Por lo antes mencionado, surge la necesidad de investigar la expresión de los marcadores MAGE-A3 y MMG por PCR, para la detección de células metastásicas en ganglios linfáticos histológicamente negativos, contenidos en bloques de parafina y en tejido fresco de pacientes con cáncer de mama. Con el fin de establecer con que frecuencia ocurre este hecho en nuestro medio, para la puesta a punto de la técnica usando cebadores específicos para células malignas y dependiendo de los resultados, la posible incorporación como análisis complementario de rutina en pacientes con cáncer de mama.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de los marcadores MMG y MAGE-A3, en células metastásicas de ganglios linfáticos axilares histológicamente negativos, incluidos en parafina y en tejido fresco, de pacientes con cáncer de mama, mediante la PCR.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar por PCR la expresión de los marcadores MMG y MAGE-A3 en ganglios linfáticos axilares histológicamente positivos a micrometástasis, de pacientes con cáncer de mama.
- Determinar por PCR la expresión de los marcadores MMG y MAGE-A3 en ganglios linfáticos axilares histológicamente negativos a micrometástasis, de pacientes con cáncer de mama.
- Comparar la expresión de los marcadores MMG y MAGE-A3 evaluados por PCR, con el estudio histológico de los ganglios linfáticos axilares de pacientes con cáncer de mama.
- Relacionar la presencia o ausencia de micrometástasis en ganglios linfáticos axilares histológicamente negativos, con el tamaño del tumor, grado histológico y émbolos neoplásicos vasculares.

## **CAPITULO II**

### **MARCO METODOLOGICO**

#### **Tipo de Investigación**

La presente investigación es no experimental de campo, de corte transversal y de tipo descriptivo. Una investigación no experimental es aquella en la que no se manipulan de forma deliberada las variables. Es un estudio transversal ya que la recolección de datos se realiza en un solo momento y en tiempo único; su propósito es describir variables y analizar su incidencia e interrelación en un momento dado y por ultimo se clasifica como descriptiva, porque se caracteriza un hecho o fenómeno con el fin de establecer su estructura y comportamiento (Pallela y Martins, 2003).

#### **Población**

Conformada por pacientes con adenocarcinoma ductal infiltrante de mama, diagnosticadas en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" de Valencia-Edo. Carabobo, durante el año 2004.

#### **Muestra**

Estuvo conformada por ganglios linfáticos axilares histológicamente positivos y negativos distribuidos en dos grupos: un primer grupo constituido por 32 tejidos frescos y un segundo grupo conformado por 10 incluidos en parafina, estos últimos fueron seleccionados del primer grupo, dichos ganglios fueron obtenidos por vaciamiento axilar.

## **Procedimiento Metodológico**

A partir del vaciamiento axilar, el pool de ganglios de cada paciente, fueron disecados en fresco y seccionados en mitades una para estudio histológico, la cual se colocó en solución de formol al 10 %, se incluyó en parafina y se almacenó, luego se cortaron en un microtomo y por último se desparafinaron de la siguiente manera:

Se lavó con 1000 ul de xilol. Se centrifugó a 25°C por 2 minutos a 14500 xg y se descartó el sobrenadante (se repitió tres veces). Luego de descartar el sobrenadante, se agregó etanol 96%, se centrifugó a 25°C por 2 minutos a 14500 xg y se descartó el sobrenadante. Se agregó etanol 100%, se centrifugó a 25°C por 2 minutos a 14500 xg y por último se descartó el sobrenadante, para eliminar el xilol.

Por otro lado, las otras mitades obtenidas del vaciamiento axilar, se guardaron en tubos eppendorf, y se congelaron a – 20°C. Posteriormente los ganglios de cada paciente, fueron cortados con un criostato con un espesor de 20 µm y pesados hasta obtener entre 48-52mg.

Se utilizó para ambos grupos de muestras, un fragmento de tejido fresco de tumor de mama primario, como control positivo y como control negativo, un ganglio linfático no neoplásico.

## **Extracción del ARN de los Tejidos Frescos y de los Desparafinados**

La extracción de ARN se realizó, utilizando el Kit RNeasy total RNA isolation system (Promega), empleando los volúmenes recomendados por el fabricante de acuerdo a la cantidad de tejido (mg) procesado.

Se dispensó solución desnaturalizante en un tubo estéril, luego se colocó el tejido (25-50mg) en la solución desnaturalizante y se homogeneizó (vortex) durante 15-30 segundos. Se añadió Acetato de Sodio 2M (pH: 4.0), se mezcló en vortex. Se adicionó Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico al tubo, se mezcló en vortex por 10 segundos. Se centrifugó a 14.500 xg por 20 minutos a 4°C. Se trasvasó la fase acuosa que contiene el ARN a un tubo nuevo estéril y se le adicionó igual volumen de isopropanol. Se mezcló en vortex y se incubó a -20°C por 30 minutos. Luego se centrifugó a 14.500 x g por 20 minutos a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet adicionando etanol frío al 75%. Se centrifugó a 14.500 xg por 10 minutos a 4°C. Se dejó secar el pellet al aire por 20 minutos. Por último se resuspendió el ARN en agua libre de nucleasas.

Nota: Las muestras se mantuvieron en hielo durante el proceso de extracción.

### **Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

Las muestras extraídas fueron tratadas con inhibidor de ARNasa y almacenadas a -70 °C en alícuotas de 5 µl para conservar su integridad. El ensayo de RT-PCR para los marcadores MMG y MAGE-A3, fue realizado a partir de 1µl de muestra diluida 1:10 y 49 µl de mezcla maestra con una concentración final de 1x de buffer AMV/Tfl, 1,5µM de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 µM de cada dNTP, 50pmoles de cada iniciador (ver anexo A-1), 0,1U/µl AMV RT y 0,1U/µl Tfi DNA polimerasa (Promega). Las condiciones de amplificación de detallan en el anexo A-2.

Para valorar la integridad del ADNc sintetizado, el gen de la GAPDH fue co-retrotranscrito y amplificado paralelamente en las mismas condiciones de reacción en un segundo tubo para cada muestra (anexo A-2).

Todas las reacciones de RT-PCR fueron desarrolladas en un volumen final de 50 µl en termociclador (PTC 100 de M.J.-Research). En cada set de RT-PCR, fueron incluidos controles de reactivos sin ARN, control negativo (ARN extraído de



tejido no neoplásico) y un control positivo (ARN extraído de tejido fresco de tumor de mama primario).

## **Electroforesis**

Los productos de PCR obtenidos fueron evaluados en un gel de agarosa 2% (Tris-Borato-EDTA 1X pH:8 y bromuro de etidio 0,5 ug/ml). Cada muestra fue preparada de la siguiente manera: 2  $\mu$ l Buffer de carga (0.25% Azul de Bromofenol, 0.25% Xilene Cyanol FF, 30% Glicerol en H<sub>2</sub>O), más 10  $\mu$ l de la mezcla de PCR. Se corrió a 100 V por 90min.

El procesamiento de los tejidos, la extracción del ARN, el ensayo RT-PCR y el análisis del producto amplificado, fue realizado en cuartos separados, para evitar la contaminación cruzada entre las muestras y los productos amplificados.

Cabe destacar que cuando se probó la integridad del material extraído de los tejidos incluidos en parafina, no se observó ninguna banda, es decir, no hubo amplificación del ADNc de la GADPH, lo que significa que no se obtuvo ARN de dichas muestras. Esto coincide con los hallazgos de Cronin y cols., (2004), quienes compararon la extracción de material incluido en parafina y en tejido fresco, concluyendo que la señal de la PCR decae cuando aumenta el tiempo de almacenamiento de la muestra; que la cantidad y calidad del ARN puede verse afectada por variaciones debidas al procesamiento quirúrgico de la muestra, al tiempo entre la cirugía y la fijación o a variaciones del lapso entre cada procedimiento (extracción, retrotranscripción y amplificación). Debido a esto, no se pudo evaluar la expresión de los marcadores moleculares MMG y MAGE-A3 en dichas muestras.

Nota: Las bandas de expresión del ARN de MMG y MAGE-A3 pueden ser observadas en los anexos C y D, respectivamente.

## **Análisis de los Datos**

Los datos obtenidos fueron tabulados y analizados estadísticamente a través de un computador, con la utilización del programa Microsoft EXCEL y el paquete estadístico STATISTIX. Se utilizó la prueba Chi-Cuadrado ( $X^2$ ) para establecer las asociaciones de las variables en estudio.

### CAPÍTULO III

#### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Tabla1

***Distribución de la muestra según la expresión de MMG y MAGE-A3 en ganglios linfáticos axilares histológicamente positivos de pacientes con cáncer de mama.***

<i>RT-PCR</i>	<i>MMG</i>		<i>MAGE-A3</i>	
	<i>Frec. Absoluta(n)</i>	<i>Frec. Relativa (%)</i>	<i>Frec. Absoluta(n)</i>	<i>Frec. Relativa (%)</i>
Positivo	8	73	6	54
Negativo	3	27	5	46
<b>Total</b>	11	100	11	100

**Fuente:** Datos propios de la investigación.

La tabla 1 refleja que, de los 11 pacientes con ganglios linfáticos axilares positivos a metástasis por estudio histológico, 8 (73%) mostraron expresión de ARN de MMG, a través del ensayo PCR del ARN total extraído, de un pool de ganglios linfáticos por paciente. Mientras que, el ARN del MAGE-A3 se expresó en 6 de los 11 (54%) ganglios linfáticos sometidos al análisis de la RT-PCR. Esto se correlaciona con un estudio publicado por Watson y cols., en el año 1999, donde encontraron la expresión de ARNm de MMG en 10 (91%) de 11 ganglios linfáticos axilares con metástasis histológicamente documentada y ninguna en ganglios linfáticos axilares de pacientes sin enfermedad neoplásica.

De la misma manera, los hallazgos del presente trabajo son similares a los reportados por Washer y cols., en el año 2001, quienes detectaron la expresión de MAGE-A3 en 15 de 33 (45,5%) ganglios linfáticos centinelas de pacientes con cáncer de mama, identificados como positivos por histología.

Tanto en el presente estudio como en el realizado por Washer y cols., (2001) los resultados falsos negativos (3 con MMG y 5 con MAGE-A3) encontrados, se pueden deber a que la expresión de marcadores tumorales específicos, es heterogénea en una población de células de tumor primario o células metastásicas. Este hecho puede relacionarse con los diferentes patrones de expresión comúnmente encontrados, en el que no todos los tumores expresan tales marcadores. Marchetti y cols., (2001) atribuyen estas diferencias a un posible error de muestreo, debido a que la sección que contenía las células metastásicas pudiera no ser la misma que la utilizada para la RT-PCR.

Así, la expresión de los marcadores obtenidos en el presente estudio coincide, en términos generales, con los hallazgos encontrados por los investigadores previamente citados.

**Tabla 2**

***Distribución de la muestra según la expresión de MMG y MAGE-A3 en ganglios linfáticos axilares histológicamente negativos de pacientes con cáncer de mama.***

<i>RT-PCR</i>	<i>MMG</i>		<i>MAGE-A3</i>	
	<i>Frec. Absoluta(n)</i>	<i>FREC. Relativa (%)</i>	<i>Frec. Absoluta(n)</i>	<i>FREC. Relativa (%)</i>
Positivo	10	56	6	33
Negativo	8	44	12	67
<b>Total</b>	18	100	18	100

**Fuente:** Datos propios de la investigación.

De los 18 pacientes con ganglios linfáticos axilares histológicamente negativos, 10 (56%) mostraron evidencia de metástasis oculta a través de la amplificación de MMG y 6 (33%) lo hicieron a través de MAGE-A3. Estos resultados son consistentes con el estudio realizado por Marchetti y cols., en el año 2001, donde encontraron la expresión de MMG en 232 (35%) de los 665 ganglios linfáticos axilares negativos a la histología y con los hallazgos encontrados por Washer y cols., en el mismo año, en el que obtuvieron la

expresión de MAGE-A3 en 35 (40%) de los 88 ganglios linfáticos centinelas histológicamente negativos.

Por lo tanto, se puede decir que existe una similitud entre los porcentajes de expresión reportados en el presente estudio y los encontrados por Marchetti y Washer.

**Tabla 3**

***Comparación de la expresión del marcador MMG evaluado por PCR, con el estudio histológico de los ganglios linfáticos axilares de pacientes con cáncer de mama.***

<b>ESTUDIO HISTOLÓGICO</b>	<b>RT- PCR MMG</b>		<b>Total</b>
	Positivo	Negativo	
Positivo	8	3	11
Negativo	10	8	18
<b>Total</b>	18	11	29

**Fuente:** Datos propios de la investigación.

p=0,0522

**Tabla 4**

***Comparación de la expresión del marcador MAGE-A3 evaluado por PCR, con el estudio histológico de los ganglios linfáticos axilares de pacientes con cáncer de mama.***

<b>ESTUDIO HISTOLÓGICO</b>	<b>RT- PCR MAGE-A3</b>		<b>Total</b>
	Positivo	Negativo	
Positivo	6	5	11
Negativo	6	12	18
<b>Total</b>	12	17	29

**Fuente:** Datos propios de la investigación

p=0,763

Al observar los resultados expuestos en las tablas 3 y 4 puede notarse que no existe una diferencia significativa entre ambas técnicas. Esto difiere de los resultados de la comparación de la RT-PCR y el análisis histológico realizado por Washer y cols., quienes encontraron que la presencia o ausencia de tumor,

asociado a la expresión de marcadores moleculares, no siempre se corresponde con el estudio histológico usado para confirmar la presencia de células tumorales.

**Tabla 5**

***Relación entre la presencia o ausencia de micrometástasis detectadas por PCR, en ganglios linfáticos histológicamente negativos, con el tamaño de la neoplasia primaria de la mama.***

Nº Marcadores que detectaron metástasis	Tamaño del Tumor			Total
	<2cm	2,1-5cm	>5,1cm	
0	0	1	5	6
1	2	3	3	8
2	0	2	2	4
<b>Total</b>	2	6	10	18

**Fuente:** Datos propios de la investigación.

En la tabla 5 se puede apreciar que no hubo relación entre la expresión de los marcadores moleculares y el tamaño del tumor, debido a que no se obtuvo una tendencia en la expresión de éstos, en pacientes con tumores de mayor o menor tamaño. Así mismo, Washer y cols., en el año 2001, no encontraron correlación entre la expresión de MAGE-A3 y el tamaño del tumor, atribuyendo este hecho al pequeño número de muestras procesadas.

**Tabla 6**

***Relación entre presencia o ausencia de micrometástasis detectadas por PCR, en ganglios linfáticos histológicamente negativos, con el grado histológico de la neoplasia primaria de la mama.***

Nº Marcadores que detectaron metástasis	Grado Histológico			Total
	I	II	III	
0	1	3	2	6
1	2	5	1	8
2	0	2	2	4
<b>Total</b>	3	10	5	18

**Fuente:** Datos propios de la investigación.

En la tabla 6 se observa la expresión de 1 o 2 marcadores en, 2 tumores con grado histológico I, en 7 tumores con grado II y en 3 tumores con grado III, esto indica que no hay correlación entre el grado histológico del tumor con la expresión o no de los marcadores ensayados, ya que no existe una distribución en la tabla que permita confirmar lo contrario. De la misma manera, Washer y cols., no consiguieron significancia estadística entre la expresión de MAGE-A3 y el grado de la neoplasia.

**Tabla 7**

***Relación entre la presencia o ausencia de micrometástasis detectadas por PCR, en ganglios linfáticos histológicamente negativos, con émbolos neoplásicos vasculares en la neoplasia primaria de la mama.***

Nº Marcadores que detectaron metástasis	Émbolos neoplásicos vasculares		
	Si	No	Total
0	0	6	6
1	0	8	8
2	1	3	4
<b>Total</b>	1	17	18

**Fuente:** Datos propios de la investigación

Los resultados mostrados en la tabla 7 no son concluyentes, debido a que del total de las muestras estudiadas solo un paciente presentaba émbolos vasculares neoplásicos, por lo tanto, no se pudo hacer la correlación entre la presencia o ausencia de esta característica histológica con la expresión de los marcadores ensayados.

Cabe destacar que los resultados obtenidos durante el estudio de estos tres parámetros histológicos (tamaño del tumor, grado histológico y presencia de émbolos vasculares neoplásicos), no son significativos ya que no se logró obtener una distribución equitativa de las muestras para tal fin.

## CONCLUSIONES

El presente estudio ha demostrado que la expresión de los marcadores moleculares MMG y MAGE-A3, a través del ensayo RT-PCR, es útil en la detección de micrometástasis en ganglios linfáticos axilares histológicamente negativos, en pacientes con cáncer de mama.

Es importante resaltar el hecho de que los marcadores moleculares, fueron capaces de detectar metástasis simultáneamente, en 4 de 18 pacientes (22,2%), mientras que 8 (44,4%), expresaron uno u otro marcador, es decir, el ensayo PCR fue capaz de detectar micrometástasis en 12 pacientes (66,6%) previamente reportados como libres de neoplasia según el estudio histológico.

Debido a que la utilidad del ensayo RT-PCR en la detección de células metastásicas aun está en estudio, desconociéndose aun su significado pronóstico, no puede ser ciertamente considerado como un sustituto en la práctica clínica del análisis histológico de secciones seriadas de ganglios linfáticos.

De validarse este método, podría ayudar a identificar pacientes con mayor riesgo de recurrencia y/o metástasis a distancia, quienes podrían beneficiarse con una terapia adyuvante más agresiva. Sería importante que la técnica de la PCR lograra establecer un sub-estadio clínico, de las pacientes con ganglios linfáticos axilares histológicamente negativos, RT-PCR positivos, para de esta forma utilizarla como un factor pronóstico de recurrencia y/o metástasis de la enfermedad y utilizarla como un poderoso complemento del análisis histológico de rutina. Conclusiones más definitivas de las implicaciones clínicas de este ensayo podrían surgir del seguimiento de los pacientes.



## RECOMENDACIONES

- Para la realización de la RT-PCR, es necesario contar con personal altamente calificado en la recolección, almacenamiento y procesamiento de la muestra, es decir, el procedimiento debería ser llevado a cabo bajo estrictas normas de seguridad, desde la toma de la muestra en el quirófano pasando por el seccionamiento y extracción, hasta su amplificación, para de esta forma evitar la contaminación o degradación del material.
- Es importante utilizar un mayor número de muestras para dar mayor validez al ensayo, en términos de obtener resultados más concluyentes.
- Debido a la heterogeneidad en la expresión de los marcadores tumorales, se sugiere el uso de múltiples marcadores en lugar de un marcador único, con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo RT-PCR.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bloom, HJG y Richardson, W. (1957). **Histologic grading and prognosis in breast cancer: A study of 1.709 cases of which 359 have been followed for 15 years.** *British Journal Cancer*, 11: 359-377.
- Bossolasco, P; Ricci, C; Farina, G; Soligo, D; Pedretti, D; Scanni A; Lambertenghi, D. (2002). **Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene.** *Cancer Detection and Prevention*, 26: 60-63.
- Capote, L. (1996). Epidemiología del cáncer de la glándula mamaria. En G. Hernández (Comp.), **Avances en Mastología** (pp.170-181). Caracas.
- Contreras, A. (2001). Pesquisa del cáncer de mama. [Datos en línea]. Disponible: [http://www.Opolanco.es/Apat/Boletín 13/pronosti.htm](http://www.Opolanco.es/Apat/Boletín%2013/pronosti.htm) [Consulta: 2004, Marzo 27]
- Cronin, M; Pho, M; Dutta, D; Stephans, J; Shak, S; Kiefer, M; Esteban, J; Baker, J. (2004). **Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay.** *American Journal of Pathology*, 164: 35-42.
- Díaz, J. (1996). Estado actual de los factores pronósticos en cáncer de mama. En G. Hernández (Comp.), **Avances en Mastología** (pp.239-253). Caracas.
- Donegan, W y Spratt, J. (1982). **Cáncer de mama.** Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Ellis, I; Schnitt, S; Sastre, X; Bussolati, G; Tavassoli, F; Eusebi, V; Peterser, J; Mukai, K; Tabar, L; Jacquemier, J; Cornelisse, C; Sasco, A; Kaaks, R; Pisani, E; Goldgar, D; Devilee, P; Cleton, M; Borrasen, A; Van't Veer, L; Sapino, A. (2003). Invasive Breast Carcinoma. En F. Tavassoli (Comps.), **World Health Organization** (pp.13- 24). Lyon.

Ellis, I; Tavassoli, F. (2003). Microinvasive carcinoma. En F. Tavassoli (Comps.), **World Health Organization** (pp.74-78). Lyon.

Helpap, B. (1989). **Nucleolar grading of breast cancer**. *Virchows Archive a Pathology Anatomy*, 41: 501-508.

Kumar, V; Cotran, R; Robbins, S. (1997). **Patología Humana**. México: Editorial Mc Graw – Hill Interamericana.

Leygue, E; Snell, S; Dotzlaw, H; Hole, K; Toup, S; Hiller, T; Murphy, L; Watson, P. (1999). **Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis**. *Journal of Pathology*, 189: 28-33.

Manzotti, M; Dell'Orto, P; Maisonneuve, P; Zurrida, S; Mazzarol, G; Viale, G. (2001). **Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in detection of breast cancer metastases in sentinela lymph nodes**. *Journal of Cancer*, 195: 307-312.

Marchetti, A; Buttita, F; Bertacca, G; Zavaglia, K; Bevilacqua, G; Angelucci, D; Viacava, P; Naccarato, A; Bonadio, A; Barassi, F; Felicioni, L; Salvatore, S; Mucilli, F. (2001). **mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mamaglobina and carcinoembryonic antigen in 248 patients**. *Journal of Pathology*, 195: 186-190.

MSDS. (1999). Incidencia del cáncer de mama. *Anuario Epidemiológico en Venezuela*. [Datos en línea]. Disponible: <http://www.msds.gov.ve/msds/modules>. [Consulta: 2004, Julio 18]

Musé, L; Sabini, G; Viola, A. (1996). Tratamientos adyuvantes sistémicos en el cáncer de mama sin compromiso metastásicos de los ganglios axilares. En G. Hernández, **Avances en Mastología** (pp.451-458). Caracas.

Nime, F; Rosen, P; Thaler, H. (1997). **Prognostics significance of tumor emboli in intramammary lymphatics in patients with mammary carcinoma.** *American Journal Surgery Pathology*, 1: 25-30.

Núñez, M; Martínez, F; Pollán, M; Lucas, A; Sánchez, J; Tejerina, A; Schneider, J. (2003). **Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associates with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype.** *Breast Cancer Research* [Revista en línea], 5. Disponible: <http://breast-cancer-research.com/content/5/3/R65>. [ Consulta : 2004, Junio 9]

Noguchi, S; Aihara, T; Motomura, K; Inaji, H; Imaoka, S; Koyama, H. (1996). **Histologic characteristic of breast cancer with occult lymph node metastases detected by keratin 19 mRNA reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *Cancer*, 78: 1235-1240.

Pallela, S y Martins, F. (2003). **Metodología de la investigación cuantitativa.** Caracas: Editorial FEDUPEL.

Singletary, E; Allred, C; Ashley, P; Bassett, L; Berry, D; Bland, K; Borgen, P; Clark, G; Edge, S; Hayes, D; Hughes, L; Hutter, R; Marrow, M; Page, D; Recht, A; Theriault, R; Thor, A; Weaver, D; Wieand, S; Greene, F. (2002). **Revision of**

**American Joint Committee on cancer staging system for breast cancer.**  
*Journal of Clinical Oncology*, 17: 3628-3636.

Tavassoli, F. (1999). **Pathology of the Breast.** Editorial Appleton & Lange.

Washer, R; Bostick, PJ; Huynh, KT; Turner, R; Qi, K; Giuliano, A; Hoon, D. (2001).  
**Detection de MAGE-3 in breast cancer patients' sentinels lymph nodes.**  
*British Journal of Cancer*, 85: 1340-1346.

Watson, M; Dintzis, S; Darrow, C; Voss, L; DiPersio, J; Jensen, R; Fleming, T.(1999). **Mammaglobin expression in primary metastasic, and occult breast cancer.** *Cancer Research*, 59: 3028-3031.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### A-1. Secuencia de los iniciadores para la amplificación de GADPH, MMG y MAGE-A3

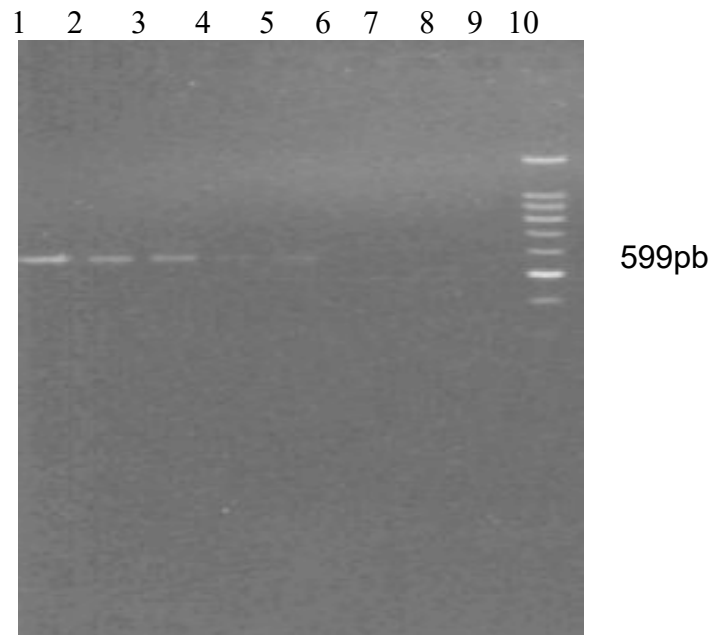
Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto(pb)
GADPH sense	5`CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA3`	
GADPH antisense	5`TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC3`	599
MMG sense	5`CCGACAGCAGCAGCCTCAC3`	
MMG antisense	5`TCCGTAGTTGGTTTCTCAC3`	189
MAGE-A3 sense	5`GAAGCCGCCCCAGGCTCG3`	
MAGE-A3 antisense	5`GGAGTCCTCATAGGATTGGCTCC3`	605

### A-2. Condiciones de PCR

	Desnaturalización	Condiciones de los ciclos	Nºde ciclos	Elongación final
GADPH	45°C x 45min 94°C x 2min	94°C x 45seg 53°C x 1min 68°C x 2min	40x	68°C x 10min
MMG	45°C x 45seg 94°C x 2min	94°C x 30seg 62°C x 30seg 68°C x 1min	35X	68°C x 10min
MAGE-A3	45°C x 45seg 94°C x 2min	94°C x 30seg 52°C x 1min 68°C x 1min	35X	68°C x 10min

## ANEXO B

### Representación de la expresión del ARN de GADPH

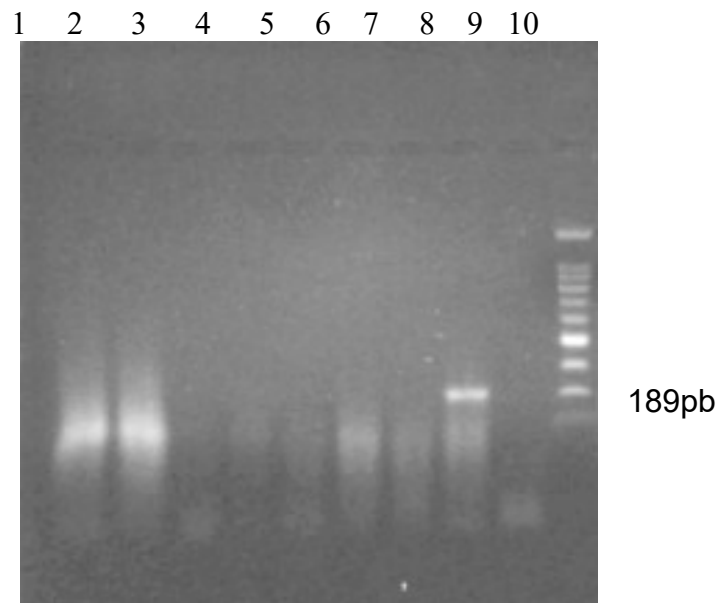


Desde el carril 1 hasta el 5 se expresa el ARN de GADPH por el ensayo RT-PCR, en el carril 6 no hubo amplificación del gen, 7 control negativo (H<sub>2</sub>O), 8 control positivo (GADPH), 9 control de contaminación y en el 10 el marcador de peso molecular.



## ANEXO C

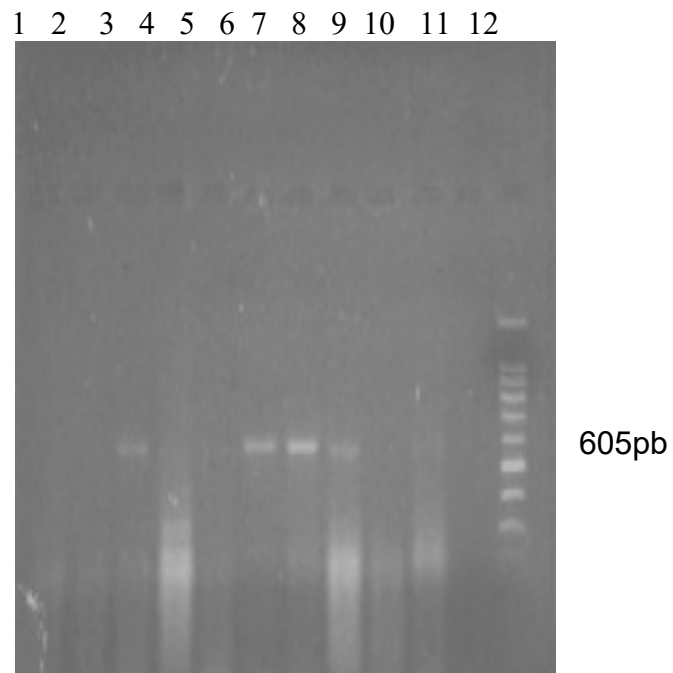
### Representación de la expresión del ARN de MMG



Los carriles 1,2,3,5 y 6 corresponden a GLA histológicamente negativos, el carril 4 corresponde a GLA histológicamente positivos, 7 control negativo, 8 control positivo, 9 control de contaminación y carril 10 marcador de peso molecular.

## ANEXO D

### Representación de la expresión del ARN de MMG



El carril 1 corresponde a GLA histológicamente positivos, los carriles 2-8, corresponde GLA histológicamente negativos, 9 control negativo, 10 control positivo, 11 control de contaminación y carril 12 marcador de peso molecular.