

**DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MAMOGLOBINA EN PACIENTES  
COLOMBIANOS CON CÁNCER DE SENO**

**JULIE MILENA GALVIS JIMÉNEZ**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO  
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
UNIDAD DE GENÉTICA**

**Bogotá, Enero, 2.011**

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO**  
**ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MAMOGLOBINA EN PACIENTES  
COLOMBIANOS CON CÁNCER DE SENO**

**Línea de Investigación en Biología Celular y Molecular del Cáncer**

**JULIE MILENA GALVIS JIMÉNEZ**

**Tesis de Grado presentada como requisito parcial para optar al título de  
MAESTRIA en CIENCIAS con énfasis en GENÉTICA HUMANA**

**Directora: SANDRA ROCÍO RAMIREZ CLAVIJO. Biol, PhD**

**Bogotá, 2011**

## **NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL**

“La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Señor Jesús por permitirme alcanzar este logro y a mi familia, quienes siempre estuvieron brindándome su apoyo y compañía.

A la Universidad del Rosario y al Laboratorio de Biología celular y Molecular, su apoyo en este proyecto fue muy valioso e importante.

Al Instituto Fundación de Inmunología de Colombia por su colaboración durante la el desarrollo experimental del presente proyecto.

Al Departamento de Oncología del Hospital Universitario Mayor Méderi y al Centro de Investigaciones Oncológicas Clínica San Diego por permitirme estudiar a sus pacientes.

A la Doctora Sandra Ramírez por su dirección, enseñanzas y motivación.

Al Doctor Manuel Alfonso Patarroyo por sus enseñanzas, su permanente apoyo y disposición incondicional.

Al profesor Pedro Monterrey por su paciencia y gran apoyo en el análisis estadístico, su ayuda fue primordial en la culminación de este trabajo.

A mis docentes de la unidad de genética, los doctores Carlos Restrepo, Nora Contreras, Dora Fonseca, Heidi Mateus y Paul Laissue, por sus enseñanzas y amistad, las cuales fueron el fundamento que siempre me acompaño.

A los Doctores Luis Florez y Jennifer Canchilá de CIO San Diego por todo la ayuda prestada en la revisión de la información de los datos de pacientes.

Al Doctor Mauricio García de Méderi-B. Unidos por su valiosa colaboración en la obtención de las muestras. A mis compañeros y amigos Natalia Acosta, Lina Quijano, Sally Arboleda, César Payán, Gabriela Arévalo y Liliana Patiño por sus conocimientos compartidos y por tan gratos momentos vividos que alegraron cada uno de los instantes vividos durante estos dos años.

A mis pacientes y sus familias por la buena disposición en la realización de este estudio.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo, que me motivaron y que me acompañaron.

## DEDICATORIA

A mi Dios

A mis Padres

A mis hermanas

A mis Maestros

A mis Pacientes

---

Dra. Sandra Rocío Ramírez Clavijo. Biol. PhD

Directora de tesis

---

Dr. Guillermo Ramírez. MD. Oncólogo.

Jurado

---

Dr. Hernando Curtidor. Qm. PhD

Jurado

---

Dra. Nora Constanza Contreras. Biol. MSc

Coordinadora Maestría en Ciencias con énfasis en Genética

---

Carlos Martín Restrepo Fernández. MD. MSc. PDh

Director Maestría en Ciencias con énfasis en Genética

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>20</b>
<b>3. JUSTIFICACION</b> .....	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	<b>24</b>
<b>5. MARCO TEORICO</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1. ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2. LA MAMA NORMAL</b> .....	<b>25</b>
<b>5.3. CANCER DE SENO</b> .....	<b>28</b>
<b>5.3.1. Epidemiología</b> .....	<b>29</b>
<b>5.3.2. Clasificación</b> .....	<b>30</b>
<b>5.3.3. Factores de Riesgo</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3.4. Diagnóstico</b> .....	<b>34</b>
<b>5.4. CONCEPTO DE LOS MARCADORES TUMORALES</b> .....	<b>34</b>
<b>5.5. MAMOGLOBINA HUMANA</b> .....	<b>37</b>
<b>5.5.1. Estructura del gen</b> .....	<b>37</b>
<b>5.5.2. Transcripción del gen</b> .....	<b>37</b>
<b>5.5.3. Proteína</b> .....	<b>39</b>
<b>5.5.4. Función</b> .....	<b>42</b>
<b>6. HIPOTESIS</b> .....	<b>44</b>
<b>7. METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
<b>7.1. TIPO DE ESTUDIO</b> .....	<b>45</b>
<b>7.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO</b> .....	<b>45</b>
<b>7.2.1. Grupo de casos</b> .....	<b>45</b>
<b>7.2.2. Grupo Control</b> .....	<b>45</b>
<b>7.3. TAMAÑO DE LA POBLACIÓN</b> .....	<b>46</b>

7.4.	RECOLECCIÓN MATERIAL BIOLÓGICO A ESTUDIAR .....	46
7.5.	GENERACION DE ANTICUERPOS ANTI-MAMOGLOBINA .....	47
7.5.1.	PREDICCIÓN DE EPÍTOPES B Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS .....	47
7.5.2.	INOCULACION DE LOS CONEJOS .....	50
7.6.	PRE-ABSORCION SUEROS .....	52
7.7.	EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS .....	54
7.7.1.	Protocolo Elisa .....	54
7.7.2.	Identificación de reconocimiento cruzado de los sueros .....	55
7.7.3.	Purificación del suero 75 hiperinmune en columna de sefarosa con péptidos A y B .....	57
	Preparación soluciones .....	57
7.7.4.	Protocolo purificación-columna sefarosa CNBr-4B .....	58
-	<i>Preparación de la columna sefarosa CNBr-4B.....</i>	58
-	<i>Purificación del suero 75.....</i>	59
7.7.5.	Evaluación de la especificidad del suero 75 purificado .....	59
7.7.6.	Evaluación de la especificidad de reconocimiento de los sueros seleccionados .....	59
7.8.	DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA MAMOGLOBINA RECOMBINANTE .....	60
	<i>Preparación diluciones.....</i>	60
	<i>Protocolo Elisa.....</i>	60
7.9.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MAMOGLOBINA EN LOS SUEROS DE LOS PACIENTES Y DE LOS INDIVIDUOS CONTROL .....	62
	Protocolo ELISA.....	62
7.9.1	Elisa suero pacientes con suero Anti-péptido B, pre incubando con Mamoglobina .....	63
7.9.2	Protocolo Pre-incubación Suero Anti-Péptido B con Mamoglobina Recombinante .....	64
7.10.	ANALISIS ESTADÍSTICO .....	66
8.	ASPECTOS ÉTICOS .....	67
9.	RESULTADOS .....	69
9.1.	DATOS POBLACIÓN.....	69

<b>9.2.</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS.....</b>	<b>74</b>
9.2.1.	<b>Péptido A vs Sueros Preimmune e Hiperimmune.....</b>	<b>75</b>
9.2.2.	<b>Péptido B vs Sueros Preimmune e Hiperimmune.....</b>	<b>75</b>
9.2.3.	<b>Péptido C vs Sueros Preimmune e Hiperimmune.....</b>	<b>76</b>
9.2.4.	<b>Péptido D vs Sueros Preimmune e Hiperimmune.....</b>	<b>77</b>
<b>9.3.</b>	<b>IDENTIFICACIÓN RECONOCIMIENTO CRUZADO .....</b>	<b>78</b>
9.3.1.	<b>Péptido A vs Sueros Hiperimmune.....</b>	<b>78</b>
9.3.2.	<b>Péptido B vs Sueros Hiperimmune .....</b>	<b>78</b>
9.3.3.	<b>Péptido C vs Sueros Hiperimmune .....</b>	<b>79</b>
9.3.4.	<b>Péptido D vs Sueros Hiperimmune .....</b>	<b>79</b>
<b>9.4.</b>	<b>VERIFICACION DE INESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS HIPERIMUNES.....</b>	<b>80</b>
9.4.1.	<b>Evaluación de la especificidad del suero 75 purificado .....</b>	<b>81</b>
9.4.2.	<b>Evaluación de la especificidad de reconocimiento de los sueros seleccionados .....</b>	<b>82</b>
<b>9.5.</b>	<b>DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA MAMOGLOBINA RECOMBINANTE .....</b>	<b>83</b>
<b>9.6.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE MAMOGLOBINA EN LOS SUEROS DE LOS PACIENTES Y DE LOS INDIVIDUOS CONTROL.....</b>	<b>88</b>
<b>9.7.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MAMOGLOBINA EN EL SUERO DE LOS PACIENTES Y DE LOS INDIVIDUOS CONTROL .....</b>	<b>92</b>
<b>9.8.</b>	<b>VERIFICACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS DE CONEJO PARA RECONOCER MAMOGLOBINA SÉRICA .....</b>	<b>94</b>
<b>9.9.</b>	<b>ANALISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>95</b>
9.9.1.	<b>Análisis de la capacidad de los sueros de conejo para diferenciar entre el grupos de pacientes y controles .....</b>	<b>96</b>
9.9.2.	<b>Análisis de relación entre la concentración de Mamoglobina y el estatus de los Receptores de Estrógenos, Progesterona y Erb2. ....</b>	<b>99</b>
*	<i>Receptor de progesterona (RP).....</i>	<i>99</i>
*	<i>Receptor de Estrógenos (RE).....</i>	<i>101</i>
*	<i>Receptor Erb2:.....</i>	<i>103</i>
9.9.3.	<b>Análisis de la relación entre la concentración de Mamoglobina y estadío del cáncer .....</b>	<b>105</b>

9.9.4.	Relación entre la concentración de Mamoglobina y la presencia de metástasis .....	107
9.9.5.	Relación entre la concentración de Mamoglobina y la ocurrencia de recaída.....	108
9.9.6.	Análisis de la concentración de Mamoglobina en relación al estado menopáusico de las pacientes.....	109
9.9.7.	Efecto de diferentes variables sobre la concentración de la proteína Mamoglobina utilizando los sueros Anti-péptido A, B y C.....	111
9.9.8.	Índice de Detectabilidad y Curva Roc .....	114
10.	DISCUSIÓN.....	116
11.	CONCLUSIONES .....	127
12.	PERSPECTIVAS .....	128
13.	BIBLIOGRAFIA .....	129
14.	ANEXOS.....	136

## LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de los péptidos sintetizados.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 2. Evaluación del reconocimiento de los péptidos por parte de los anticuerpos contenidos en los sueros Hiper-Inmunes de los conejos.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 3. Características de la Población estudiada.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 4. Valores de absorbancia obtenidos a partir de las pruebas de ELISA realizadas con los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) en presencia del Péptido A.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos a partir de las pruebas de ELISA realizadas con los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) en presencia del Péptido B.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabla 6. Valores de absorbancia obtenidas a partir de las pruebas de ELISA realizadas con los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) en presencia del Péptido C.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 7 Valores de absorbancia de los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) frente al Péptido D.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabla 8. Evaluación especificidad de los sueros de conejos. Valores de absorbancia obtenidos mediante pruebas de ELISA.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 9. Verificación de inespecificidad de los sueros hiperinmunes.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 10. Valores de absorbancia del suero Anti-péptido C (75) purificado frente a péptidos A y B.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabla 11. Valores de absorbancia del suero 75 purificado (2) frente a péptidos A y B. Los valores de absorbancia fueron menores que en el anterior ensayo para los péptidos A, B y C.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 12. Valores de Absorbancia de sueros seleccionados usando en dilución 1:10.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 13. Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinate.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabla 14. Valores de absorbancia a 620nm de pruebas de ELISA de sueros de pacientes en presencia de suero Anti-péptido B (55).....</i>	<i>94</i>
<i>Tabla 15. Descripción de variables de pareamiento en la muestra.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 16. Concentración de Mamoglobina.[ng/ml] en los sueros de los pacientes y de los individuos control.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 17. Valores obtenidos de la aplicación de la prueba de Kolmogorov Smirnov para determinar diferencias entre el grupo de pacientes con cáncer de seno y los individuos sanos.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabla 18. Percentiles de la concentración de la proteína según la presencia de cáncer de mama.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabla 19. Concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor de Progesterona (RP).....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 20. Significancia según la prueba de Kolmogorov Smirnov de cada unos de los sueros Anti-péptido A, B y C al comparar la concentración de Mamoglobina y el estado del receptor de progesterona.....</i>	<i>100</i>

<i>Tabla 21. Percentiles de la concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor de Progesterona. Se observa concentración de Mamoglobina similar entre RP positivos y negativos en todos los percentiles.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 22. Concentración de Mamoglobina [ng/ml] según el estado del Receptor de Estrógenos.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 23. Significancia según la prueba de Kolmogorov Smirnov de cada uno de los sueros Anti-péptido A, B y C al comparar la concentración de Mamoglobina y el estado del receptor de estrógeno.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabla 24. Percentiles según el estatus del Receptor de Estrógenos. Se observan concentraciones de Mamoglobina similares entre RE positivos y negativos.....</i>	<i>103</i>
<i>Tabla 25. Concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor Erb2.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabla 26. Significancia según la prueba de Kolmogorov Smirnov para cada uno de los sueros Anti-péptido A, B y C al comparar la concentración de Mamoglobina y el estado del receptor Erb2.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabla 27. Percentiles de la concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor Erb2.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabla 28. Comportamiento de Mamoglobina según el estadio del cáncer.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabla 29. Concentración de Mamoglobina según la presencia de Metástasis.....</i>	<i>108</i>
<i>Tabla 30. Concentración de Mamoglobina [ng/ml] según la ocurrencia de recaída en las pacientes con cáncer de mama analizadas.....</i>	<i>108</i>
<i>Tabla 31. Concentración de Mamoglobina [ng/ml] según la presencia de Menopausia.....</i>	<i>109</i>
<i>Tabla 32. Prueba de Kolmogorov Smirnov para determinar la relación entre la concentración de Mamoglobina y ocurrencia de Menopausia.....</i>	<i>110</i>
<i>Tabla 33. Coeficiente de correlación de Pearson.....</i>	<i>110</i>
<i>Tabla 34. Aporte de las variables sobre la cuantificación con suero Anti-péptido A.....</i>	<i>112</i>
<i>Tabla 35. Aporte de las variables sobre la cuantificación con el suero Anti-péptido B.....</i>	<i>113</i>
<i>Tabla 36. Aporte de las variables sobre la cuantificación con el Anticuerpo. Se analizaron las variables que podrían influir en la concentración de Mamoglobina. Se observa que únicamente la presencia de cáncer muestra valor <math>P &lt; 0,05</math> indicando su significancia.....</i>	<i>113</i>
<i>Tabla 37. Índice de Detectabilidad para cada uno de los sueros empleados.....</i>	<i>114</i>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Comparación del tamaño del tumor con un fríjol, maní, nuez y limón.....</i>	31
<i>Figura 2. Estructura del gen que codifica para la proteína Mamoglobina-.....</i>	37
<i>Figura 3. Transcripción del gen de la Mamoglobina.....</i>	38
<i>Figura 4. Ubicación de los péptidos A, B, C en la secuencia de la proteína Mamoglobina... </i>	50
<i>Figura 5. Proceso de Inmunización de los conejos. ....</i>	51
<i>Figura 6. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-péptido A (54) (ELISA). ....</i>	84
<i>Figura 7. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-péptido B (55) (ELISA). ....</i>	85
<i>Figura 8. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-péptido C (62) (ELISA). ....</i>	86
<i>Figura 9. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-péptido D (78) (ELISA). ....</i>	87
<i>Figura 10. Comparación Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con los cuatro Suero Anti-péptido A, B y C. ....</i>	88
<i>Figura 11. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadío usando el Suero Anti-péptido A (54), obtenidos mediante ELISA.....</i>	89
<i>Figura 12. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadío usando el Suero Anti-péptido B (55), obtenidos mediante ELISA.....</i>	90
<i>Figura 13. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadío usando el Suero Anti-péptido C (62), obtenidos mediante ELISA.....</i>	90
<i>Figura 14. Comparación Absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadío usando el suero Anti-péptido D (78). ....</i>	91
<i>Figura 15. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm usando cada unos de los Sueros (54, 55 y 62) en los grupos de pacientes (P) y controles (C). ....</i>	92
<i>Figura 16. Comparación de la concentración de Mamoglobina (en escala Log10 ng/ml) entre los grupos de Pacientes (P) y Controles (C), usando los anticuerpos 54, 55 y 62.....</i>	93
<i>Figura 17. Comparación absorbancias a 620nm de pacientes analizadas con suero Anti-péptido B (55) (rojo), suero Anti-péptido B (55) pre-incubado con Mamoglobina (azul), Suero 55 pre-inmune (verde). ....</i>	95
<i>Figura 19. Análisis de la capacidad de los sueros de conejo para diferenciar entre los grupos de pacientes y controles. (A) Anticuerpo 54, (B) Anticuerpo 55, (C) Anticuerpo 62.....</i>	98
<i>Figura 20. Comparación de los intervalos de confianza para la concentración de Mamoglobina en el grupo de pacientes según el estadío. (A) Suero Anti-péptido A (54), (B) Suero Anti-péptido B (55), (C) Suero Anti-péptido C (62). ....</i>	107
<i>Figura 21. Matriz de diagramas de dispersión entre las variables concentración de Mamoglobina y Edad. ....</i>	111

*Figura 22. Curva ROC el suero Anti-péptido B. Al realizar la curva se obtiene una Especificidad del 96% y una Sensibilidad del 86,3%..... 115*

*Figura 23. Ubicación de los péptidos B y C en la estructura de la proteína Mamoglobina... 120*

## LISTA DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Organización de la placa ELISA sueros pre-inmune y sangría final vs péptidos...</i>	136
<i>Anexo 2. Ensayo I. Elisa Péptido A vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010.....</i>	137
<i>Anexo 3. Ensayo I. Elisa Péptido B vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010.....</i>	138
<i>Anexo 4. Ensayo I. Elisa Péptido C vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010.....</i>	138
<i>Anexo 5. Ensayo I. Elisa Péptido D vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010.....</i>	139
<i>Anexo 6. Ensayo II. Elisa Péptidos vs suero S.F. 11-12 Marzo de 2010.....</i>	140
<i>Anexo 7. Comparación Péptido A Ensayos I y II.....</i>	140
<i>Anexo 8. Comparación Péptido B Ensayos I y II.....</i>	141
<i>Anexo 9. Comparación Péptido C Ensayos I y II.....</i>	141
<i>Anexo 10. Comparación Péptido D Ensayos I y II.....</i>	142
<i>Anexo 11. Ensayo III. Elisa Sangría Final vs Péptidos – pre-incubando.....</i>	143
<i>Anexo 12. Sueros seleccionados .....</i>	144
<i>Anexo 13. Absorbancia sueros pacientes y controles .....</i>	145
<i>Anexo 14. Concentración Mamoglobina [ng/ml] suero de pacientes.....</i>	147
<i>Anexo 15. Concentración Mamoglobina [ng/ml] suero de controles.....</i>	149
<i>Anexo 16. Consentimiento informado .....</i>	151
<i>Anexo 17. Hoja de Registro .....</i>	155
<i>Anexo 18. Alineamiento secuencias de Secretoglobinas humanas y uteroglobina de conejo. .....</i>	157

## 1. INTRODUCCIÓN

Entre los años 2003 y 2004, según datos recolectados por el Instituto Nacional de Cancerología (INC) de Bogotá, hubo un incremento del 13% de los casos de cáncer registrados, siendo el de seno el segundo más frecuente en la población colombiana femenina.

La principal prueba de tamizaje utilizada para detectar la aparición de lesiones mamarias malignas es la mamografía, pero su sensibilidad puede variar entre el 68 y el 90% (Diaz, et al., 2005). Como herramienta de apoyo a la mamografía y al examen físico la detección de genes cuya sobre-expresión está asociada con el desarrollo de un proceso neoplásico puede contribuir a la detección temprana y seguimiento de pacientes con cáncer de seno. Algunos estudios han postulado como un candidato a marcador celular para el diagnóstico y seguimiento a la glicoproteína Mamoglobina humana que se expresa de manera específica en la glándula mamaria y se sobre-expresa en la mayoría de los tumores primarios y metastásico de pacientes con cáncer de seno (Fleming, et al., 2000).

Mark Watson y colaboradores, fueron los primeros en reportar esta proteína codificada por un ADNc aislado de un tumor de cáncer de mama primario humano. La proteína Mamoglobina es homóloga a la familia de proteínas de las Secretoglobinas, por lo que se considera miembro de esta (Fleming, et al., 1996). De las células de la glándula mamaria la Mamoglobina es secretada en forma de complejo con la proteína Lipofilina B otra integrante de la familia de las Secretoglobinas. Hasta ahora, su función no se ha descrito completamente pero, se cree que puede estar involucrado en la

regulación del metabolismo de esteroides y algunas funciones inmunes. Al purificar el complejo se conoció que era necesario el clivaje del péptido señal tanto para Mamoglobina como Lipofilina B. Este complejo forma un glóbulo helicoidal pequeño y crean un bolsillo hidrofóbico capaz de unirse a moléculas similares a esteroides y bifenilos (Carter, et al, 2002).

Desde el año 1996 cuando se identificó la Mamoglobina varios autores han reportado la especificidad de la expresión de esta proteína hacia la glándula mamaria a través de estudios de RT-PCR e inmunohistoquímica analizando muestras de tejido normal y tumoral (Watson, et al, 1996; Watson, et al, 1999; Suchy, et al, 2000; O`Brien, et al, 2002; Zehentner, et al, 2004). Esta evidencia de la especificidad de tejido mamario ha dado lugar al uso de Mamoglobina como marcador de diseminación metastásica del cáncer de mama a los ganglios linfáticos (Min, 1998). Bernstein, y colaboradores, confirmaron y ampliaron estos hallazgos al demostrar que la proteína Mamoglobina se expresa en una gran mayoría de los tumores de mama analizados, pero no fue detectado en los tumores de colon, próstata, pulmón u ovario (Bernstein, et al., 2005). Estos hallazgos, junto con estudios previos, indican claramente que la expresión de la proteína Mamoglobina es altamente específica para cáncer de mama.

Carter y colaboradores, analizaron muestras de ganglio linfático axilar de veinte mujeres con cáncer de seno, en las cuales se analizó la expresión de mRNA de Mamoglobina a través del uso de la técnica de RT-PCR. Encontraron que en 13 muestras de ganglio linfático metastásico hubo expresión de Mamoglobina, mientras que en los otros nódulos restantes no hubo expresión de esta y su resultado por patología fue negativo para metástasis (Carter, et al., 2002).

La Mamoglobina humana por ser una glicoproteína secretada por las células de la glándula mamaria, sobre-expresada en células tumorales y presente en el suero de mujeres con o sin cáncer, se ha identificado como un posible candidato para marcador tumoral celular sérico (Fanger, et al, 2002; Bernstein, et al., 2005; Zehentner, et al., 2004)

Este estudio evaluó la presencia de la proteína Mamoglobina en muestras de suero de pacientes con cáncer de seno, estableció la concentración de esta y la comparó con un grupo control constituido por personas sin ningún tipo de cáncer, mediante el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En países desarrollados una de cada nueve mujeres padece cáncer de mama a lo largo de su vida y la tercera parte de ellas, muere debido a esta neoplasia (*Piñeros, et al, 2004*). El cáncer de seno a nivel mundial, representa aproximadamente el 22% de los cánceres diagnosticados en mujeres, siendo mayor en los países desarrollados respecto a los países en vía de desarrollo, presentándose un número de casos nuevos de 636.128 y 514.072 mujeres afectadas respectivamente (*Ferlay, et al, 2004*).

Según la OMS durante el año 2007 se presentaron 548.999 muertes debida a cáncer de seno en el mundo (WHO, 2007). De acuerdo a estudios realizados por el *Instituto Nacional de Cancerología (INC)*, en Colombia el cáncer de seno presenta una incidencia de aproximadamente 30 por cada 100000 mujeres, constituyéndose junto con el de cuello uterino como los más frecuentes dentro de la población femenina.

Para avanzar en el desarrollo de estrategias que faciliten un diagnóstico temprano de la enfermedad y la identificación de la población en riesgo, en este trabajo se implementó una prueba de ELISA, que permite la identificación de la proteína Mamoglobina, esta puede servir como apoyo al tradicional examen físico y a la mamografía. La Mamoglobina es un marcador tumoral específico de la glándula mamaria que además es secretado, por lo cual se buscó determinar su presencia en el suero de mujeres con cáncer de mama y en mujeres sanas.

Si la detección de Mamoglobina aporta información acerca de la presencia de cáncer de seno, esto podría ser la base para desarrollar una prueba de apoyo a las estrategias existente para la detección de la enfermedad.

### 3. JUSTIFICACION

En Colombia, durante el año 2006 el cáncer de seno fue la segunda causa de muerte (117 muertes) después del cáncer gástrico (147 muertes), seguido por cuello uterino (101 muertes), según datos reportados por el *INC*, 2009). Mientras que en el año 2007 el cáncer de seno ocupó el primer lugar (138 muertes), seguido por cáncer gástrico (132 muertes), colon-rectal (115 muertes) y cuello uterino (70 muertes) (*INC*, 2010).

En los últimos años, varios estudios han reportado que la Mamoglobina se expresa en la glándula mamaria y se sobre-expresa en células tumorales de la misma, constituyéndose en un buen candidato para ser utilizado como marcador celular para el diagnóstico de cáncer de seno (*Watson, et al., 1996; Zehentner, et al., 2004; Suchy, et al., 2000; Watson, et al., 1999; O'Brien, et al., 2002*).

El Grupo de Investigación en Ciencias Básicas Médicas de la Universidad del Rosario desarrolló un estudio enfocado a la detección de la expresión del gen que codifica para la Mamoglobina en células epiteliales presentes en circulación aisladas a partir de una muestra de sangre periférica, tanto en pacientes con cáncer de seno como en voluntarias sanas (Cruz., 2008). Se reportó la existencia de una región del gen de la Mamoglobina que se expresa en toda la población analizada, pero con diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen en el grupo de casos conformado por pacientes con diagnóstico clínico-patológico confirmado sin tratamiento, con respecto al grupo control constituido por individuos sin ningún tipo de cáncer ó enfermedad mamaria benigna.

Teniendo en cuenta que aunque se haya encontrado expresión del gen en toda la población de estudio, es probable que debido a la presencia de modificaciones postraduccionales, solamente se detecte la proteína en el grupo de casos. Es por ello, que para dar continuidad a esta línea de investigación y corroborar si la expresión del ARNm de la mamoglobina se correlaciona con la presencia de la proteína sérica, se realizaron pruebas de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima), con anticuerpos que reconocen péptidos de la proteína.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la presencia de Mamoglobina en suero de pacientes con diagnóstico clínico-patológico de cáncer de mama, a partir del reconocimiento de tres regiones de la proteína, usando sueros de conejo inmunizados.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Inmunizar y obtener sueros de conejo que reconozcan la proteína Mamoglobina.
- Determinar la concentración de la proteína Mamoglobina en el suero de pacientes con diagnóstico de cáncer de seno y en voluntarias sanas.
- Correlacionar la concentración de Mamoglobina sérica, con los hallazgos clínico-patológicos de las pacientes diagnosticadas.

## **5. MARCO TEORICO**

### **5.1. ESTADO DEL ARTE**

### **5.2. LA MAMA NORMAL**

La mama madura es un órgano compuesto por una parte de tejido epitelial glandular exocrino túbulo alveolar dispuesto en aproximadamente 15 a 20 lóbulos separados por un componente de tejido conectivo. Cada lóbulo secreta sus productos a un sistema de conductos intralobulares e interlobulares formados por un epitelio cúbico biestratificado que drenan finalmente hacia conductos galactóforos extralobulares, los cuales a su vez terminan en el pezón, el cual se encuentra revestido por tejido escamoso que se extiende hacia la superficie.

La glándula mamaria está compuesta por un parénquima, conformado a su vez, por alvéolos y conductos y por un estroma. Cada célula alveolar se comporta como una unidad de secreción, de modo que produce leche completa, mediante la síntesis y transporte de sustancias como proteínas, grasas, hidratos de carbonos, sales, anticuerpos y agua desde el plasma sanguíneo hasta los conductos excretores (Valdés *et al*/1994)

El desarrollo embrionario glandular se inicia entre las semanas 18 y 19 de la vida prenatal, cuando las yemas mamarias epidérmicas invaden el mesénquima sub-epidérmico en la región anterior del tórax y parte del mesénquima se introduce bajo la dermis para formar un cojinetes graso. En forma simultánea, se originan los conductos, los cuales se extienden y

ramifican para formar un sistema ductal rudimentario (Neville 1999). En el período prepuberal, las vesículas mamarias se transforman en conductos, pero aún no hay alvéolos. Con el inicio de la pubertad comienza a funcionar el eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovario, de modo que la creciente producción de estrógenos por parte de los folículos ováricos, en conjunto con la hormona hipofisiaria de crecimiento, estimulan el crecimiento, tanto del tejido glandular como del estroma que lo rodea. Al comenzar los ciclos ovulatorios, se inicia la producción cíclica de progesterona que sumándose a los estrógenos, determina un nuevo crecimiento de la glándula, con formación de los primeros alvéolos (Ceriani, 1974; Valdés et al, 1994; Russo y Russo 2004).

Durante el ciclo ovárico ocurren cambios hormonales: mientras los estrógenos en la fase folicular estimulan el desarrollo del parénquima y la ramificación de los conductos, durante la fase lútea la progesterona estimula la diferenciación de células alveolares y la dilatación de los conductos.

Durante el embarazo, en las glándulas mamarias de la madre se activa un proceso de diferenciación lobular, que da origen a la transición progresiva de lóbulos tipo 1 a tipo 2, 3 y 4 y se acompaña de alta actividad proliferativa. De esta manera se adquiere la masa celular necesaria para la función de secreción de leche. Debido a esto la presencia de lóbulos tipo 4 es la máxima expresión de desarrollo y diferenciación en la glándula adulta, mientras que la presencia de lóbulos tipo 3 puede indicar la glándula ya se desarrolló.

El desarrollo de la glándula mamaria durante la gestación comprende dos fases importantes: En la *fase temprana*, ocurre la proliferación del árbol ductal y se forman los alvéolos, dentro de lóbulos denominados tipo 3 y 4. Durante esta fase, las mamas aumentan de tamaño y las venas superficiales

de la glándula mamaria se dilatan. La formación progresiva de alvéolos continúa hasta después de la semana 20, momento en el cual la proliferación se reduce al mínimo, para dar comienzo a la actividad secretora. Las células mioepiteliales perialveolares se alargan y adelgazan (Valdés *et al*, 1994) y cada una de las células que constituyen los alvéolos adquieren la capacidad para producir leche completa.

Durante la lactancia, los únicos cambios morfológicos notables son la dilatación de los alveolos y el aumento consecuente en el tamaño de los lóbulos. Una vez sintetizada la leche se libera en la luz de los alvéolos y en el sistema ductal (Russo *et al* 1987). Cuando la madre desteta al bebé, la leche se acumula, tanto en la luz ducto alveolar como en el citoplasma de las propias células secretoras, evento que tiene el efecto de inhibir la síntesis lactogénica. En forma simultánea el volumen de las células secretoras se reduce y disminuye su actividad secretora.

Este proceso de involución puede obedecer a mecanismos de autólisis celular, con estrechamiento del sistema ductal e infiltración de fagocitos en los lóbulos en desintegración, después del cual ocurre regeneración del tejido conectivo periductal y lobular y proliferación de los túbulos terminales. Es por esta razón que las mujeres que han sido gestantes poseen mayor cantidad de tejido glandular, que aquellas que no han gestado y/o lactado (Russo y Russo 2004)

En la menopausia ocurre una regresión del tejido mamario, tanto en mujeres nulíparas como multíparas, y se observa un incremento en los lóbulos tipo 1 y una disminución en los lóbulos tipo 2 y tipo 3, sin embargo la clave para el entendimiento de la aparición de neoplasias mamarias radica en los sucesos que ocurren en años previos al inicio de la menopausia. En las mujeres nulíparas, predominan los lóbulos tipo 1 (65-80%), tipo 2 (10-35%) y en

menor frecuencia los tipo 3 (0-5%), mientras que en las multíparas predomina el tipo 3 (70-90%) (Russo y Russo, 2004).

Después de la menopausia disminuye el número de lóbulos, en especial de tipo 2 y 3. Debido que el cáncer de mama ductal se origina en los lóbulos tipo 1, las mujeres nulíparas tienen un riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama, mientras que mujeres que han tenido hijos permanecen protegidas. Esta observación surge del hecho de que en las mujeres con hijos sus lóbulos son sometidos a diferenciación, mientras que las nulíparas rara vez alcanzan al tipo 3, esto indica que, aunque en ambos grupos de mujeres predomina el tipo 1 durante la menopausia, es posible que las nulíparas sean más susceptibles de sufrir transformación tumoral (Russo, et al. 2000).

La aparición del cáncer de mama en mujeres con hijos puede ocurrir debido a la falta de respuesta del tejido lobular a las condiciones hormonales propias del embarazo y lactancia, lo que hace que no se diferencien completamente y conserven la estructura lobular de las mujeres nulíparas, lo que aumenta el riesgo de carcinogénesis. Este hecho es de gran importancia para conocer la posible respuesta del tejido glándula-mamario a la quimioterapia y quimioprolifaxis (Russo & Russo, 2004).

### **5.3. CANCER DE SENO**

*The National Cancer Institute* de Estados Unidos, define el cáncer de seno, como aquella lesión tumoral que se forma en los tejidos de la mama, por lo general los conductos (tubos que llevan la leche al pezón) y los lobulillos (glándulas que producen la leche). Ocurre tanto en hombres como mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es raro. Encontrándose el mayor número de casos en mujeres mayores de 45 años. En los Estados Unidos el número estimado de casos de cáncer de mama nuevos fue 207.090

(mujeres) y 1.970 (hombres) y el número de defunciones fue de 39.840 (mujeres); 390 (hombres) (*National Cancer Institute*)

### **5.3.1. Epidemiología**

En Colombia el cáncer de seno constituye la primera causa de muerte por cáncer seguido por cáncer de cuello de útero y colon-rectal. Se ha evidenciado desde 1960 un aumento en la tasa de mortalidad por este cáncer, en 1981 era aproximadamente de 4,8 y en 1995 de 6,90; siendo las tasas más altas las encontradas en Bogotá, Medellín y Cali (*FIGO., 2000; Piñeros., 2004*).

Durante el año 2007 se presentaron 661 casos de cáncer de seno correspondiente al 12,5% de casos nuevos diagnosticados en el INC, de los cuales 657 correspondieron a mujeres, cuya clasificación por edad fue:

- 9 (20-29 años),
- 63 (30-39 años)
- 171 (40-49 años),
- 195 (50-59 años),
- 124 (60-69 años),
- 95 ( $\geq 70$  años)

Se presentaron 4 casos nuevos en hombres, cuya distribución por años fue de:

- 1 (40-44 años),
- 1 (60-64 años),
- 2 ( $\geq 70$  años),

Conforme a esto se realizaron 957 procedimientos quirúrgicos en el Servicio de Seno y Tejidos Blandos. Según este mismo organismo 138 personas murieron debido a cáncer maligno de la mama durante el año 2007, de los

cuales 24 tenían entre 15 a 44 años); 42 (45 a 54 años), 36 (55 a 64 años), y 36 (65+ años) (INC., 2010). De acuerdo a estudios del Ministerio de Protección Social, la dirección general de salud pública establece que se observa un aumento en la frecuencia de la enfermedad luego de los 20 años de edad con un pico máximo luego de los 40 años.

### **5.3.2. Clasificación**

De acuerdo a lo establecido por *The National Cancer Institute, de EEUU*, el cáncer de mama se clasifica en los siguientes estadios, considerando la clasificación TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis):

#### ***Estadio 0 (carcinoma in situ)***

Hay dos tipos de carcinoma de mama in situ:

*Carcinoma ductal in situ (CDIS)*: afección no invasora en la que se encuentran células anormales en el revestimiento del conducto de la mama. Las células anómalas no se diseminan fuera de este conducto hasta otros tejidos de la mama. Algunas veces, el CDIS se puede volver cáncer invasor y diseminarse hasta otros tejidos, aunque por el momento no se sabe cómo predecir cuáles lesiones se volverán invasoras.

*Carcinoma lobular in situ (CLIS)*: afección en la que se encuentran células anormales en los lóbulos de la mama. Muy raras veces esta afección se vuelve cáncer invasor; sin embargo, el padecer de carcinoma lobular in situ en una mama aumenta el riesgo de padecer de cáncer de mama en cualquier de las mamas.

#### ***Estadio I***

En el estadio I, el cáncer se ha formado. El tumor mide dos centímetros o menos y no se ha diseminado fuera de la mama.



**Figura 1. Comparación del tamaño del tumor con un fríjol, maní, nuez y limón**  
 La importancia de conocer el tamaño del tumor radica en la necesidad de poder realizar una clasificación adecuada del estadio, teniendo en cuenta la clasificación TNM. (imagen tomada de [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov))

### **Estadio IIA**

- ✓ El tumor mide dos centímetros o menos y está diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares; ó
- ✓ El tumor mide más de dos centímetros pero no más de cinco centímetros y no se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares.

### **Estadio IIB**

En el estadio IIB, el tumor tiene alguna de las siguientes características:

- ✓ Mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares; ó
- ✓ Mide más de cinco centímetros, pero no se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares.

### **Estadio IIIA**

- ✓ El cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras; o se puede encontrar en los ganglios linfáticos cercanos al esternón; ó
- ✓ El tumor mide dos centímetros o menos. El cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras

estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón; ó

- ✓ El tumor mide más de dos centímetros pero no más de cinco centímetros. El cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
- ✓ El tumor mide más de cinco centímetros. El cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

### ***Estadio IIIB***

En el estadio IIIB, el tumor puede tener cualquier tamaño y el cáncer:

- ✓ Se ha diseminado la pared del pecho o a la piel de la mama; y
- ✓ Se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón. El cáncer que ha diseminado hasta la piel de la mama se llama cáncer de mama inflamatorio.

### ***Estadio IIIC***

En el estadio IIIC, puede no haber signos de cáncer en la mama o el tumor puede tener cualquier tamaño y se puede haber diseminado hasta la pared del pecho o a la piel de la mama. Así mismo, el cáncer:

- ✓ Se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos por arriba o debajo de la clavícula;
- ✓ Se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares o hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

El cáncer de mama en estadio IIIC se divide en estadio *IIIC operable* y *estadio IIIC inoperable*.

En el *estadio IIIC operable*, el cáncer:

- ✓ Se encuentra en 10 o más ganglios linfáticos axilares; o
- ✓ Se encuentra en los ganglios linfáticos debajo de la clavícula; o
- ✓ Se encuentra en ganglios linfáticos axilares y en los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

En el *estadio IIIC no operable* del cáncer de mama, el cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos por arriba de la clavícula.

#### ***Estadio IV***

En el estadio IV, el cáncer se ha diseminado hasta otros órganos del cuerpo, con mayor frecuencia hasta los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro.

De acuerdo a estudios realizados en el INC de Bogotá en el 2007, 40,5% de los casos recién diagnosticados, consultaron en estadios mayores a IIB de acuerdo a clasificación TNM basada en la descripción del tumor primario, la invasión de ganglios regionales y la presencia de metástasis (*Piñeros et al, 2004*).

#### **5.3.3. Factores de Riesgo**

Dentro de los factores de riesgo que pueden estar implicados en el desarrollo del cáncer de mama, los cuales son identificables en menos del 70% de los casos de cáncer de seno, se contemplan (*American Cancer Society*):

- Predisposición genética,
- Menarquía temprana
- Menopausia tardía,

- Nuliparidad,
- Primer embarazo posterior a los 30 años
- Obesidad,
- Edad avanzada,
- Consumo de alcohol
- La terapia de reemplazo hormonal combinada por periodos de tiempo prolongados

#### **5.3.4. Diagnóstico**

Las pruebas que se utilizan para la detección de cáncer de mama son el autoexamen, el examen clínico del seno y la mamografía. Sin embargo, la sensibilidad del autoexamen y el examen clínico del seno no supera el 60% y la mamografía, solo identifica el 85% de los tumores (*Díaz, et al., 2005*). Las imágenes diagnósticas tienen el inconveniente de ser operador dependiente y tienen limitaciones tanto para la detección de lesiones muy pequeñas.

Por lo anterior, se ha planteado el uso de técnicas basadas en herramientas moleculares que sirvan de apoyo a las pruebas de tamizaje tradicionales, que permitan la detección de la enfermedad y faciliten la valoración de personas asintomáticas. Entre estas técnicas moleculares, se han propuesto las que permiten identificar la expresión de biomarcadores específicos relacionados con la presencia de células tumorales, a partir de una muestra de sangre periférica.

#### **5.4. CONCEPTO DE LOS MARCADORES TUMORALES**

Un marcador tumoral (o también llamado marcador biológico o biomarcador) es una molécula, sustancia o proceso que está alterado cuantitativa o

cualitativamente en una condición precancerosa o cancerosa detectable por una prueba. Esta alteración puede ser producida por el tumor mismo o por tejido normal circundante en respuesta a la lesión tumoral. (*Hayes, et al., 1996*)

La naturaleza del marcador tumoral es diversa, puede ser un ácido nucleico (ADN o ARN), un péptido, una proteína, o incluso procesos tales como apoptosis, angiogénesis y proliferación entre otros,. Pueden ser detectables en tejido, plasma sanguíneo, saliva, orina y otros fluidos corporales. (*Schrohl, et al., 2003*).

Los marcadores que pueden ser detectados en sangre periférica de pacientes con cáncer, se conocen como tumorales séricos y son un recurso ideal para la detección de células tumorales diseminadas debido a la facilidad de acceso al material biológico para el análisis de la muestra. La presencia de células malignas en sangre fue descrita desde los años 60 (*Zidman, 1961*) y centenares de estudios en la última década han reportado sustancias metabólicas en sangre, producto del proceso de transformación maligna que incluye aumento en la proliferación, pérdida de características morfológicas propias de un tejido o dediferenciación y pérdida de la adhesión, esta última favorece la metástasis de muchos tipos de cáncer (*Xi, et al., 2007*).

### ***Características de un Marcador Sérico***

Un marcador tumoral sérico idealmente debe ser una sustancia producida por la célula neoplásica o cuya regulación esté bajo su control, que refleje el aumento en la actividad proliferativa celular y que además permita determinar la presencia, evolución o respuesta terapéutica de un tumor maligno. Adicionalmente debe reunir varias de las siguientes características (*Lozano, et al., 2005*):

- Estar presente en los tumores
- Ser secretado por ellos
- Ser detectable en sangre
- Ser cuantificable en forma fácil y reproducible
- No estar regulado por procesos no tumorales
- Correlacionarse con el desarrollo de la lesión maligna, tanto en presencia, como en ausencia de tratamiento.

Sin embargo, hasta el momento no se han reportado marcadores tumorales con sensibilidad y especificidad suficientes para emplearse de forma general e infalible, en el diagnóstico precoz del cáncer por las siguientes razones (*Rivera, 1997; Rubial, 2002*):

- Los niveles séricos de un marcador tumoral pueden incrementarse en personas con tumores benignos.
- Existe variabilidad de los niveles séricos de los marcadores tumorales entre individuos, principalmente en estadios tempranos de la enfermedad.
- Muchos de estos marcadores tumorales no son exclusivos de neoplasias malignas sino que también se expresan en células normales, pero su expresión en células cancerosas puede ser aberrante ya sea porque se aumenta o disminuye o porque el producto presenta alteraciones en la estructura o por cambios en su función.

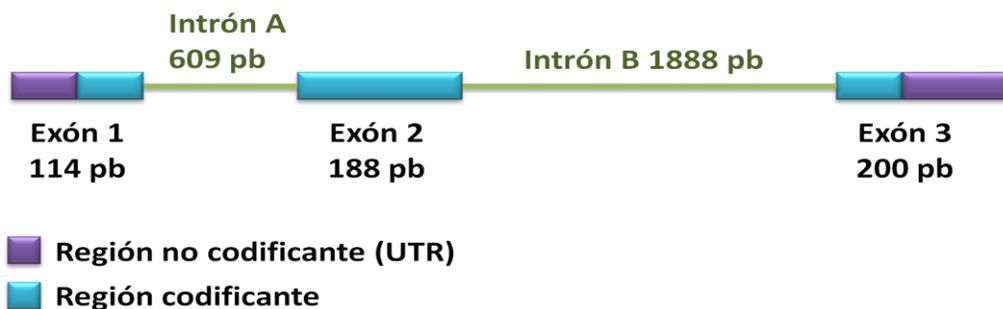
Finalmente, pueden existir casos en los cuales la detección del marcador está influenciada por patologías autoinmunes o desordenes metabólicos y no por un proceso neoplásico.

## 5.5. MAMOGLOBINA HUMANA

### 5.5.1. Estructura del gen.

El gen de la Mamoglobina humana, fue identificado en el año de 1996 por Watson y Fleming (*Watson, et al., 1996*). El gen que codifica para la Mamoglobina junto con otros miembros de la familia de las Secretoglobinas como la Uteroglobina (UGB), la Mamoglobina B (MGB), la Lipofilina A (LPA) y la Lipofilina B (LPB) forman un “cluster” o grupo de genes sobre el cromosoma 11q12.2 (*Watson, et al., 1998; O'Brien, et al., 2002*).

El gen de la Mamoglobina A (SCGB2A2) tiene una longitud de aproximadamente 2.999 pb y está conformado por tres exones y dos intrones (*Fig. 2*).



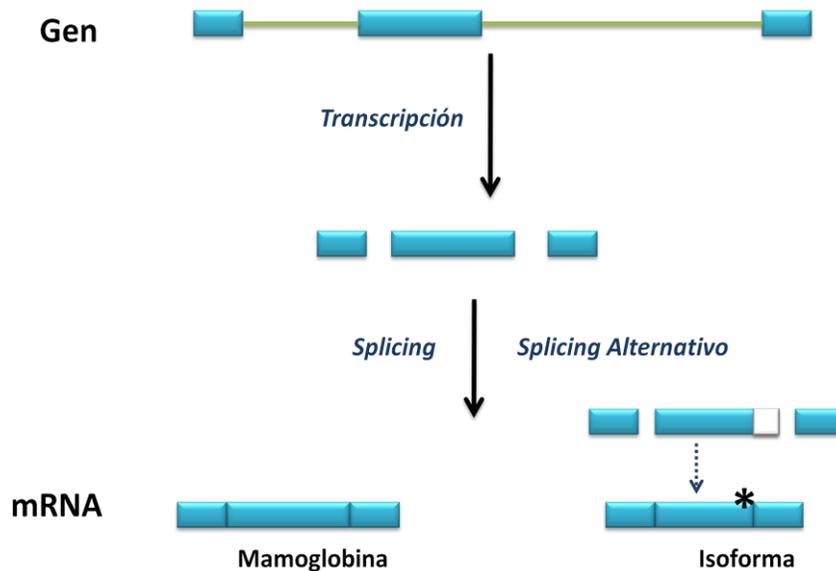
**Figura 2. Estructura del gen que codifica para la proteína Mamoglobina-** El gen está formado por dos intrones (líneas verdes) y tres exones, las regiones codificantes corresponden a las cajas azules, y las regiones no codificantes 3'UTR y 5'UTR corresponden a las cajas moradas.

### 5.5.2. Transcripción del gen

Este gen se transcribe en un RNA mensajero de 503pb, el tamaño de la secuencia codificante es 282pb. En cuanto a los factores reguladores de la transcripción poco se sabe. Estudiando la secuencia de la región proximal al promotor para el inicio de la transcripción, se han identificado sitios

potenciales de unión para dos factores de transcripción conocidos, PEA3 y AP-1. Un elemento de repetición de 9 pares de bases (pb), referido como elemento B fue identificado para esta misma región, localizado a -215 y -165 upstream del sitio de inicio de la transcripción (Watson, et al., 1998; Hesselbrock, et al., 2005).

Se conoce una isoforma de 273 pb generada por splicing alternativo reportada en el año 2003 por Zhao y Nan en la base de datos del NCBI (Número de Acceso: 28932885). Para la producción de ésta isoforma se pierden 9 pb del segundo exón.



**Figura 3. Transcripción del gen de la Mamoglobina.**

La transcripción del gen que codifica para la mamoglobina da origen a un transcrito primario, el cual por splicing alternativo puede generar dos ARNm, Uno de estos se traduce en una proteína de 93 aminoácidos, el otro con 9 pares de bases menos al final del exón 2, se traduce en una isoforma de la Mamoglobina con tres aminoácidos de menos.

La expresión génica del gen que codifica para la Mamoglobina está restringida a la glándula mamaria del adulto. De acuerdo al análisis del nivel de expresión de mRNA en 35 biopsias de tumor de mama, encontraron un

incremento de 10 veces en comparación al tejido de mama normal (*Watson, et al., 1996*).

El grupo de Min et al., hallaron que niveles de mRNA de Mamoglobina fueron detectados en 60% de nódulos linfáticos axilares de pacientes con cáncer de seno metastásico pero no en nódulo linfático normal de pacientes sin cáncer. Mientras que, Zach et al. no encontraron expresión de Mamoglobina en cortes de tejido de útero, ovario y leucoféresis humana usando RT-PCR, lo que puede estar reflejando la especificidad de expresión de Mamoglobina A en glándula mamaria. Posteriormente Grunewald y cols en 2002, reportaron expresión del gen de la Mamoglobina tanto en tejido benigno como maligno de cérvix, útero y ovario usando RT-PCR anidada, sin embargo la expresión en la glándula mamaria fue mayor en comparación a útero y endometrio.

Nuñez-Villar, et al., evaluaron 128 muestras de tejido de cáncer de mama, usando la técnica de RT-PCR, este grupo reportó una correlación positiva entre la presencia de Mamoglobina, el estatus del receptor de estrógenos y progesterona, contenido ADN diploide y bajo índice de Ki67. Estos hallazgos indican que la elevada expresión de Mamoglobina en cáncer de mama se asocia con un fenotipo tumoral menos agresivo (Nuñez-Villar, et al., 2003)

### **5.5.3. Proteína**

La Mamoglobina es un miembro de la familia de las Secretoglobinas y está compuesta por 93 aminoácidos y tiene un peso molecular de 8.48 KDa. Posee dos sitios de N-glicosilación en los residuos de Asn 35 y 50 y una secuencia de péptido señal de 20 a.a debido a que es una proteína secretada por las células de la glándula mamaria (*Carter, et al., 2002; Zehentner, et al., 2004*).

La Mamoglobina forma un complejo covalente con la Lipofilina B por medio de puentes disulfuro entre las Cys 4, 47 y 72 de la Mamoglobina y las Cys 3,

44 y 67 en la Lipofilina (Carter, et al., 2002; Zehentner, et al., 2004). Este complejo puede encontrarse en 2 formas diferentes, una de alto peso molecular (25 kDa) en la que las proteínas están ampliamente glicosiladas y otra de bajo peso molecular (18 kDa) en la que las dos proteínas se encuentran glicosiladas parcialmente. Sin embargo, la forma de bajo peso molecular nunca ha sido detectada en ausencia de la forma de alto peso molecular (O'Brien, et al., 2002).

#### *Expresión en tumor primario:*

En 1999 Mark Watson y cols., analizaron por inmunohistoquímica tejido tumoral y no tumoral de mama, y encontraron que la proteína Mamoglobina estaba presente en el 80% de los carcinomas ductales bien diferenciados, moderada y pobremente diferenciados y una fuerte señal en 3/3 carcinomas ductal *in situ* (DCIS). Sin embargo, la frecuencia de inmunorreactividad de Mamoglobina en los conductos no neoplásicos y acinos fue inferior al 10%. Lo cual sugiere que aunque la expresión de Mamoglobina no es realmente tumor-específica, hay una diferencia en el nivel de expresión entre el epitelio mamario maligno y no maligno (Watson et al. 1999).

#### *Expresión en nódulo linfático*

En 2009 Raica y cols., examinaron por inmunohistoquímica tejidos de tumor primario y ganglio linfático de 47 pacientes con cáncer de seno con edades entre 27 y 75 años, que no habían recibido quimioterapia ó radioterapia, se encontró expresión de Mamoglobina en el 74,19% de los tumores primarios y 58,06% de nódulos linfáticos. No encontraron correlación entre la presencia de Mamoglobina en las muestras de tejido tumoral y la edad, estadio e histología del tumor, pero si hubo correlación con el grado de diferenciación tumoral (Raica, et al., 2009).

### *Expresión en suero*

En 2002 Fanger y cols., usaron el anticuerpo MAM-2D3 en pruebas de ELISA, para evaluar muestras de suero de 15 mujeres sanas, 30 mujeres con cáncer de mama primario y 35 mujeres con cáncer de mama metastásico. Los anticuerpos fueron obtenidos por inmunización de ratones con la proteína recombinante. También usaron un anticuerpo que reconoce el péptido 967 (QLIYSSLCDLF) que se ubica en la región carboxi-terminal.. De las muestras analizadas, fueron positivas para Mamoglobina: el 6% de las mujeres sanas, 47% de las mujeres con cáncer de mama primario y 44% de las mujeres con cáncer de mama metastásico. Las concentraciones de la proteína en los pacientes osciló entre 0,07-9,6 ng/ml y en los controles 0-0,07 ng/ml. Estos resultados mostraron que la detección de Mamoglobina podría ser una buena opción en la detección de cáncer de mama. A la vez se encontró que la expresión de Mamoglobina no era dependiente del estadio o grado (Fanger, et al., 2002).

En 2004 Zehentner y cols., determinaron por la técnica de ELISA y con la ayuda del anticuerpo monoclonal RO28 que reconoce el complejo Mamoglobina nativo (Carter, et al., 2004; Zehentner, et al., 2004), la concentración de Mamoglobina en 142 mujeres con cáncer de seno en diferentes estadios y en 91 mujeres sanas. Aunque se detectó expresión en 70% de las pacientes, el punto de corte a partir del cual se consideraba que las pacientes eran positivas para Mamoglobina, fue establecido mediante una curva ROC, para la concentración de Mamoglobina en 1,71  $\mu\text{g/L}$  arrojó que sólo el 28% de las pacientes fueron positivas. El estadio en que se encontraban las pacientes en el momento de realizar la prueba y la positividad de expresión fue: estadio **I** (0/1), **Ila** (3/6), **Ilb** (6/24), **IIla** (5/16), **IIlb** (14/41) y **IV** (25/52). Adicionalmente encontraron que los Estadios **I** – **III** tenían concentraciones entre 0,9 – 1,4  $\mu\text{g/L}$  y el Estadio **IV** 2,3  $\mu\text{g/L}$ , a la vez

observaron una fuerte asociación entre los niveles de Mamoglobina y el tamaño del tumor (Zehentner, et al., 2004).

Posteriormente Bernstein y cols en el año 2005, basándose en el uso de un anticuerpo monoclonal anti-Mamoglobina generado contra un residuo peptídico de 16 aminoácidos (EVFMQLIYDSSLCDLF) localizado en la región carboxi terminal de la proteína Mamoglobina, establecieron un punto de corte de 8,8 ng/ml (con una sensibilidad de 68,8% y una especificidad de 88,8%). Este grupo analizó 52 muestras de suero provenientes de mujeres sin cáncer y 26 de mujeres con cáncer de seno metastásico; ambos grupos incluían tanto mujeres pre-menopáusicas como post-menopausias: Los resultados mostraron concentraciones de Mamoglobina promedio de 9,38 ng/ml en el grupo de mujeres con cáncer de seno metastásico y 9,75ng/ml y en el grupo control 7,90 ng/ml y 7,52ng/ml, respectivamente (Bernstein, et al., 2005).

#### **5.5.4. Función**

Integrantes de la Familia de las Uteroglobinas homólogos a la Mamoglobina en rata y otros mamíferos, presentan funciones variadas dentro de las cuales se han descrito:

- Una acción inmunosupresión por inhibición de la proliferación de linfocitos y disminución de niveles de IL-2 (*Maccioni & cols, 2001*).
- Inducción de autoinmunidad, jugando un papel de Antígeno humoral y celular. (*Maccioni & cols, 1998*).
- Actividad antiinflamatoria de péptidos derivados de las proteínas uteroglobina (*Moreno & cols, 1997*).
- Función similar a ciertas citocinas en un momento indefinido vía mediada por receptor (*Mukherjee & cols, 1999*).

Aunque la función de la Mamoglobina no es conocida aún, esta proteína presenta algunas características que sugieren que su expresión es de particular relevancia para la biología del cáncer de seno, planteándose que pueda jugar un papel importante en el transporte de hormonas sexuales (estrógenos y progesterona) a la glándula mamaria, lo permitiría la inducción de la proliferación celular a través de los Receptores de Estrógenos (RE) y Progesterona (RP).

## 6. HIPOTESIS

- La concentración de la proteína Mamoglobina determinada a partir del uso de suero de conejos inmunizados con tres péptidos sintéticos de la secuencia de la Mamoglobina, es diferente en el suero de pacientes con cáncer de seno en comparación a la de personas sin ningún tipo de cáncer.
- La concentración de la proteína Mamoglobina determinada a partir del uso de suero de conejos inmunizados con tres péptidos sintéticos de la secuencia de la Mamoglobina, es similar en el suero de pacientes con cáncer de seno en comparación a la de personas sin ningún tipo de cáncer.

## **7. METODOLOGIA**

### **7.1. TIPO DE ESTUDIO**

Se trata de un estudio Analítico-Comparativo de casos y controles 1:1.

### **7.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO**

#### **7.2.1. Grupo de casos**

##### **Criterios de inclusión**

- Mujeres de 18 años o más que deseen participar voluntariamente. (consentimiento informado).
- Pacientes con cáncer de seno con diagnóstico clínico.
- Pacientes que no hayan iniciado ningún tipo de tratamiento antitumoral.

##### **Criterios de Exclusión**

- Mujeres con tumores de seno benignos.
- Mujeres menores de 18 años.
- Mujeres con terapia de reemplazo hormonal.

#### **7.2.2. Grupo Control**

##### **Criterios de Inclusión**

- No presentar ni haber presentado diagnóstico confirmado de cáncer de ningún tipo.
- No presentar sintomatología asociada con patología mamaria y tener exámenes normales de mama de acuerdo a la edad.

### **Criterios de Exclusión**

- Personas menores de 18 años.
- Mujeres con terapia de reemplazo hormonal.

### **7.3. TAMAÑO DE LA POBLACIÓN**

La población estudiada estuvo constituida por 51 pacientes diagnosticadas clínicamente con cáncer de seno, con confirmación histológica de la enfermedad y previa revisión de la historia clínica para establecer si cumplían con los criterios de inclusión para el estudio. La toma de la muestra no interfirió con el curso normal del tratamiento al que se sometió la paciente, en los casos que así lo establecieron los médicos tratantes. Las pacientes que recibieron algún tratamiento o que en el momento del estudio lo estuvieran recibiendo no fueron tenidas en cuenta en el estudio.

El grupo control estuvo constituido por 51 personas sin ningún tipo de cáncer que desearon participar voluntariamente.

Las muestras tanto de pacientes como de controles fueron tomadas en el Hospital Universitario Mayor – Méderi y en el Centro de Investigaciones Oncológicas Clínica San Diego (CIOSAD).

### **7.4. RECOLECCIÓN MATERIAL BIOLÓGICO A ESTUDIAR**

Se tomó una muestra de 10 ml de sangre en tubos sin anticoagulante mediante punción en vena periférica a cada individuo participante. Se cumplió con las debidas normas de asepsia y antisepsia. Se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos, con el fin de separar el suero de la fracción celular (glóbulos rojos, blancos y plaquetas). Los sueros fueron almacenados en el congelador a -20° Centígrados hasta el día de la prueba. Se obtuvo

información de los individuos participante mediante consulta de historia clínica (en el caso de los pacientes) y consentimiento informado y hoja de registro (Anexo 16 y 17)

## **7.5. GENERACION DE ANTICUERPOS ANTI-MAMOGLOBINA**

Con el fin de determinar la concentración de la proteína Mamoglobina en el suero de pacientes con cáncer de seno y en mujeres sanas, se produjeron anticuerpos Anti-Mamoglobina en conejos New Zealand.

El propósito fue obtener anticuerpos que reconocieran tres regiones diferentes de la proteína, para lo cual se sintetizaron pépticos de la secuencia proteica de la Mamoglobina, con los cuales se inmunizaron 8 conejos, cuyos sueros posteriormente fueron utilizados para detectar la presencia de Mamoglobina en el suero de las pacientes e individuos control..

### **7.5.1. PREDICCIÓN DE EPÍTOPES B Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS**

Se analizó la secuencia de la proteína Mamoglobina para identificar posibles epítopes B ó determinantes antigénicos, que son reconocidos por el sistema inmunológico, específicamente por anticuerpos, ó linfocitos B, utilizando el programa *Bepi Pred* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) el cuál predice la ubicación de los epítopes lineales de células B con una combinación de un modelo oculto de Markov y un método propensión escala. Este programa mostró tres posibles secuencias peptídicas que podrían funcionar como epítopes B (*Tabla 1*)

Con el fin de poder determinar la presencia de la isoforma de la proteína Mamoglobina reportada en NCBI por Zach y cols en 2003, se realizó la síntesis de un cuarto péptido (D) el cuál difiere del tercero en 3 aminoácidos (Val-Phe-Met). (*Tabla 1*).

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición</b>
<b>Péptido A</b>	GCINPQVSKTECG	a.a 13 a 21
<b>Péptido B</b>	GCDDNATTNAICG	a.a 31 a 39
<b>Péptido C</b>	GCNVE <u>V</u> FMQLICG	a.a 56 a 64
<b>Péptido D</b>	GCSNVE QLIYDCG	isof a.a 56 a 64

**Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de los péptidos sintetizados.**

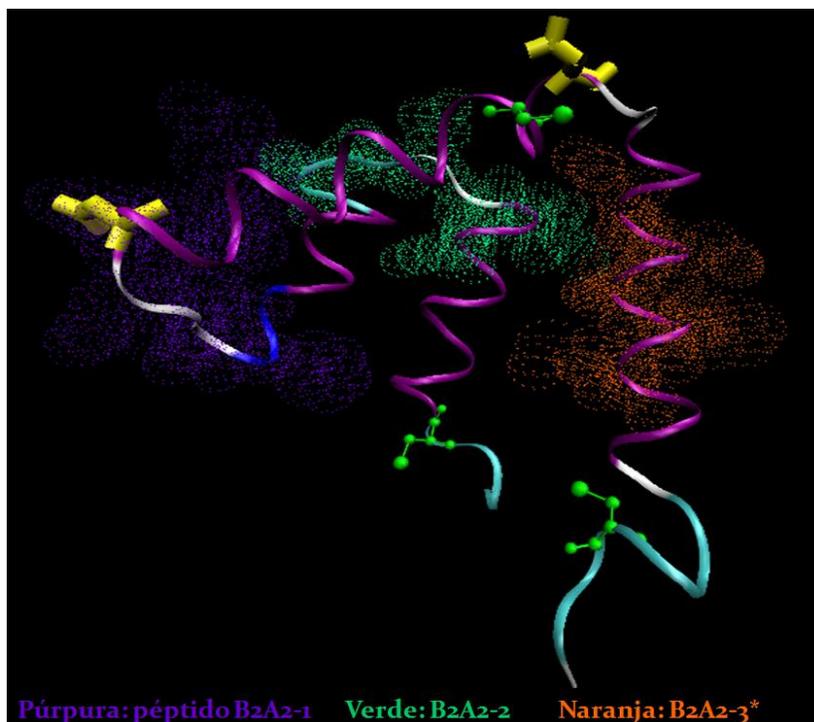
Se observa las secuencias de aminoácidos de los péptidos A, B, C de Mamoglobina los cuales según el programa Bepi Pred mostraron ser inmunogénicos. El péptido D corresponde a la secuencia de la Isoforma sin los 3 aminoácidos que la diferencian.

La síntesis de los péptidos se realizó por el método de t-Boc, en la *Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) - Grupo Funcional de Síntesis*. Brevemente, este método sigue el procedimiento de Merrifield (1959), con el cual se sintetizan los péptidos mediante un proceso inverso al que realizan las células, es decir, se comienza por el extremo C-terminal y se van uniendo uno a uno por cada reacción, los aminoácidos que siguen según la secuencia elegida para el péptido.

Inicialmente se une el aminoácido del extremo C-terminal mediante su extremo C-terminal a una resina de poliestireno, con lo que queda anclado a ella y, además, se protege su cadena lateral, para evitar que se una a otro aminoácido que está libre en la solución. Previamente su grupo amino se ha protegido con cloruro de terbutiloxicarbonilo (t-Boc) para que no reaccione con la resina, pero en este paso interesa dejarlo al descubierto, por lo que se lava el aminoácido unido a la resina con ácido tricloroetanoico para liberar el extremo amino. Este proceso se lleva a cabo sobre papel filtro porque la resina no puede atravesarlo, esto es mucho más cómodo que una síntesis en fase líquida. Al lavar la resina se libera el t-Boc como CO<sub>2</sub> y metilbutano.

Una vez e el aminoácido se fija con su extremo amino libre, hay que ponerlo en contacto con el siguiente aminoácido. Éste también viene con su extremo N-terminal protegido con t-Boc, pero su extremo C-terminal está activado con diciclohexilcarbodiimida, que al condensarse con el amino del aminoácido unido se libera en forma de diciclohexilurea. De este modo se consigue un dipéptido unido a la resina por su extremo C-terminal y con el extremo N-terminal protegido con t-Boc. Para continuar la síntesis se vuelve a lavar la resina con ácido tricloroetanoico y a repetir los pasos anteriores.

En la figura 4 se observa la ubicación de los péptidos sintetizados en la estructura de la proteína Mamoglobina (se utilizó el programa *Protein Structure Prediction*, para obtener una predicción de la estructura, por homología con otras proteínas. Para la visualización se utilizó el programa *Visual Molecular Dynamics, Univ. Illinois*). En 2004 Jaramillo y cols, utilizaron unos péptidos similares a los péptidos A y C del presente estudio (Jaramillo, et al., 2004), dónde los catalogaron como epítopes restringidos al HLA-A2 reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>); posteriormente en 2010 Basha y cols, utilizaron péptidos similares, reportándolos como péptidos inmunogénicos que poseen una alta afinidad de unión a HLA-B7 (Basha, et al., 2010).



**Figura 4. Ubicación de los péptidos A, B, C en la secuencia de la proteína Mamoglobina.** En color morado y sombreado se observa el área que ocupa en la estructura de la Mamoglobina el péptido A, en verde sombreado el péptido B y en naranja sombreado el péptido C

Previo a la inoculación de los conejos con los péptidos sintetizados, se evaluó que los péptidos no fueran homólogos a la uteroglobina SCGB1A1 presente en los conejos, ni a otras integrantes de la familia de las Secretoglobinas humanas. Esto se realizó utilizando el programa *Clustal W* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), comparando las secuencias peptídicas de Mamoglobina A, con las demás Secretoglobinas humanas y de conejo (Anexo 18).

### 7.5.2. INOCULACION DE LOS CONEJOS

A fin de obtener sueros con anticuerpos Anti-Mamoglobina, se utilizaron 8 conejos New Zealand, dos conejos para cada péptido. Inicialmente se tomó una muestra de suero a los conejos con el fin de conservar esta muestra como control pre-inmune. Se inocularon los péptidos sintéticos descritos

anteriormente en los conejos, administrándose una dosis cada 20 días, en total se administraron tres dosis de péptido a cada conejo (Figura 5).



**Figura 5. Proceso de Inmunización de los conejos.** El proceso se hizo en 5 fases. Fase 1. Pre-immune: en la cual se tomaron muestras de sangre de los 8 conejos. De la fase 2 a la 4 se inoculó una dosis de 500µl: 250µl sln péptido (500µg del péptido en H<sub>2</sub>O destilada) + 250µl adyuvante Freund (Freund's Adjuvant, Complete cell suspension, Sigma-Aldrich Co). La fase 5 correspondió a la sangría final.

#### – Fase 1. Pre-immune

El día 08 de octubre de 2009 a los 8 conejos de 20 días de nacidos se les tomó muestra de sangre (5mL). Con el fin de conservar como muestra control pre-immune.

#### – Fase 2. Primera dosis

El día 05 de noviembre de 2009 a cada uno de los 8 conejos se les inoculó 500µl: 250µl sln péptido (500µg del péptido en dH<sub>2</sub>O) + 250µl adyuvante incompleto (Vogel, et al., 2004) *Freund's Adjuvant, Incomplete* (Sigma-Aldrich Co, Catalog N° F5506).

Se inocularon 8 conejos New Zealand:

- Conejos 53-54 → Péptido A
- Conejos 55-57 → Péptido B
- Conejos 62-75 → Péptido C
- Conejos 78 -80 → Péptido D

- **Fase 3. Segunda dosis**

El día 27 de noviembre de 2009 cada uno de los 8 conejos se le inoculó 500µl: 250µl sln péptido (500µg en dH<sub>2</sub>O) + 250µl *Freund's Adjuvant, Complete cell suspensión (Sigma-Aldrich Co, Catalog N° F5881)*

- **Fase 4. Tercera dosis**

El día 18 de diciembre de 2009 a cada conejo se le inoculó 500µl: 250µl sln péptido (500µg en dH<sub>2</sub>O) + 250µl adyuvante Freund.

- **Fase 5. Sangría Final**

El día 13 de enero de 2010, después de 65 días de haber sido inoculados, se realizó la sangría final de los conejos, conservando las Normas Bioéticas para el manejo de animales de experimentación, estipulados en la Ley Colombiana en el uso de Animales de Experimentación (*Ver 8. Aspectos Éticos*).

## 7.6. PRE-ABSORCION SUEROS

Con el fin de realizar una eliminación de anticuerpos inespecíficos presentes en el suero de los conejos, se realizó una pre-absorción de estos sueros.

Este procedimiento consiste en pasar los sueros a través de una columna de resina de sefarosa *CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham Biosciences)*

acomplada con lisado de *M smegmatis*, *E coli* y el péptido sintético *Spf66* (cada lisado en una columna).

Se tomó 0,8 - 1,0mL de resina para cada columna y se puso 1mL de suero. Se dejó en rotación suave por 30 min. Se pasó el suero a un tubo eppendorf de 2mL.

Se lavó la columna con PBS 1X, 3 veces. Seguidamente se realizaron 4 lavados a la columna con soluciones de pH alternado (*Ácido: ACONa-0,1M + NaCl-0,5M pH 4,0 / Base: Tris HCl-0,1M + NaCl-0,5M pH 8,0*). Seguido de 2 lavados con PBS 1X. Los sueros se conservaron a -80°C. La resina se guardó en azida de sodio al 0,2%.

### **Preparación soluciones**

- *PBS 10X Solución Stock 1 Litro / Sln trabajo pH 7,3*

NaCl	80g	137mM NaCl
KCl	2g	2,7mM KCl
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5g	4,3mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g	1,4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

- *ACONa-0,1M + NaCl-0,5M pH 4,0*

Pesar: ACONa 4,1g  
NaCl 14,61g

Se disolvió en 0,5 Litros de agua destilada.

\* El pH ácido hace que se rompan las uniones formadas entre la sefarosa y los anticuerpos obtenidos a partir del suero, de esta manera se limpian las columnas.

- *Tris HCl-0,1M + NaCl-0,5M pH 8,0*

Pesar: Tris 6,06 g

NaCl 14,61g

Se disolvió en 0,5 litros de agua destilada.

\* A pH 8,0 se neutraliza la columna para ser utilizada de nuevo.

## 7.7. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS

Con el fin de evaluar la capacidad de los sueros de conejo para reconocer el péptido correspondiente con el cual fueron inmunizados los conejos, se realizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA), en el cual adicional al uso de los sueros hiper-inmunes se utilizó como control negativo el suero pre-inmune de cada conejo.

Cada suero Pre-inmune e Hiper-inmune se evaluó con los 4 péptidos con el propósito de estimar posibles reconocimientos cruzados. Los pozos periféricos no se utilizaron (organización de la placa *anexo 1*).

### 7.7.1. Protocolo Elisa

- a. A cada pozo de la placa de Elisa se fijó 100µl de solución de péptido en una concentración de 10µg/mL.

Para lo cual a 1mg de péptido liofilizado y se le agregó 1ml de PBS 1X. Se mezcló muy bien, agitando fuertemente. De esta solución [1000µg/mL] se tomó 100ul y se llevó a 10mL con PBS 1X.

- b. La placa se incubó 1 hora a 37°C. Seguidamente se incubó toda la noche a 4°C.

- c. Al día siguiente se incubó 1 hora a 37°C. y se lavó la placa: tres veces con *solución de lavado\** y un lavado final con *agua destilada*.

\* *Preparación solución de lavado PBS 1X-Tween 20 al 0,5%:*

10ml de Tween 20 y se lleva a 2000mL con PBS 1X.

- d. Se bloqueó con ***solución bloqueadora*** 350µl/pozo.

*Preparación solución bloqueadora PBS 1X-Tween20 0,5%-Leche descremada 5%:*

5g de leche descremada se disolvieron en 100mL de PBS1X-Tween20 0,5%

- e. Se incubó 1 hora a 37°C. Se realizaron tres lavados con la solución de lavado y un lavado final con agua destilada. De la manera como se explicó anteriormente..
- f. Se adicionó 100µl/pozo de suero de los conejos en una dilución 1:100.  
Dilución: 10µl de suero más 1000µl de *solución bloqueadora*.  
*Blanco*: 100µl/pozo de PBS 1X
- g. Se incubó 1 hora a 37°C. Se realizaron cuatro lavados\*.
- h. Se agregó 100µl/pozo del anticuerpo secundario dilución 1:5000.  
10µl de Peroxidase Anti-Rabbit IgG (H+L) (*Vector Laboratories, Inc*) se disolvieron en 50ml de *solución bloqueadora*.
- i. Se incubó 1 hora a 37°C. Se realizaron cuatro lavados\*
- j. Se agregó 100µl/pozo de *Solución Reveladora* sustrato TMB-peroxidasa *TMB-One Solución (Promega)*.
- k. Después de 15 min se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620nm.

### **7.7.2. Identificación de reconocimiento cruzado de los sueros**

Se decidió realizar un segundo ensayo con el fin de determinar la existencia de reconocimiento cruzado de los sueros hacia otros péptidos, por lo cual de forma adicional se realizó una pre-incubación de cada suero con otros inoculados *Tabla 2*.

- Péptido A: El suero 53 se utilizó una dilución 1:20. Los sueros 55, 75 y 78, en dil 1:100 adicionalmente, el suero 75 se pre-incubó con el péptido A.

*Preparación pre-incubación:* 100µl de suero 75 dil1.100 + 100ul sln péptido A [1mg/ml]. Se pre-incubó 30 min a 37°C. Se adicionó de esta mezcla 100µl/pozo.

- Péptido B: El suero 53 se utilizó una dilución 1:20. Los sueros 62 y 75 en dil 1:100 adicionalmente, el suero 75 se pre-incubó con el péptido B.

*Preparación pre-incubación:* 100µl de suero 75 dil1.100 + 100ul sln péptido B [1mg/ml]. Se pre-incubo 30 min a 37°C. Se adicionó de esta mezcla 100µl/pozo

- Péptido C: El suero 53 se utilizó una dilución 1:20. El suero 57 en dil 1:100.
- Péptido D: El suero 53 se utilizó una dilución 1:20. El suero 57, 78 y 80 en dil 1:100.

	53 H.I	55 H.I	57 H.I	62 H.I	75 H.I	75 H.I + Péptido A ó B	78 H.I	80 H.I
<b>Péptido A</b>	Dil 1:20	Dil 1:100	-	-	Dil 1:100	Preincubó con péptido A [1mg/ml].	Dil 1:100	-
<b>Péptido B</b>	Dil 1:20	-	-	Dil 1:100	Dil 1:100	Preincubó con péptido B [1mg/ml].	-	-
<b>Péptido C</b>	Dil 1:20	-	Dil 1:100	-	-	-	-	-
<b>Péptido D</b>	Dil 1:20	-	Dil 1:100	-	-	-	Dil 1:100	Dil 1:100

**Tabla 2. Evaluación del reconocimiento de los péptidos por parte de los anticuerpos contenidos en los sueros Hiper-Inmunes de los conejos.** Se analizaron los sueros que habían presentado reconocimiento cruzado hacia otros péptidos. El suero 53 fue analizado nuevamente frente a los 4 péptidos, pero usando una dilución 1:20. Adicionalmente el suero 75 se pre-incubó con los péptidos A ó B con el fin de determinar la especificidad del reconocimiento.

Posteriormente se realizó un ensayo con los sueros 55, 57, 62, 75 y 80, pre-incubándolos con el péptido que está reconociendo de manera cruzada, con el fin de evaluar si esa reacción interfiere con el reconocimiento de la secuencia peptídica blanco.

La preparación de las soluciones Suero-Péptido pre-incubadas se realizó igual que en el ensayo anterior.

### **7.7.3. Purificación del suero 75 hiperinmune en columna de sefarosa con péptidos A y B**

Debido a las reacciones cruzadas que el suero 75 H.I presentaba frente a los péptidos A y B; se purificó en una columna de resina de sefarosa *CNBr-activated Sepharose 4B* (Referencia *Armershan Biosciences*) acoplada con péptidos A y B, con el fin de eliminar los anticuerpos que están reconociendo estos péptidos

#### **Preparación soluciones**

- **HCL 1mM**

100 ml H<sub>2</sub>O destilada (dH<sub>2</sub>O)

8,3 µl HCl 37%

- **Buffer de Acoplamiento pH 8,3**

NaHCO<sub>3</sub> 0,1M 4,2 g

NaCl 0,5M 15,61 g

dH<sub>2</sub>O 0,5 litros

- **Buffer de Bloqueo Tris-HCl 0,1M pH 8,0**

Tris 6,06 g

dH<sub>2</sub>O 0,5 litros Equilibrar pH con HCL 0,1M

- **Soluciones de pH alternado**

\* *ACONa-0,1M + NaCl-0,5M pH 4,0*

Pesar: ACONa 4,1g

NaCl 14,61g

Disolver en 0,5 litros de agua destilada.

\* *Tris HCl-0,1M + NaCl-0,5M pH 8,0*

Pesar: Tris 6,06 g

NaCl 14,61g

Disolver en 0,5 litros de agua destilada.

#### 7.7.4. Protocolo purificación-columna sefarosa CNBr-4B

Con el fin de eliminar los anticuerpos presentes en los sueros, que están reconociendo de manera cruzada los péptidos. Se purificaron los sueros pasándolos a través de columnas de sefarosa que tenían fijados a ellas los péptidos.

A continuación se explica el protocolo de fijación a la sefarosa de los péptidos y el proceso de purificación de los sueros.

- **Preparación de la columna sefarosa CNBr-4B.**

- a. Se tomó 0,5g de polvo seco de resina de sefarosa y se lavó. con 100mL de **HCl 1mM**.
- b. Se disolvió el péptido A y el B en **Buffer de Acoplamiento**.
  - 2,5mL de buffer de acoplamiento para 0,5g de polvo seco de sefarosa.
  - 2,5 $\mu$ mol de péptidos / 2,5mL columna. Péptido A: 3,1mg y Péptido B: 3,4mg
- c. Se adicionó la solución de ligando en la columna que contiene la resina preparada. Se colocó en agitación media toda la noche a 4°C.
- d. Se lavó el exceso de ligando con mínimo 5 volúmenes de *buffer de acoplamiento*.
- e. Se bloquearon los grupos activos remanentes adicionando **Buffer de bloqueo** llevando a 5ml. Se agitó por rotación suave 1h y se dejó en reposo por otra hora.
- f. Se lavó 3 veces con ciclos de **soluciones de pH alternado**. Primero con *ACONa-0,1M + NaCl-0,5M pH 4,0* y luego con *Tris HCl-0,1M + NaCl-0,5M pH 8,0*.

g. Se realizó 2 lavados con PBS 1X

- **Purificación del suero 75**

h. Se agregó 1mL de suero en la columna. Se dejó en rotación suave por 30 min. Seguidamente se pasó el suero a un tubo eppendorf de 2mL.

i. Se lavó la columna con PBS 1X, 3 veces. Posteriormente se realizaron 4 lavados a la columna con soluciones de pH alternado (*Ácido: ACONa-0,1M + NaCl-0,5M pH 4,0 / Base: Tris HCl-0,1M + NaCl-0,5M pH 8,0*). Seguido de 2 lavados con PBS 1X.

j. El suero se conservó a -80°C. La columna se almacenó a 4-8°C en etanol al 20%.

#### **7.7.5. Evaluación de la especificidad del suero 75 purificado**

Al suero 75 purificado en una columna de sefarosa con los péptidos A y B acoplados a esta, se le evaluó la capacidad de reconocimiento de su péptido blanco (péptido C) y de los péptidos A y B. Adicionalmente se valió si el reconocimiento se mantenía al pre-incubar el suero con el péptido A, B ó en combinación AB

Se siguió el protocolo del numeral **7.7.1 Protocolo Elisa**

#### **7.7.6. Evaluación de la especificidad de reconocimiento de los sueros seleccionados**

A los sueros de conejo seleccionados para la detección de mamoglobina en suero de mujeres, se les evaluó nuevamente su capacidad de reconocer sus respectivos péptidos en Dilución 1:10. La selección se realizó teniendo en cuenta que no presentaran reconocimiento cruzado hacía otros péptidos,

como los sueros 55 y 78, ó que presentaran una señal moderada de reconocimiento cruzado, como los sueros 55 y 62.

Se siguió el mismo protocolo del anterior ensayo, usando dilución 1:10 del suero de conejo.

Los sueros seleccionados fueron:

- ✓ Suero Anti-Péptido A → Suero 54
- ✓ Suero Anti-Péptido B → Suero 55
- ✓ Suero Anti-Péptido C → Suero 62
- ✓ Suero Anti-Péptido D → Suero 78

## **7.8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA MAMOGLOBINA RECOMBINANTE**

Con el fin de determinar la concentración de Mamoglobina en el suero de las pacientes, se realizó una curva estándar para cada uno de los sueros de conejo obtenidos, usando *diferentes concentraciones de proteína Human Mammaglobin (Ray Biotech, Inc. Catalog N° 228-11074)*.

### ***Preparación diluciones***

- Se preparó una solución de proteína Mamoglobina [25ng/ml]:  
0,3 ul..... Stock Mamoglobina recombinante [100ng/ul]  
1200 ul..... PBS 1X

A partir de esta solución de Mamoglobina [25ng/ml] se realizaron 9 diluciones seriadas hasta una concentración de [0,048ng/ml].

### ***Protocolo Elisa***

- a. Se fijó al pozo de la placa las diluciones de la proteína 100µl/pozo.  
*Blanco:* 100µl/pozo de PBS 1X.

- b. Se incubó 1 hora a 37°C. Seguidamente se incubó toda la noche a 4°C.
- c. Al día siguiente se incubó 1 hora a 37°C.
- d. Se lavó la placa: tres veces con *solución de lavado* y un lavado final con agua destilada.  
  - \* *Preparación solución de lavado PBS 1X-Tween 20 al 0,5%:*  
10ml de Tween 20 y se lleva a 2000mL con PBS 1X.
- e. Se bloqueó con *solución bloqueadora* 350µl/pozo.  
  - Preparación solución bloqueadora PBS 1X-Tween20 0,5%-Leche descremada 5%:*  
5 gramos de leche descremada se disolvieron en 100mL de PBS1X-Tween20 0,5%
- f. Se incubó 1 hora a 37°C.
- g. Tres lavados\*.
- h. Se adicionó 100µl/pozo de suero de los conejos 54, 55, 62, 78 en una dilución 1:10.  
  - Dilución: 100µl de suero más 1000µl de *solución bloqueadora*.
- i. Se incubó 1 hora a 37°C.
- j. Tres Lavados\*.
- k. Se agregó 100µl/pozo el anticuerpo secundario dil 1:5000.  
  - 10µl de Peroxidase Anti-Rabbit IgG (H+L) (*Vector Laboratories, Inc*) se disolvieron en 50ml de *solución bloqueadora*.
- l. Se incubó 1 hora a 37°C.
- m. Tres Lavados\*
- n. Se agregó 100µl/pozo de *Solución Reveladora* sustrato TMB-peroxidasa *TMB-One Solución (Promega)*.
- o. Después de 15 min se realizó la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620nm.

## 7.9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MAMOGLOBINA EN LOS SUEROS DE LOS PACIENTES Y DE LOS INDIVIDUOS CONTROL

Para detectar la proteína Mamoglobina en las muestras de suero de los grupos de pacientes y de control se utilizaron los sueros de conejo seleccionados y evaluados anteriormente 54, 55, 62 y 78, los cuales reconocen las secuencias peptídicas A, B, C y D de la Mamoglobina, respectivamente.

### Protocolo ELISA

- a. Se unió la placa los sueros de las pacientes y controles sin diluir 100µl/pozo. Como blanco de la reacción se utilizó PBS 1X.
- b. Se incubó 1hora a 37°C. Seguidamente se incubó toda la noche a 4°C.
- c. Al día siguiente se incubó 1h a 37°C.
- d. Se lavó la placa: tres veces con *solución de lavado* y un lavado final con agua destilada\*.
- e. *Preparación solución de lavado PBS 1X-Tween 20 al 0,5%:*
- f. 10ml de Tween 20 y se lleva a 2000mL con PBS 1X.
- g. Se bloqueó con ***solución bloqueadora*** 350µl/pozo.
- h. Se incubó 1h a 37°C.
- i. Tres lavados (*paso d*)\*.
- j. Se adicionó 100µl/pozo de suero de los conejos en una dilución 1:10. Para el Anticuerpo 55 se realizó una pre-incubación con Péptido A en [1mg/ml]
- k. Dilución: 10µL de suero más 1000µL de *solución bloqueadora*.
- l. *Blanco*: 100µL/pozo de PBS 1X
- m. Se incubó 1h a 37°C.
- n. Tres Lavados (*paso d*)\*.

- o. Se agregó 100µL/pozo el anticuerpo secundario Peroxidase Anti-Rabbit IgG (H+L) (*Vector Laboratories, Inc*) dil 1:5000.
- p. Se incubó 1h a 37°C.
- q. Tres Lavados (*paso d*)\*
- r. Se agregó 100µL/pozo de *Solución Reveladora* sustrato TMB-peroxidasa *TMB-One Solución (Promega)*.
- s. Después de 15 min se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620nm.

### **7.9.1 Elisa suero pacientes con suero Anti-péptido B, pre incubando con Mamoglobina**

Al analizar las muestras de suero de las pacientes con cáncer de seno con el Suero Anti-Péptido B se observó mayores lecturas de absorbancia que con los demás anticuerpos, por lo cual se realizó un ensayo pre incubando el Suero Anti-Péptido B con la proteína Mamoglobina y posteriormente se utilizó para determinar la concentración de la proteína en el suero de las pacientes con cáncer de seno. Adicionalmente se analizaron tres muestras con el suero 55 pre-inmune con miras a determinar que el reconocimiento no se debía a la presencia de anticuerpos previos en los conejos.

Los sueros de pacientes que se analizaron fueron los siguientes:

Paciente	Suero Anti-A Pre- incubando con Mamoglobina	Ac 55 Pre- inmune
41	✓	-
42	✓	-
44	✓	-
45	✓	-
46	✓	-
47	✓	✓
48	✓	✓
49	✓	✓
50	✓	-
51	✓	-
52	✓	-
55	✓	-
56	✓	-

### 7.9.2 Protocolo Pre-incubación Suero Anti-Péptido B con Mamoglobina Recombinante

- Se preparo una solución de proteína Mamoglobina [25ng/mL]:  
0,125 µL..... Stock Mamoglobina recombinante [100ng/uL]  
500ul..... PBS 1X
- A partir de esta solución de Mamoglobina [25ng/mL] se realizaron 7 diluciones en base dos hasta una concentración de [0,19ng/mL].
  - a. Se fijó al pozo de la placa las diluciones de la proteína 100µL/pozo (por duplicado).
  - b. Se incubó 1h a 37°C. Seguidamente se incubó toda la noche a 4°C.
  - c. Al día siguiente se incubó 1h a 37°C.
  - d. Se lavó la placa: tres veces con *solución de lavado* y un lavado final con agua destilada.
  - e. Se bloqueó con *solución bloqueadora* 350µL/pozo.

- f. Se incubó 1 hora a 37°C.
- g. El suero de cada pozo de la placa fue recogido en tubos eppendorf.

- **Protocolo Elisa**

- a. Se unió la placa los sueros de las pacientes sin diluir 100µL/pozo. Como blanco de la reacción se utilizó PBS 1X.
- b. Se incubó 1h a 37°C. Seguidamente se incubó toda la noche a 4°C.
- c. Al día siguiente se incubó 1h a 37°C.
- d. Se lavó la placa: tres veces con *solución de lavado* y un lavado final con agua destilada\*.
- e. Se bloqueó con *solución bloqueadora* 350µl/pozo.
- f. Se incubó 1h a 37°C.
- g. Tres lavados (*paso d*)\*.
- h. Ac primario se adicionó:
  - \*Suero 55 pre-incubado con la proteína recombinante (7.17.1. *Protocolo Pre-incubación Suero 55*) de los conejos en una dilución 1:10.
  - \*\*Suero 55 P.I: Dil 1:100, 100µL /pozo
- i. Dilución: 10µL de suero más 1000µL de *solución bloqueadora*.
- j. *Blanco*: 100µL/pozo de PBS 1X
- k. Se incubó 1h a 37°C.
- l. Tres Lavados (*paso d*)\*.
- m. Se agregó 100µL/pozo el anticuerpo secundario Peroxidase Anti-Rabbit IgG (H+L) (*Vector Laboratories, Inc*) dil 1:5000.
- n. Se incubó 1h a 37°C.
- o. Tres Lavados (*paso d*)\*
- p. Se agregó 100µL/pozo de *Solución Reveladora* sustrato TMB-peroxidasa *TMB-One Solución (Promega)*.
- q. Después de 15 min se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 620nm.

## **7.10. ANALISIS ESTADÍSTICO**

Las variables fueron descritas a partir de la presentación del recorrido de sus valores, la media, desviación estándar y algunos percentiles. Los datos fueron presentados en gráficos de tipo box-plot y diagramas de error que presentaron los intervalos de confianza del 95% para la media. Para el análisis de la relevancia de las diferencias entre grupos se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov en dependencia del número de poblaciones a comparar. Para la valoración del efecto de las diferentes variables que pudieran influir sobre los niveles séricos de Mamoglobina se ajustaron modelos de regresión lineal. Se utilizó la correlación de Pearson para determinar la relación entre la Edad y la concentración de Mamoglobina en el grupo de paciente. Adicionalmente se determinó el Índice de Detectabilidad, el área bajo la curva y la construcción de la Curva ROC.

Para el procesamiento estadístico se utilizó el sistema SPSS

## **8. ASPECTOS ÉTICOS**

El presente estudio se considera un trabajo de riesgo mínimo, para los pacientes participantes, según los criterios para la investigación en seres humanos del Ministerio de Salud, recopilados en la resolución N° 008430 de 1993 y fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad del Rosario.

Los pacientes recibieron información acerca de los objetivos, métodos, beneficios y posibles incomodidades que este pudiera presentar, así como de la libertad de participar o no en el proyecto ó de retirarse del estudio en el momento en que lo consideraran pertinente.

Se hizo énfasis en el respeto a la privacidad e integridad de los pacientes incluidos en el estudio y los pacientes o sus representantes legales suministraron su consentimiento informado en forma escrita para participar en el estudio.

Se les informó que los resultados provenientes de este estudio, no les serían informados y que el beneficio de este sería para la comunidad científica mediante la contribución al conocimiento de la etiología de la enfermedad.

El manejo de los conejos se realizó conservando las Normas Bioéticas para el manejo de animales de experimentación, estipulados en la Ley Colombiana en el uso de Animales de Experimentación: La ley 84, sancionada por el congreso de Colombia el 27 de diciembre de 1989, “Por la cual se adopta el estatuto Nacional de Protección de los Animales”, en su capítulo sexto hace referencia a los animales de experimentación.

Capítulo VI “Del Uso de Animales vivos en Experimentos e Investigación”.  
Resolución 8430 de 1993 Min. Salud – Colombia “Por la cual se establecen  
las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en  
salud”. Título V “La investigación Biomédica con Animales”.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. DATOS POBLACIÓN

La población de estudio estuvo conformada por 51 pacientes con diagnóstico clínico-patológico de cáncer de mama confirmado, que además no habían recibido tratamiento y 51 controles sin ningún tipo de cáncer, ni enfermedad mamaria.

Característica	Pacientes	Controles
<i>Edad</i>	27,0 – 85,9 años	28,1 – 85 años
<i>IMC</i>	17,3 – 40,0	19,1 – 35,1
<i>Copa Brasier</i>	A: 7 (14 %) B: 42 (82%) C: 2 (4%)	A: 7 (14 %) B: 42 (82%) C: 2 (4%)
<i>Edad Menarquía</i>	9 – 20 años	11-16 años
<i>Gestación</i>	Si: 46 (90,2%) No: 5 (9,8%)	Si: 46 (90,2%) No: 5 (9,8%)
<i>Edad Primer Embarazo</i>	16 – 38 años	15 – 36 años
<i>Anticonceptivos Orales</i>	Si: 14 (27,4%) No: 37 (72,6%)	Si: 15 (29,4%) No: 36 (70,6%)
<i>Terapia Hormonal</i>	Si: 2 (3,9%) No: 49 (96,1%)	Si: 1 (2,0%) No: 50 (98,0%)
<i>Menopausia</i>	Si: 39 (76,5%) No:12 (23,5%)	Si: 41 (80,4%) No:10 (19,6%)
<i>Edad Menopausia</i>	39 – 59 años	34 – 55 años
<i>Familiar con cáncer</i>	Si: 29 (56,9%) No: 22 (43,1%)	Si: 28 (54,9%) No: 23 (45,1%)
<i>Tipo Cáncer</i>	Ductal <i>in situ</i> : 2 (3,9%) Lobular Infiltrante: 2 (3,9%) Ductal Infiltrante: 32 (67,4%) Canalicular Infiltrante: 7 (13,7%) Enf. de Paget: 1 (1,9%) Adenocarcinoma: 1 (1,9%)	

	Carcinoma Apocrino: 1 (1,9%) ND: 5 (9,8%)
<i>Receptor Progesterona</i>	Positivo: 22 (43,1) Negativo: 11 (21,6%) ND: 18 (35,3%)
<i>Receptor Estrógenos</i>	Positivo: 25 (49%) Negativo: 9 (17,7%) ND: 17 (33,3%)
<i>Erbr</i>	Positivo: 10 (19,6) Negativo: 15 (29,4%) ND: 26 (51%)
<i>Estadío</i>	I: 2 (3,9%) IIa: 5 (9,8%) IIb: 12 (23,5%) IIIa: 18 (35,3%) IIIb: 9 (17,6%) IV: 5 (9,8%)
<i>Metástasis</i>	Si: 8 (15,7%) No: 43 (82,3%)
<i>Recaída</i>	Si: 4 (7,8%) No: 41 (92,2%)

**Tabla 3. Características de la Población estudiada.**

*Se analizaron en las pacientes y controles las variables reportadas por estar relacionadas con el desarrollo de cáncer de mama. (IMC: Índice de Masa Corporal)*

El tipo de cáncer más frecuente fue el Carcinoma Ductal invasivo (32 - 67,4%), seguido del Canalicular infiltrante (7 - 13,7%). En el 43,1% y 49% de las pacientes se encontraron los receptores de progesterona y estrógenos positivos, en cuanto a Erb2 se encontró positivo en el 10% de las pacientes. El estadio más frecuente fue IIIA (35,3%), IIB (23,5%) y IIIB (17,6%).

**El índice de masa corporal (IMC)**, es un factor determinante de los niveles de colesterol y triglicéridos en la sangre, y está asociado al consumo de grasas. Niveles séricos altos de estos componentes se relacionan directamente con la obesidad. Se ha descrito que las grasas y la obesidad

pueden desempeñar un papel importante en el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas (Colditz, et al., 2001). El vínculo entre la nutrición y el cáncer es muy controvertido, la asociación entre la grasa en la dieta o más específicamente la ingesta de grasas saturadas de origen animal y el desarrollo de cáncer de mama. Estudios previos han sugerido que factores de riesgo de cáncer de mama relacionados con hormonas, tales como historia reproductiva e IMC, pueden tener un pronunciado efecto en el desarrollo de tumores positivos ó negativos para receptor de hormonas (Colditz, et al., 2004).

**GESTACIÓN** Después de la menopausia disminuye el número de lóbulos, en especial de tipo 2 y 3. Debido que el cáncer de mama ductal se origina en los lóbulos tipo 1, las mujeres nulíparas tienen un riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama, mientras que mujeres que han tenido hijos permanecen protegidas. Esta observación surge del hecho de que en las mujeres con hijos sus lóbulos son sometidos a diferenciación, mientras que las nulíparas rara vez alcanzan al tipo 3, esto indica que, aunque en ambos grupos de mujeres predomina el tipo 1 durante la menopausia, es posible que las nulíparas sean más susceptibles de sufrir transformación tumoral (Russo, et al., 2000).

**EDAD PRIMER EMBARAZO** La temprana edad del primer parto se asocia fuertemente con los tumores más agresivos, a pesar de su efecto protector sobre el riesgo de una vida de desarrollar cáncer de mama. La edad temprana del primer embarazo a término (<20 años), en comparación con la nuliparidad, se asoció con cánceres de mama que no eran localizados y de grado superior. Sin embargo, cuando se restringió el análisis a las mujeres

que han tenido hijos, no se encontró asociación significativa de los tumores no localizados o grado (Venerosso, et al., 2008).

**ANTICONCEPTIVOS ORALES** A pesar de la gran cantidad de evidencia sobre los efectos cancerígenos de los anticonceptivos hormonales (HBC) y la terapia de reemplazo hormonal (TRH) por aumentar el riesgo a desarrollar cáncer de mama (Cogliano, et al., 2005), sigue siendo poco claro si las mujeres son más susceptibles a los efectos de estos esteroides sexuales exógenas en puntos específicos durante el curso de la vida.

Parece que en la perimenopausia puede ser una ventana importante de susceptibilidad del tejido mamaria a desarrollar lesiones de tipo cancerígenas por influencia de los esteroides sexuales exógenos (Cogliano, et al., 2005). El incremento del riesgo visto con el uso doble HBC y TRH es también de importancia para la salud pública, como un gran número de mujeres ya han sido expuestas a HBC en sus años reproductivos, así como la TRH a edades más avanzadas, pero el efecto de la utilización conjunta ha sido en su mayoría ignorado. Sin embargo, estudios demuestran que el efecto del uso de hormonas exógenas en el pasado no se extiende a edades más avanzadas, lo cual es tranquilizador ya que la incidencia de cáncer de mama es mayor en el futuro.

**TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL (THR)** es un factor de riesgo bien establecido para el cáncer de mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996; Li, et al., 2003). Múltiples estudios observacionales documentan riesgos de 1.6 a 3,0 veces mayor de cáncer de mama asociado con el uso actual, a largo plazo de la THR (Daling, et al., 2002; Kirsh, et al., 2002; Collins, et al., 2005). Los mecanismos por los cuales

THR, en particular progestágeno, influye en el riesgo de cáncer de mama siguen siendo inciertos.

Con la aparición de la progesterona por exhibir tanto cualidades anticancerígenos y procarcinogénicas en el cuerpo femenino (Lewis, et al., 2004; Skildum, et al., 2005) hay un potencial de mecanismos implicados en esta dualidad de acción sobre su rol en la carcinogénesis de mama. En primer lugar, el receptor de progesterona (PGR) gen que codifica para las isoformas 2 PGR: PGR y PGR-A-B, que tienen objetivos opuestos transcripcional (Giangrande, et al., 2000). Además, varias enzimas implicadas en el metabolismo del preceptor progesterona, incluyendo las enzimas esteroide 5-A reductasa (SRD5A) y aldo-ceto reductasa 1C (AKR1C), metabolizan progesterona en la 5a-pregnanes y 4 pregnenes, respectivamente (Lewis, et al., 2004). Estos metabolitos tienen efectos opuestos en el tejido de mama: La 5a-pregnanes se ha observado que aumenta la proliferación celular, mientras que el 4-pregnenes están asociados con la activación débil de la PGR (Wiebe, et al., 2003). La enzima citocromo P-450 3A4 (CYP3A4) participa en esta vía, la gran mayoría de la EPT utilizadas en los Estados Unidos contiene un progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona, que es predominantemente metabolizada en el hígado por la enzima CYP3A4 (Kobayashi, et al., 2000).

**MENOPAUSIA** El estradiol, el estrógeno endógeno más potente, es el producto de secreción importante del ovario que representa la principal fuente de estrógenos asociada al cáncer de mama en mujeres premenopáusicas. Después de la menopausia, la mayor parte del estradiol circulante se deriva de estrona (hormona estrógenica secretada por el ovario, así como el tejido adiposo), que en sí mismo es producido por la conversión periférica de la androstenediona, el precursor de la testosterona. Hay pruebas que apoyan el papel de las hormonas sexuales en el aumento del riesgo a desarrollar cáncer de mama por inducción y acumulación de

alteraciones genéticas sobre el ADN de las células de la mama. Por lo tanto, la hipótesis de la asociación positiva entre los niveles de hormonas sexuales y riesgo de cáncer de mama dependen de la edad, por lo tanto en cuanto más tardía sea la edad de la menopausia, mayor va a ser el tiempo que va a estar expuesto el tejido mamario a las hormonas sexuales.

**FAMILIAR CON CANCER** la presencia de familiares en primer o segundo grado con antecedentes de cáncer de próstata, mama, útero y ovario, entre otros, se asocia con la existencia de mutaciones en genes como BRCA1-2, los cuales están fuertemente implicados en la aparición de cáncer de mama heredofamiliar.

## **9.2. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS.**

Con el fin de determinar la especificidad de cada suero hacía su péptido blanco, se evaluó la señal de reconocimiento frente a los 4 péptidos utilizados durante el proceso de inmunización (A, B, C, D). Para lo cual se utilizó la muestra de suero extraída de cada uno de los 8 conejos durante la fase 1, antes de realizarse la inmunización, por lo tanto este suero denominado Preimmune, funcionó como control de que el reconocimiento se debe a la presencia de anticuerpos generados después de la Fase 1, o sea a lo largo de las fases 2 a 4. Por consiguiente a la muestra de suero extraída en la fase 5 se denomina Hiperimmune, debido que fue extraída después de las 3 inmunizaciones realizadas a los 8 conejos, por consiguiente contiene los anticuerpos generados frente al péptido con el cual se inmunizó cada conejo.

### 9.2.1. Péptido A vs Sueros Preinmune e Hiperinmune

Utilizando como antígeno el péptido A (GCINPQVSKTECG), no se obtuvo señal con el suero Anti-péptido A (53), mientras que el suero Anti-péptido A (54) presentó un valor de absorbancia de 0,954 DO, muy superior al blanco 0,052 DO (Tabla 4).

Los sueros Anti-péptido B (55), Anti péptido C (75) y Anti-péptido D (78) reconocieron el péptido A de manera cruzada. En cuanto a los sueros Anti-péptido B (57), Anti-péptido-C (62), y Anti-péptido D (80) no mostraron reconocimiento cruzado (Tabla 4, Anexo 2).

Péptido A								
53 P.I	54 P.I	55 P.I	57 P.I	62 P.I	75 P.I	78 P.I	80 P.I	Blanco
0,005	0,007	-0,005	0,003	0,009	0,007	0,001	0,006	0,052
53 H.I	54 H.I	55 H.I	57 H.I	62 H.I	75 H.I	78 H.I	80 H.I	
0,130	0,954	0,089	0,029	0,013	0,454	0,049	0,009	

**Tabla 4. Valores de absorbancia obtenidos a partir de las pruebas de ELISA realizadas con los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) en presencia del Péptido A.** En la tabla se observan los valores de absorbancia que los sueros pre-inmune e hiper inmune muestran hacia el péptido A, en lo cual se observo que todos los sueros P.I no reconocieron este péptido. Mientras que algunos de los sueros H.I reconocieron de manera cruzada este péptido (55.HI, 75 H.I y 78 H.I). En cuanto al suero Anti-péptido A (54H.I) mostró un adecuado reconocimiento de este péptido. (Los valores de absorbancia presentados en la tabla son el producto de restar a la absorbancia original de cada suero, el valor del blanco a fin de eliminar absorbancia base de la reacción.

### 9.2.2. Péptido B vs Sueros Preinmune e Hiperinmune

Utilizando como antígeno el péptido B (GCDDNATTNAICG), se observó que los sueros Anti-péptido B (55 y 57) reconocieron sus péptidos blanco (Tabla 5). Los sueros Anti-péptido A (54) Anti-péptido D (78 y 80) no reaccionaron

de manera cruzada. Por el contrario los sueros Anti-péptido C (62 y 75) si mostraron reconocimiento cruzado frente a este péptido (*Tabla 5, Anexo 3*).

Péptido B								
53 P.I	54 P.I	55 P.I	57 P.I	62 P.I	75 P.I	78 P.I	80 P.I	Blanco
0,011	0,000	0,001	0,006	0,006	-0,001	-0,001	0,000	0,050
53 H.I	54 H.I	55 H.I	57 H.I	62 H.I	75 H.I	78 H.I	80 H.I	
0,051	0,011	1,267	1,362	0,178	0,279	0,016	0,005	

**Tabla 5. Valores de absorbancia obtenidos a partir de las pruebas de ELISA realizadas con los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) en presencia del Péptido B.** En la tabla se observan las absorbancias que los sueros pre-inmune e hiper inmune muestran hacía el péptido B, en lo cual se observo que todos los sueros P.I no reconocieron este péptido. Mientras que algunos de los sueros H.I reconocieron de manera cruzada este péptido (62.HI y 75 H.I). En cuanto a los sueros Anti-péptido B (55H.I y 57H.I) mostraron un adecuado reconocimiento de este péptido. (Los valores de absorbancia presentados en la tabla son el producto de restar a la absorbancia original de cada suero, el valor del blanco a fin de eliminar absorbancia base de la reacción).

### 9.2.3. Péptido C vs Sueros Preinmune e Hiperinmune

Utilizando como antígeno el péptido C (GCNVEVFMQLICG), se observó que los sueros Anti-péptido C (62 y 75) mostraron absorbancias por encima de las del blanco. Los sueros Anti-péptido A (53 y 54), Anti-péptido B (55), y Anti-péptido D (78 y 80) no reconocieron de manera cruzada. En cuanto al suero Anti-péptido B (57) presentó reacción cruzada (*Tabla 6, Anexo 4*).

Péptido C								
53 P.I	54 P.I	55 P.I	57 P.I	62 P.I	75 P.I	78 P.I	80 P.I	Blanco
0,020	0,018	0,012	0,016	0,038	0,018	0,012	0,013	0,044
53 H.I	54 H.I	55 H.I	57 H.I	62 H.I	75 H.I	78 H.I	80 H.I	
0,055	0,032	0,041	0,144	0,907	0,932	0,052	0,020	

**Tabla 6. Valores de absorbancia obtenidas a partir de las pruebas de ELISA realizadas con los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) en presencia del Péptido C.** En la tabla se observan las absorbancias que los sueros pre-inmune e hiper inmune muestran hacia el péptido C, en lo cual se observo que todos los sueros P.I no reconocieron este péptido. Mientras que el suero 57 H.I reconoció de manera cruzada este péptido. En cuanto a los sueros Anti-péptido C (62H.I y 75H.I) mostraron un adecuado reconocimiento de este péptido. (Los valores de absorbancia presentados en la tabla son el producto de restar a la absorbancia original de cada suero, el valor del blanco a fin de eliminar absorbancia base de la reacción).

#### 9.2.4. Péptido D vs Sueros Preinmune e Hiperinmune

Utilizando como antígeno el péptido D (GCSNVEQLIYDCG), se observó que los sueros Anti-péptido D (78H.I y 80 H.I) mostraron reconocimiento de su péptido blanco, aunque la absorbancia del suero 80 fue menor a la del 78. Los sueros Anti-péptido A. Anti-péptido B y Anti-péptido C no presentaron reacción cruzada frente a este péptido (Tabla 7, Anexo 5).

Péptido D								
53 P.I	54 P.I	55 P.I	57 P.I	62 P.I	75 P.I	78 P.I	80 P.I	Blanco
0,037	0,032	0,034	0,040	0,060	0,018	0,016	0,008	0,049
53 H.I	54 H.I	55 H.I	57 H.I	62 H.I	75 H.I	78 H.I	80 H.I	
0,045	0,017	0,043	0,066	0,009	0,063	0,956	0,381	

**Tabla 7 Valores de absorbancia de los sueros Pre-Inmunes (P.I) e Hiper-inmunes (H.I) frente al Péptido D.** En la tabla se observan las absorbancias que los sueros pre-inmune e hiper inmune muestran hacia el péptido B, en lo cual se observo que todos los sueros P.I no reconocieron este péptido. En cuanto a los sueros Anti-péptido D (78H.I y 80 H.I) mostraron un adecuado reconocimiento de este péptido. Los demás sueros H.I no mostraron reconocimiento cruzado hacia este péptido (53 H.I, 54 H.I, 55 H.I, 57 H.I, 62.HI y 75 H.I). (Los valores de absorbancia presentados en la tabla son el producto de restar a la absorbancia original de cada suero, el valor del blanco a fin de eliminar absorbancia base de la reacción).

### **9.3. IDENTIFICACIÓN RECONOCIMIENTO CRUZADO**

Debido a la posibilidad de reconocimiento cruzado que presentaron los sueros hiperinmunes hacia otros péptidos, se decidió realizar un segundo ensayo con el fin de confirmar la existencia de este reconocimiento cruzado, por lo cual de forma adicional se realizó una pre-incubación de cada suero con los péptidos que reconocieron de forma cruzada, con el propósito de determinar si existía disminución en la señal de reconocimiento hacia este péptido y hacía su péptido blanco y de esta forma confirmar la especificidad de dicho reconocimiento.

#### **9.3.1. Péptido A vs Sueros Hiperinmunes**

El suero Anti-péptido A (53) utilizando una dilución 1:20 mostró una mayor absorbancia frente a su péptido blanco. En cuanto a los sueros Anti-péptido B (55) y Anti-péptido D (78) no mostraron reacción cruzada hacía este péptido. El suero Anti-péptido C (75) reconoció de manera cruzada el péptido A y al pre-incubar con este péptido disminuyó la absorbancia al nivel del blanco, lo cual indica que existen anticuerpos en este suero que está reconociendo de forma cruzada dicho péptido (*Tabla 8*) (*Anexo 6 y 7*).

#### **9.3.2. Péptido B vs Sueros Hiperinmune**

El suero Anti-péptido A (53) utilizando una dilución 1:20 no mostró reconocimiento cruzado hacía el péptido B. En cuanto a los sueros Anti-péptido C (62 y 75) presentaron reconocimiento cruzada hacía el péptido B y al pre-incubar el suero 75 con el péptido B disminuye marcadamente la absorbancia, lo cual confirmó la existencia de anticuerpos presentes en el suero que reconocen este péptido B (*Tabla 8, Anexo 6 y 8*).

### 9.3.3. Péptido C vs Sueros Hiperinmune

El suero Anti-péptido A (53) utilizando una dilución 1:20 no mostró reconocimiento cruzado hacía el péptido C. En cuanto al suero Anti-péptido C (57) si presentó reconocimiento cruzado hacía este péptido (Tabla 8) (Anexo 6 y 9).

### 9.3.4. Péptido D vs Sueros Hiperinmune

El suero Anti-péptido A (53) utilizando una dilución 1:20 y el suero Anti-péptido C (57) no mostraron reconocimiento cruzado hacía este péptido. En cuanto a los sueros Anti-péptido D (78 y 80) se confirmo su reconocimiento cruzado, denotando que la absorbancia del suero 80 fue menor a la del suero 78 (Tabla 8) (Anexo 6 y 10).

	53 H.I	55 H.I	57 H.I	62 H.I	75 H.I	75 H.I + Pep	78 H.I	80 H.I	Blco
<b>Péptido A</b>	0.451	0.15	-	-	0.417	0.007	0.053	-	0.042
<b>Péptido B</b>	0.065	-	-	0.619	0.431	0.006	-	-	0.044
<b>Péptido C</b>	0.05	-	0.543	-	-	-	-	-	0.045
<b>Péptido D</b>	0.035	-	0.026	-	-	-	0.831	0.316	0.043

**Tabla 8. Evaluación especificidad de los sueros de conejos. Valores de absorbancia obtenidos mediante pruebas de ELISA**

*El suero 53 muestra una única señal hacía su péptido A usando una dilución 1:20. De igual forma los sueros 78 y 80 reconocen únicamente su péptido D. Los sueros 55, 57 y 62 muestran señal de reconocimiento cruzado hacía los péptidos A, C y B, respectivamente. El suero 75 reconoce de forma cruzada los péptidos A y B; al pre-incubar el suero con estos péptidos disminuye la lectura de la absorbancia, lo cual confirma la especificidad de los anticuerpos hacía estos péptidos. (Los valores de absorbancia presentados en la tabla son el producto de restar a la absorbancia original de cada suero, el valor del blanco a fin de eliminar absorbancia base de la reacción).*

#### 9.4. VERIFICACION DE INESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS HIPERINMUNES.

- *Suero Anti-péptido B (55).* Reconoce débilmente el péptido A y al pre-incubar con este péptido disminuye la señal hasta el nivel del blanco. Reconoce el péptido B y al pre-incubar con péptido A, disminuye ligeramente la señal (*Tabla 9*) (*Anexo 11*).
- *Suero Anti-péptido B (57).* Reconoce de manera cruzada el péptido C y al pre-incubar con este disminuye sólo la mitad de la señal. Reconoce de forma positiva el péptido B y al pre-incubar con el péptido C disminuye la señal en una tercera parte (*Tabla 9*) (*Anexo 11*).
- *Suero Anti-péptido C (62).* Reconoce el péptido B de forma cruzada y al pre-incubar con este péptido disminuye la señal al nivel del blanco. Reconoce de forma positiva el péptido C y al pre-incubar con péptido B, disminuye marcadamente la señal, a la mitad (*Tabla 9*) (*Anexo 11*).
- *Suero Anti-péptido C (75).* Reconoce de forma cruzada los péptidos A y B y al pre-incubar con estos disminuye la señal al nivel del blanco. Reconoce de forma positiva el péptido C y al pre-incubar con combinación de péptidos A+B, disminuye marcadamente la señal, a la mitad (*Tabla 9*) (*Anexo 11*).

	55 H.I	55 H.I +A	57 H.I	57 H.I + C	62 H.I	62 H.I + B	75 H.I	75 H.I + A	75 H.I + B	75 H.I + AB	Blco
Péptido A	0,17	0,01	-	-	-	-	0,52	0,006	-	-	0,04
Péptido B	1,51	1,32	1,42	1,07	0,47	0,02	0,27	-	0,009	-	0,04
Péptido C	-	-	0,41	0,19	0,91	0,47	0,84	-	-	0,374	0,08
Péptido D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17

**Tabla 9. Verificación de inespecificidad de los sueros hiperinmunes**

Los sueros 55, 57 y 62 reconocen de manera cruzada los péptidos a, c y b, respectivamente, lo cual se confirmó al pre-incubar el suero con el péptido respectivo, donde se observa que disminuyen los valores de absorbancia. El suero 75 reconoce de forma cruzada los péptidos A y B; al pre-incubar el suero con estos péptidos disminuyen los valores la absorbancia, lo cual confirma la especificidad de los anticuerpos hacia estos péptidos. A cada valor de absorbancia se le resto el valor del blanco correspondiente.

#### 9.4.1. Evaluación de la especificidad del suero 75 purificado

El suero Anti-péptido D (75) que presentaba reconocimiento cruzado de los péptidos A, B, y que había sido purificado a través de una columna de sefarosa la cual tenía acoplada péptidos A y B, se analizó para determinar su reconocimiento hacía los péptidos A, B y C (*Tabla 10*).

Se encontró que permanecía la señal de reconocimiento usando el suero Anti-péptido D (75) y al pre-incubar este suero con solución de péptido A ó péptido B y mezcla de péptidos AB disminuía el reconocimiento, lo cual indicaba que aún permanecían anticuerpos de reconocimiento cruzado

	75 H.I	75 H.I + A	75 H.I + B	75 H.I + AB	Blanco
Péptido A	0,169	0,122			0,095
Péptido B	0,200		0,061		0,106
Péptido C	0,258			0,061	0,097

**Tabla 10. Valores de absorbancia del suero Anti-péptido C (75) purificado frente a péptidos A y B.** Los valores de absorbancia disminuyeron frente a los péptidos que se reconocían de forma cruzada A y B, al igual que hacía su péptido C. Al pre-incubar con estos péptidos la absorbancia disminuyó confirmando la especificidad del reconocimiento cruzado. (Los valores de absorbancia presentados en la tabla son el producto de restar a la absorbancia original de cada suero, el valor del blanco a fin de eliminar absorbancia base de la reacción).

Se realizó una segunda purificación de este suero Anti-péptido D (75) a través de la columna de sefarosa (*Tabla 11*). Al analizar el suero por Elisa se encontró que la señal de reconocimiento había disminuido, incluyendo hacía el péptido C con el cual se había inmunizado. Por lo cual se decidió no utilizar este suero en los ensayos de detección de Mamoglobina en los sueros de las pacientes.

	75 H.I	75 H.I + A	75 H.I + B	75 H.I + AB	Blco
<b>Péptido A</b>	0,074	0,122	-	-	0,095
<b>Péptido B</b>	0,094	-	0,061	-	0,106
<b>Péptido C</b>	0,161	-	-	0,061	0,097

**Tabla 11. Valores de absorbancia del suero 75 purificado (2) frente a péptidos A y B.** Los valores de absorbancia fueron menores que en el anterior ensayo para los péptidos A, B y C. Al igual que en el anterior ensayo al pre-incubar el suero con estos péptidos disminuyó la absorbancia. (Los valores de absorbancia presentados en la tabla son el producto de restar a la absorbancia original de cada suero, el valor del blanco a fin de eliminar absorbancia base de la reacción).

#### 9.4.2. Evaluación de la especificidad de reconocimiento de los sueros seleccionados

Los sueros seleccionados reconocieron adecuadamente sus respectivos péptidos en diluciones de 1:10. El suero Anti-péptido B (55) mostró una señal de reconocimiento cruzado hacia el péptido A, por el contrario el suero Anti-péptido C (62) no mostró señal de reconocimiento frente al péptido B.

- Suero Anti-Péptido A → Suero 54 H.I
- Suero Anti-Péptido B → Suero 55 H.I
- Suero Anti-Péptido C → Suero 62 H.I
- Suero Anti-Péptido D → Suero 78 H.I

	Suero Anti-Péptido A (54 H.I)	Suero Anti-Péptido B (55 H.I)	Suero Anti-Péptido C (62 H.I)	Suero Anti-Péptido D (78 H.I)	Blanco
<b>Péptido A</b>	0,788	0,511	-	-	0,076
<b>Péptido B</b>	-	0,911	0,032	-	-
<b>Péptido C</b>	-	-	0,708	-	-
<b>Péptido D</b>	-	-	-	0,836	-

**Tabla 12. Valores de Absorbancia de sueros seleccionados usando en dilución 1:10.** Los sueros Anti-péptido A (54), Anti-péptido C (62) y Anti-péptido D (78) al reaccionar arrojaron absorbancias superiores al blanco. El suero Anti-péptido B (55) reconoció de manera cruzada el péptido A.

## 9.5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA MAMOGLOBINA RECOMBINANTE

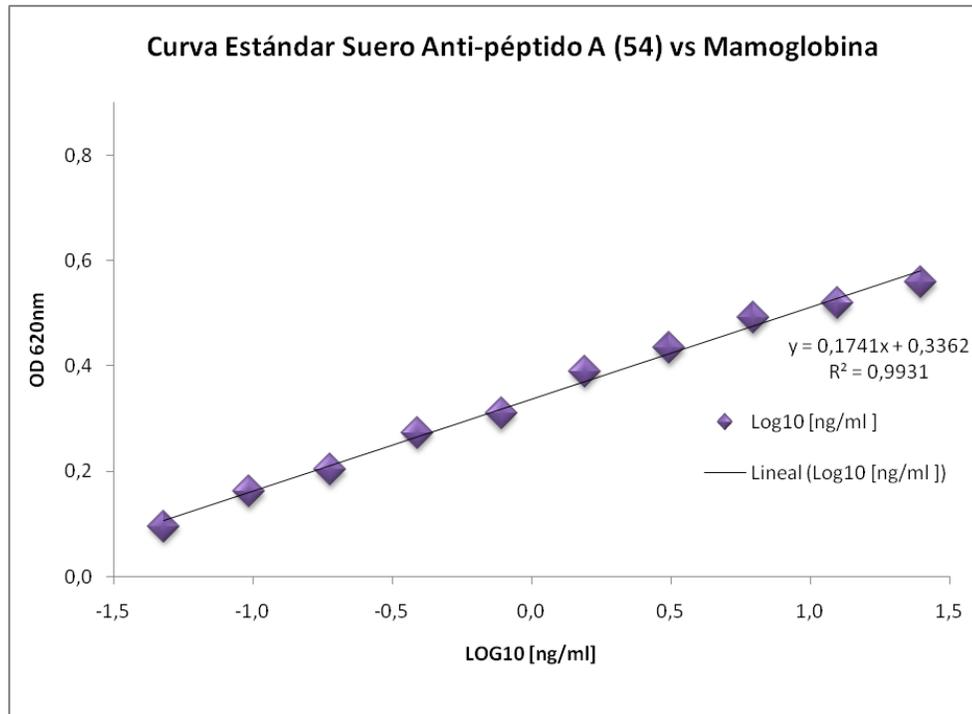
La curva estándar se realizó utilizando 10 diluciones seriadas (1:2) de concentraciones de proteína *Human Mamoglobin (Ray Biotech, Inc. Catalog N° 228-11074)*. Se partió de una concentración inicial de [25ng/ml] hasta [0,048ng/ml] (*Tabla 13*).

Mamoglobina [ng/ml]	Mamoglobina Log10 [ng/ml]	Anti-péptido A (54)	Anti-péptido B (55)	Anti-péptido C (62)	Anti-péptido D (78)
25	1,40	0,56	0,67	0,82	0,06
12,5	1,10	0,52	0,56	0,68	0,00
6,25	0,80	0,49	0,51	0,57	-0,03
3,125	0,49	0,43	0,46	0,48	-0,05
1,56	0,19	0,39	0,37	0,41	-0,02
0,78	-0,11	0,31	0,36	0,33	0,03
0,39	-0,41	0,27	0,27	0,27	0,01
0,19	-0,72	0,20	0,21	0,19	-0,01
0,097	-1,01	0,16	0,16	0,11	-0,04
0,048	-1,32	0,10	0,07	0,06	-0,02

**Tabla 13. Valores de absorbancia para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinate.**

Valores de absorbancia para la curva estándar realizada con diferentes concentraciones de proteína mamoglobina human recombinante (*Ray Biotech, Inc*) (25ng/ml a 0,048ng/ml)

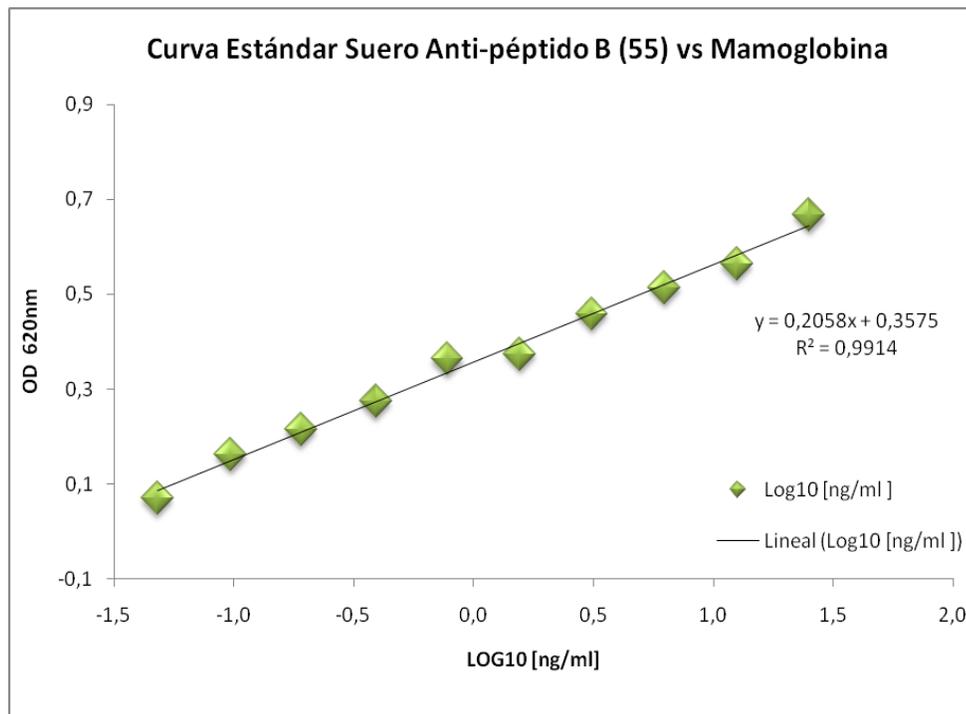
Con el suero Anti-péptido A (54) se obtuvieron valores de absorbancia entre 0,56DO hasta 0,10DO como señal de reconocimiento de las diferentes concentraciones de Mamoglobina de [25ng/ml] a [0,048ng/mL], respectivamente *Figura 6*.



**Figura 6. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-péptido A (54) (ELISA).**

La gráfica muestra la relación de los valores de absorbancia a 620nm obtenidos, en relación con log10 de la concentración en ng/ml de Mamoglobina humana (Human Mammaglobin-Ray Biotech, Inc). Se observa cómo el valor de la absorbancia va siguiendo una proporcionalidad directa frente a las diluciones de la concentración de proteína utilizada para la construcción de la curva. Con el suero Anti-péptido A (54) se obtuvieron absorbancias desde 0,56 OD ([25ng/ml]) hasta 0,10 DO ([0,048ng/ml]).

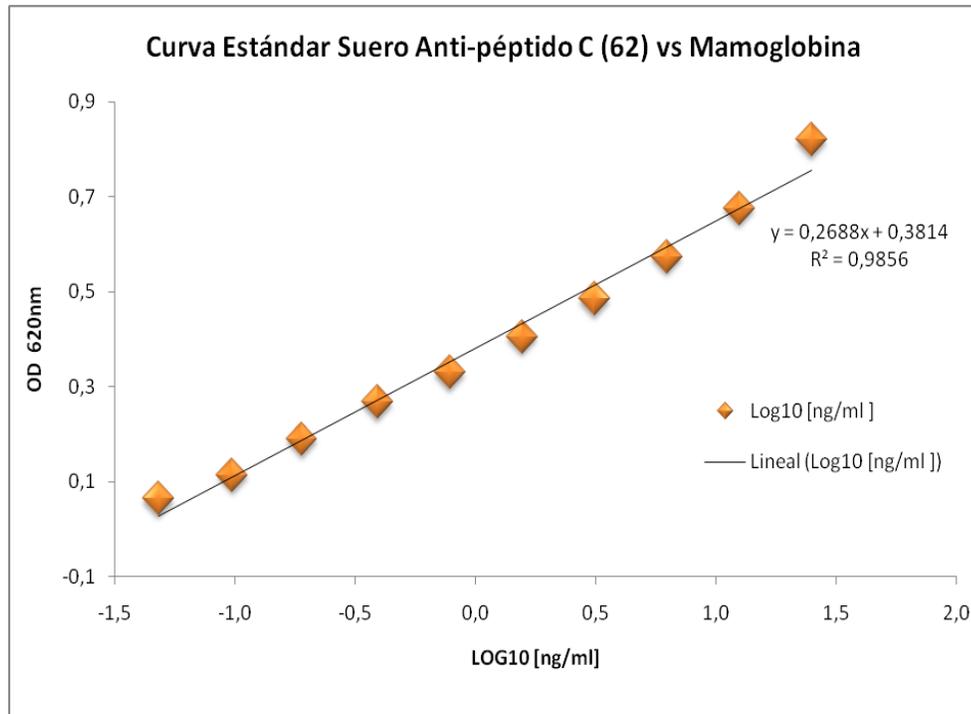
El suero Anti-péptido B (55) mostró lecturas de absorbancia de 0,67DO hasta 0,07DO en concentraciones de Mamoglobina de [25ng/ml] a [0,048 ng/ml], respectivamente *Figura 7*.



**Figura 7. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-péptido B (55) (ELISA).**

La grafica muestra las lecturas de absorbancia que presentó el Suero Anti-péptido B frente a cada unas de las concentraciones de Mamoglobina (log10 ng/ml de Human Mammaglobin, Ray Biotech, Inc). Se observa cómo el valor de la absorbancia va siguiendo una proporcionalidad directa frente a las diluciones de la concentración de proteína utilizada para la construcción de la curva. El suero Anti-péptido B (55) mostró absorbancias de 0,67 OD ([25ng/ml]) hasta 0,07 DO ([0,048ng/ml]).

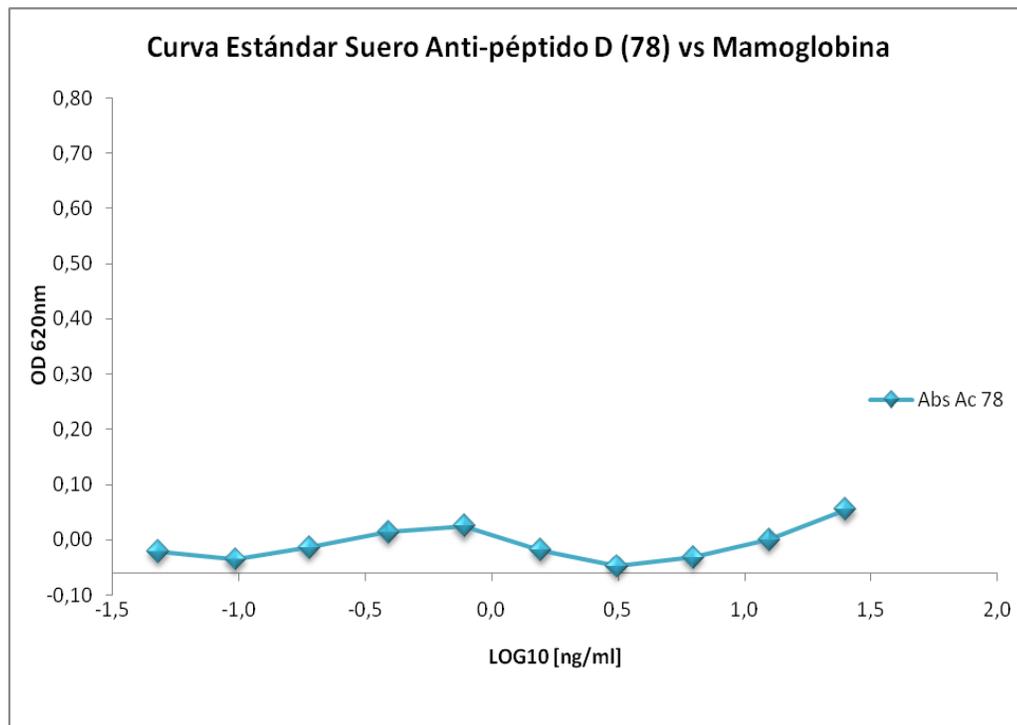
El suero anti-péptido C (62) mostró lectura de absorbancia de 0,82 DO frente a una concertación de proteína de [25ng/ml], siendo la mayor señal entre los anticuerpos utilizados a esta concentración. Su menor lectura fue 0,06DO en una concentración de Mamoglobina de [0,048 ng/ml] *Figura 8*.



**Figura 8. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-péptido C (62) (ELISA).**

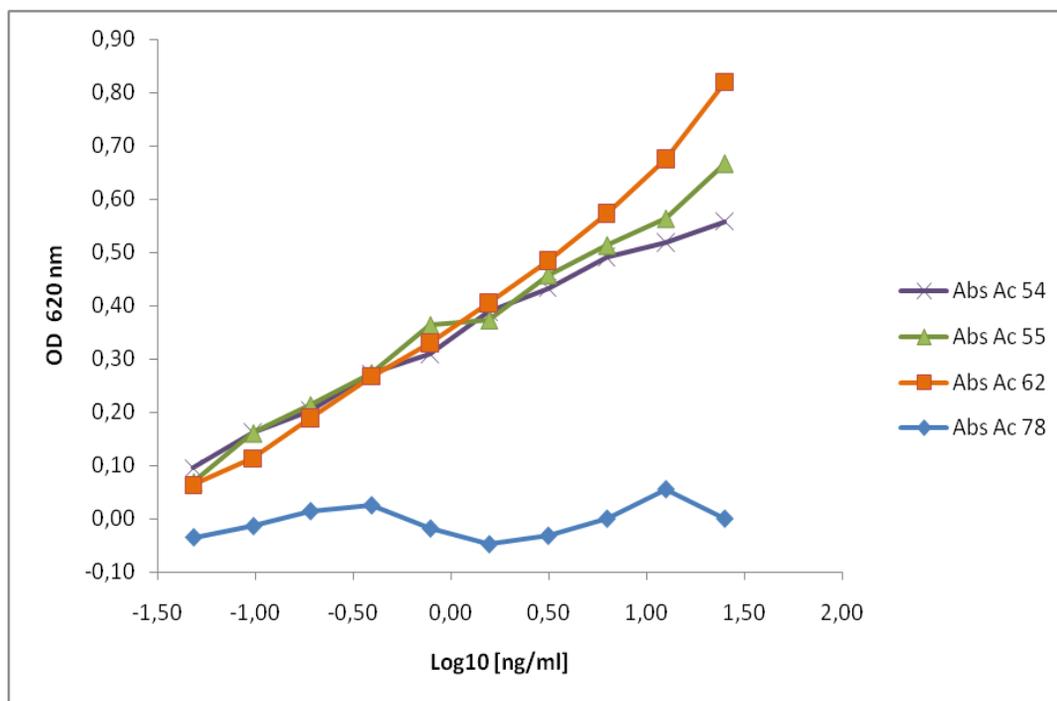
La grafica muestra la relación de la absorbancia con log10 de la concentración en ng/ml de Human Mammaglobin (Ray Biotech, Inc). El anticuerpo 62 mostró absorbancias desde 0,82 OD ([25ng/ml]) hasta 0,06 DO ([0,048ng/ml]). Se observó cómo el valor de la absorbancia va siguiendo una proporcionalidad directa frente a las diluciones de la concentración de proteína utilizada para la construcción de la curva.

En cuanto al anticuerpo 78 que fue generado a partir de la secuencia específica que diferencia a la isoforma de la Mamoglobina, no mostró un reconocimiento hacia la proteína Mamoglobina, lo cual va de acuerdo a lo esperado para este. (Figura 9).



**Figura 9. Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con el Suero Anti-peptido D (78) (ELISA).** La grafica muestra la relación de la absorbancia con log10 de la concentración en ng/ml de Human Mammaglobin (Ray Biotech, Inc). El anticuerpo 78 no mostró reconocimiento hacia la proteína Mamoglobina recombinante.

En la Figura 10 se comparan las curvas de los 4 sueros frente a la proteína Mamoglobina Recombinante. Se observa como los sueros Anti-peptido A, Anti-peptido B y Anti-peptido C mostraron un comportamiento similar frente a la proteína recombinante, notándose claramente la diferencia con el suero Anti-peptido D el cual no mostró ningún tipo de reconocimiento. Los valores de la pendiente fueron  $R^2$ : 0,9931; 0,9914 y 0,9856 para los sueros Anti-peptido A, Anti-peptido B y Anti-peptido C.



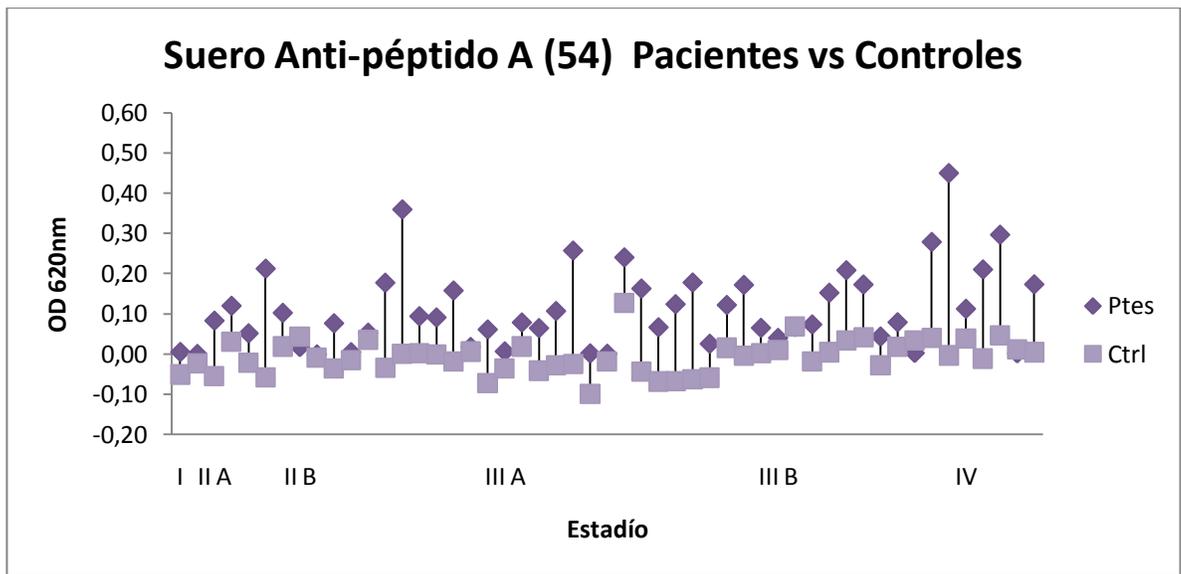
**Figura 10. Comparación Curva Estándar para diferentes concentraciones de Mamoglobina Recombinante con los cuatro Suero Anti-péptido A, B y C.** Se observa los valores de absorbancia de los 4 anticuerpos (Anti-péptido A (54), Anti-péptido B (55), Anti-péptido C (62) y Anti-péptido D (78)) generados al reaccionar mediante una prueba de ELISA, con diferentes concentraciones de Mamoglobina entre 25ng/ml y 0,048ng/ml.

## 9.6. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE MAMOGLOBINA EN LOS SUEROS DE LOS PACIENTES Y DE LOS INDIVIDUOS CONTROL

Las muestras de suero de los pacientes y de los controles se analizaron mediante la prueba de ELISA con los cuatro sueros que contienen los anticuerpos para cada péptido. Las pruebas se hicieron por duplicado (Figura 11, 12, 13, 14) (Anexo. 13).

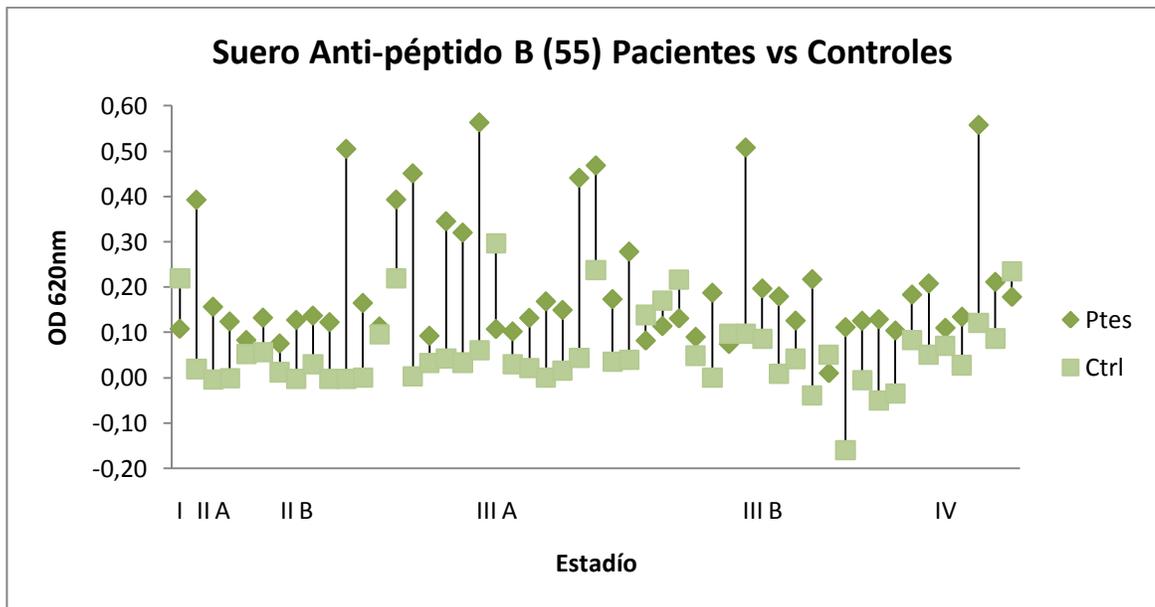
Al incubar el suero de los pacientes con el suero Anti-péptido A (54) se obtuvieron valores de absorbancia de -0,2 hasta 0,450 OD. Las muestras de suero de los controles variaron de -0,099 hasta 0,127 OD, estas lecturas de

absorbancia fueron próximas a la del blanco, por tal razón los valores finales de cada uno de los controles, después de restar la absorbancia del blanco fueron cercanas a 0,00 OD. En la *Figura 11* se muestran las diferencias en las densidades ópticas entre muestras de suero de pacientes de acuerdo al estadio y controles. En cuanto al estadio los valores de absorbancias fueron variables, sin observarse diferencias entre el grupo de casos.



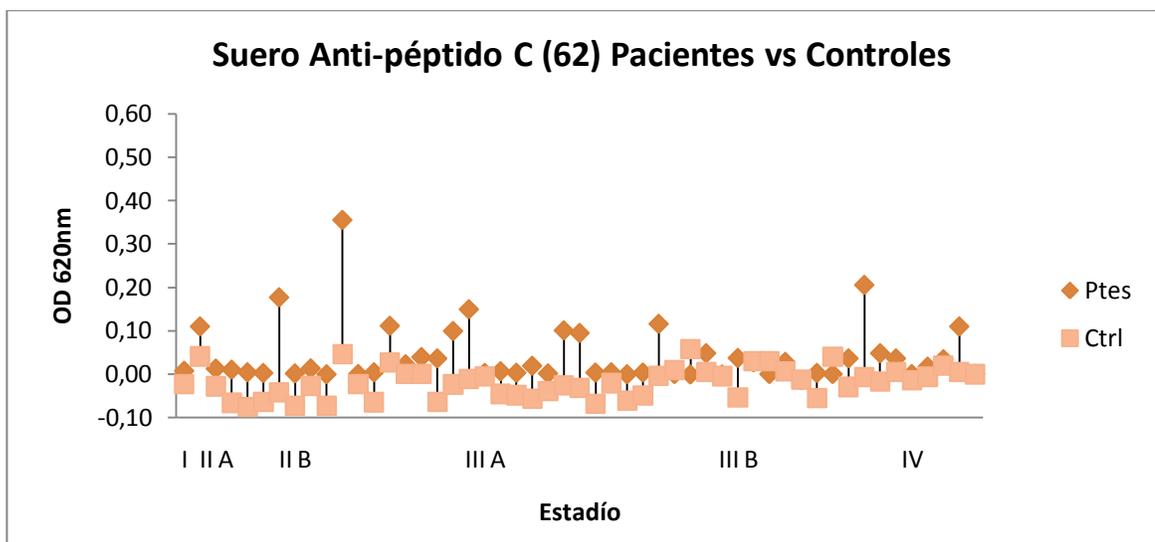
**Figura 11. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadio usando el Suero Anti-péptido A (54), obtenidos mediante ELISA. Se observan las diferencias de los valores de absorbancia para el grupo de pacientes y el grupo de controles**

Al analizar los sueros con el suero Anti-péptido B (55), se encontró en el grupo de pacientes las absorbancias estuvieron entre 0,010 - 0,564 OD, y en el grupo control -0,160 – 0,119, de igual forma que el Suero Anti-péptido A, las lecturas de absorbancia de los casos fueron próximas a la del blanco, por lo cual los valores de cada uno de los controles, luego de restar la absorbancia del blanco fueron cercanas a 0,00 OD. (*Figura 12*).



**Figura 12. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadío usando el Suero Anti-péptido B (55), obtenidos mediante ELISA**

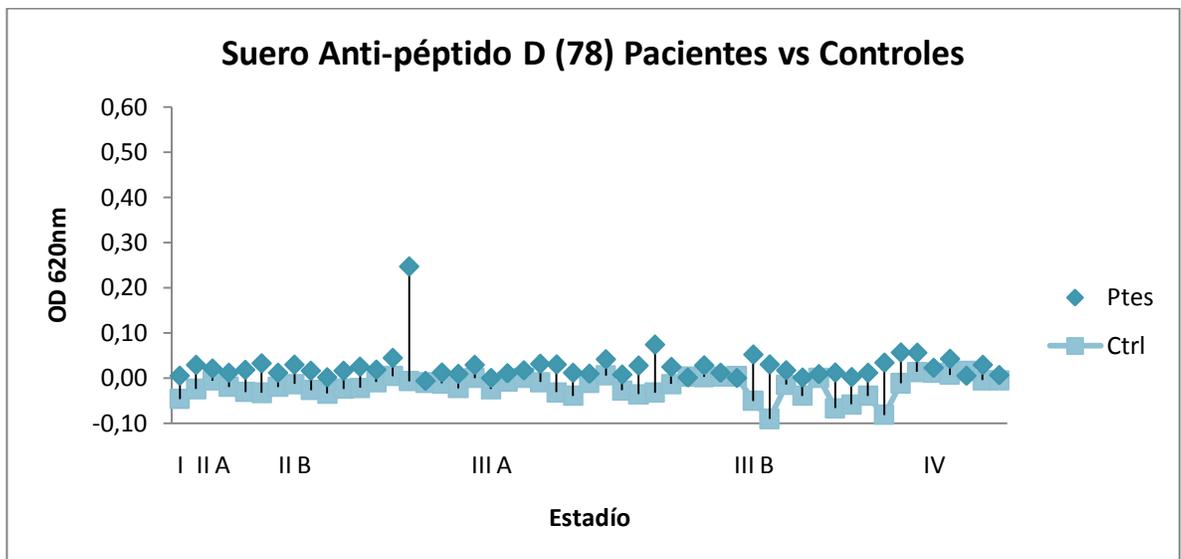
En cuanto al suero Anti-péptido C (62) se encontró en el grupo de pacientes y controles lecturas de absorbancia de -0,014 a 0,355OD y -0,076 a 0,058OD respectivamente (Figura 13).



**Figura 13. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadío usando el Suero Anti-péptido C (62), obtenidos mediante ELISA.**

Teniendo en cuenta lo observado en las anteriores figuras, al analizar si en el grupo de pacientes, de acuerdo al estadio existían diferencias en las lecturas de absorbancia, no se observó un patrón que mostrara que a medida que avanza el estadio existiera variaciones en las lecturas de la absorbancia.

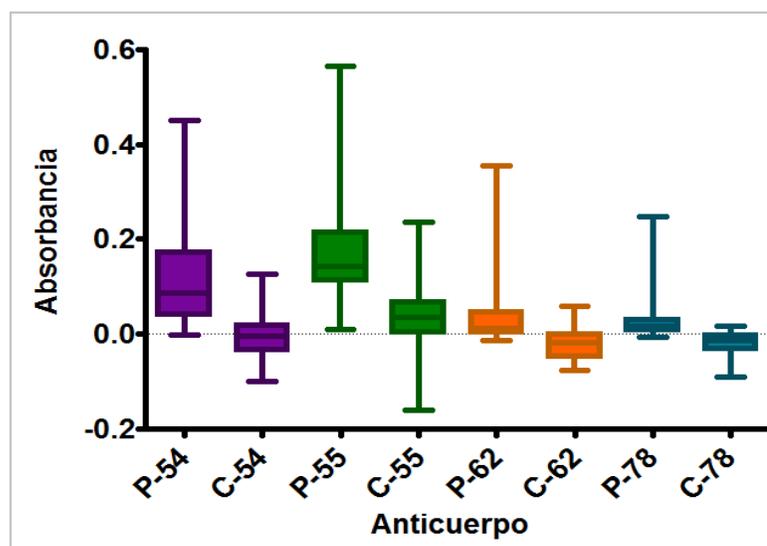
Al analizar las muestras de suero de pacientes y controles con el Anticuerpo 78 se encontraron valores de Absorbancia que estuvieron entre -0,07 y 0.257 OD y entre -0,091 a 0,017 OD, respectivamente (*Figura 14*).



**Figura 14. Comparación Absorbancia a 620nm de los sueros de controles y pacientes por Estadío usando el suero Anti-péptido D (78).**

No hubo reconocimiento de la proteína Mamoglobina sérica en las muestras de suero de pacientes y controles. Únicamente una muestra del grupo paciente mostró un valor de absorbancia de 0,26 OD.

En la Figura 15 se compara los valores de absorbancias de los cuatro anticuerpos entre pacientes y controles.



**Figura 15. Comparación de los valores de absorbancia a 620nm usando cada uno de los Sueros (54, 55 y 62) en los grupos de pacientes (P) y controles (C).** Se observan las diferencias existentes en los valores de densidad óptica obtenidos para el grupo de pacientes y el de controles.

### 9.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MAMOGLOBINA EN EL SUERO DE LOS PACIENTES Y DE LOS INDIVIDUOS CONTROL

Se determinó la concentración de la proteína Mamoglobina de los sueros de pacientes y controles teniendo en cuenta la curva estándar realizada para cada anticuerpo. A excepción del Suero Anti-péptido D (78) para el cuál no fue posible determinar la concentración debido a que este anticuerpo no reconoce la forma nativa de Mamoglobina sino la Isoforma.

De acuerdo al anticuerpo utilizado el grupo de pacientes mostró las siguientes concentraciones (*Anexo 14*):

Suero Anti-péptido A (54): 0,011- 4,5 ng/ml

Suero Anti-péptido B (55): 0,02 – 10,0ng/ml

Suero Anti-péptido C (62): 0,035 – 0,818ng/ml

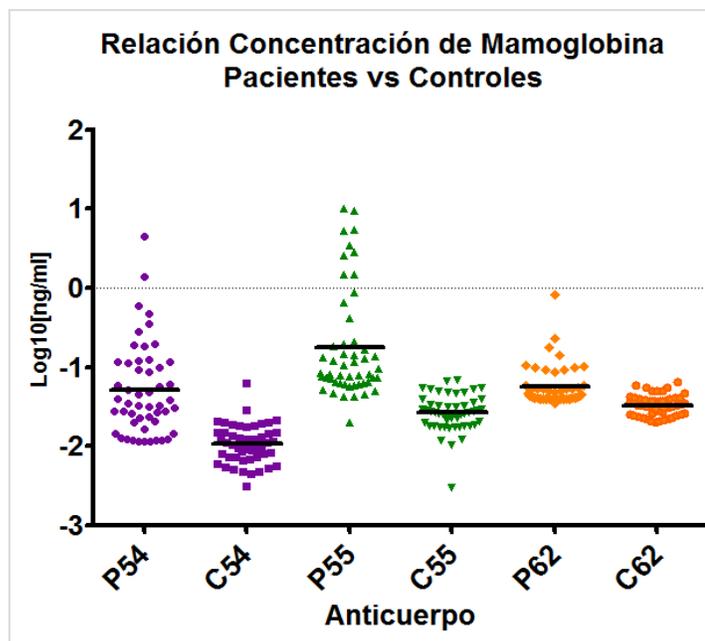
En el grupo de casos se obtuvieron las siguientes concentraciones (Anexo 15):

Suero Anti-péptido A (54): 0,003 – 0,062 ng/ml

Suero Anti-péptido B (55): 0,003 – 0,069ng/ml

Suero Anti-péptido C (62): 0,020 – 0,064ng/ml

En la figura 16 se observan las diferencias en la concentración de Mamoglobina entre pacientes y controles. Entre el grupo de pacientes se observan datos que sobrepasan en gran medida a los del grupo control, aunque existen algunos que llegan a estar al nivel del grupo control.



**Figura 16. Comparación de la concentración de Mamoglobina (en escala Log10 ng/ml) entre los grupos de Pacientes (P) y Controles (C), usando los anticuerpos 54, 55 y 62.**

Se observan diferencias en los niveles, entre grupos usando los tres anticuerpos, los valores más elevados se observan con los sueros Anti-péptido A (54) y Anti-péptido B (55). Nótese que el comportamiento de los controles es más homogéneo, en comparación a los pacientes.

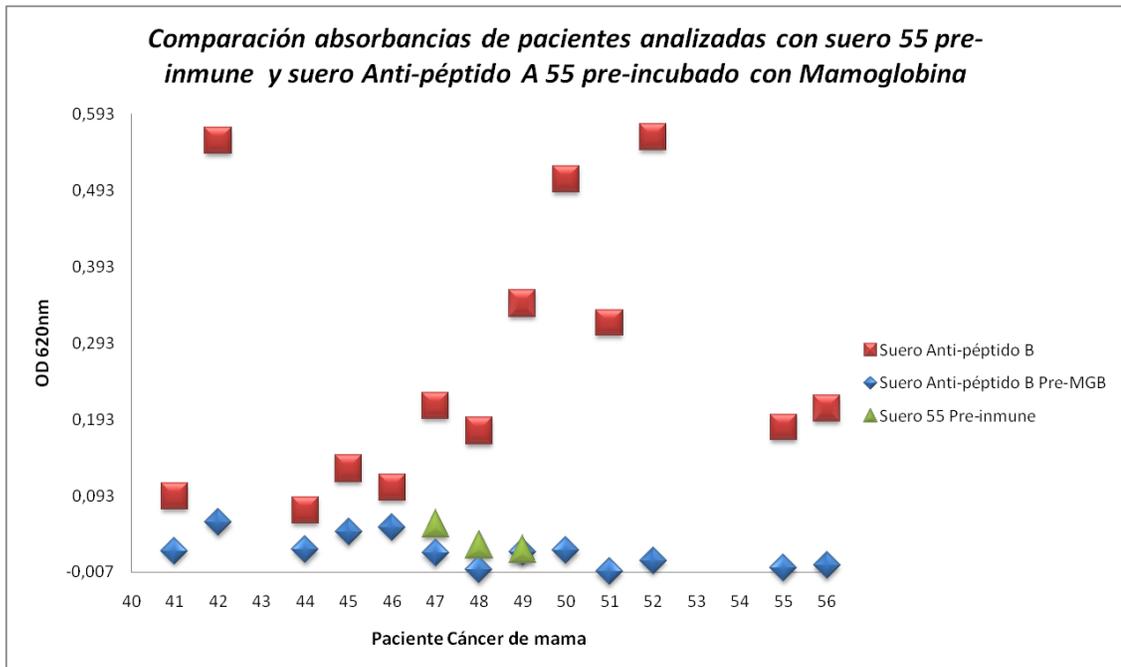
## 9.8. VERIFICACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS SUEROS DE CONEJO PARA RECONOCER MAMOGLOBINA SÉRICA

Al analizar las muestras de pacientes usando el suero Anti-péptido B (55) pre incubado con la proteína Mamoglobina recombinante se encontró que las absorbancias disminuían drásticamente, lo cual confirma que el suero contiene anticuerpos que reconocen de manera específica la proteína Mamoglobina y no otras proteínas presentes en el suero.

De la misma forma al analizar las muestras con el suero 55 pre-inmune no se observa señal de reconocimiento, confirmando que el reconocimiento es debido a anticuerpos generados post-inoculación y no ha anticuerpos presentes previamente en los conejos inmunizados Tabla 14, Figura 17.

Paciente	Suero Anti-péptido B (55)	Suero Anti-péptido B (55) Pre-incubado MGB	Suero 55 Pre-inmune
41	0,092	0,021	-
42	0,558	0,058	-
44	0,074	0,023	-
45	0,129	0,046	-
46	0,104	0,052	-
47	0,211	0,018	0,056
48	0,178	-0,004	0,028
49	0,345	0,019	0,022
50	0,508	0,022	-
51	0,320	-0,007	-
52	0,564	0,008	-
55	0,183	-0,002	-
56	0,208	0,002	-

**Tabla 14. Valores de absorbancia a 620nm de pruebas de ELISA de sueros de pacientes en presencia de suero Anti-péptido B (55).** Los sueros de los pacientes se analizaron con el suero Anti-péptido B, el suero Anti-péptido B pre-incubado con Mamoglobina recombinante (Human Mammaglobin, Ray Biotech, Inc) y adicionalmente tres sueros de pacientes se analizaron con el Suero 55 Pre-inmune. Se observa disminución en las lecturas de la absorbancia tanto para el suero Anti-péptido B pre-incubado con la proteína recombinante, como para las muestras analizadas con el suero 55 pre-inmunes. (Para observar con mayor detalle las diferencias véase la Figura 19.)



**Figura 17. Comparación absorbancias a 620nm de pacientes analizadas con suero Anti-péptido B (55) (rojo), suero Anti-péptido B (55) pre-incubado con Mamoglobina (azul), Suero 55 pre-inmune (verde).** Se observa disminución en la lectura de la absorbancia al preincubar el Anticuerpo 55 con la proteína Mamoglobina recombinante, de la misma forma se observa una absorbancia menor en las tres muestras analizadas con el suero 55 pre.inmune confirmando la especificidad del reconocimiento de este anticuerpo por la proteína en suero.

### 9.9. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los grupos de pacientes y control fueron pareados teniendo en cuenta las variables de edad, gestación y menopausia, debido a la influencia positiva que se ha reportado existe entre ellas y el desarrollo del cáncer de mama. Por lo cual se quiso controlar con el pareamiento de estas variables que la significancia de las diferencias encontradas en la concentración de Mamoglobina entre el grupo de casos y el grupo de controles fuera resultado de la presencia de la enfermedad.

En la Tabla 15 se observa la descripción de estas variables en los grupos de pacientes y controles. La edad estuvo entre los 27 y 85 años. El 90,2%

habían estuvieron en gestación en algún momento de su vida y el 76,5% eran menopáusicas.

<b>Edad</b>					
	<i>N</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>
<b>Pacientes</b>	51	27	85	61	11,64
<b>Controles</b>	51	28	85	61	11,41

<b>Gestaciones</b>				<b>Menopausia</b>			
		<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>			<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>
<b>Pacientes</b>	Si	46	90,2	<b>Pacientes</b>	Si	39	76,5
	No	5	9,8		No	12	23,5
	Total	51	100		Total	51	100
<b>Controles</b>	Si	46	90,2	<b>Controles</b>	Si	41	80,4
	No	5	9,8		No	10	19,6
	Total	51	100		Total	51	100

**Tabla 15. Descripción de variables de pareamiento en la muestra.**

*Pacientes y controles fueron pareados por edad, ocurrencia de gestación y edad de la menopausia. Nótese que la frecuencia de cada una de estas características fue similar entre casos y controles.*

### **9.9.1. Análisis de la capacidad de los sueros de conejo para diferenciar entre el grupos de pacientes y controles**

En este análisis se comparó la concentración de Mamoglobina determinada con cada suero de conejo, en los grupos de pacientes y controles. En la Tabla 16, se observan los valores mínimo y máximo, la media y la desviación estándar de la concentración de Mamoglobina en ng/ml, para cada suero de conejo utilizado en los grupos.

		N	Mínimo	Máximo	Media	D. Estándar
Pacientes	Suero Anti-péptido A (54)	51	0,011	9,700	0,381	1,481
	Suero Anti-péptido B (55)	51	0,002	10,022	0,928	2,164
	Suero Anti-péptido C (62)	51	0,035	0,818	0,074	0,112
Controles	Suero Anti-péptido A (54)	51	0,003	0,006	0,012	0,008
	Suero Anti-péptido B (55)	51	0,003	0,069	0,030	0,014
	Suero Anti-péptido C (62)	51	0,020	0,064	0,034	0,010

**Tabla 16. Concentración de Mamoglobina.[ng/ml] en los sueros de los pacientes y de los individuos control.** Se observa el valor mínimo y máximo de la concentración de Mamoglobina [ng/ml] para cada anticuerpo en cada grupo de acuerdo a la presencia o no de cáncer.

A estos datos se les aplicó la prueba de Kolmogorov Smirnov para determinar si existían diferencias entre los grupos analizados. Como se aprecia en la *Tabla 17* en los tres casos hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), indicando que estos sueros poseen la capacidad de diferenciar entre los grupos de casos y controles

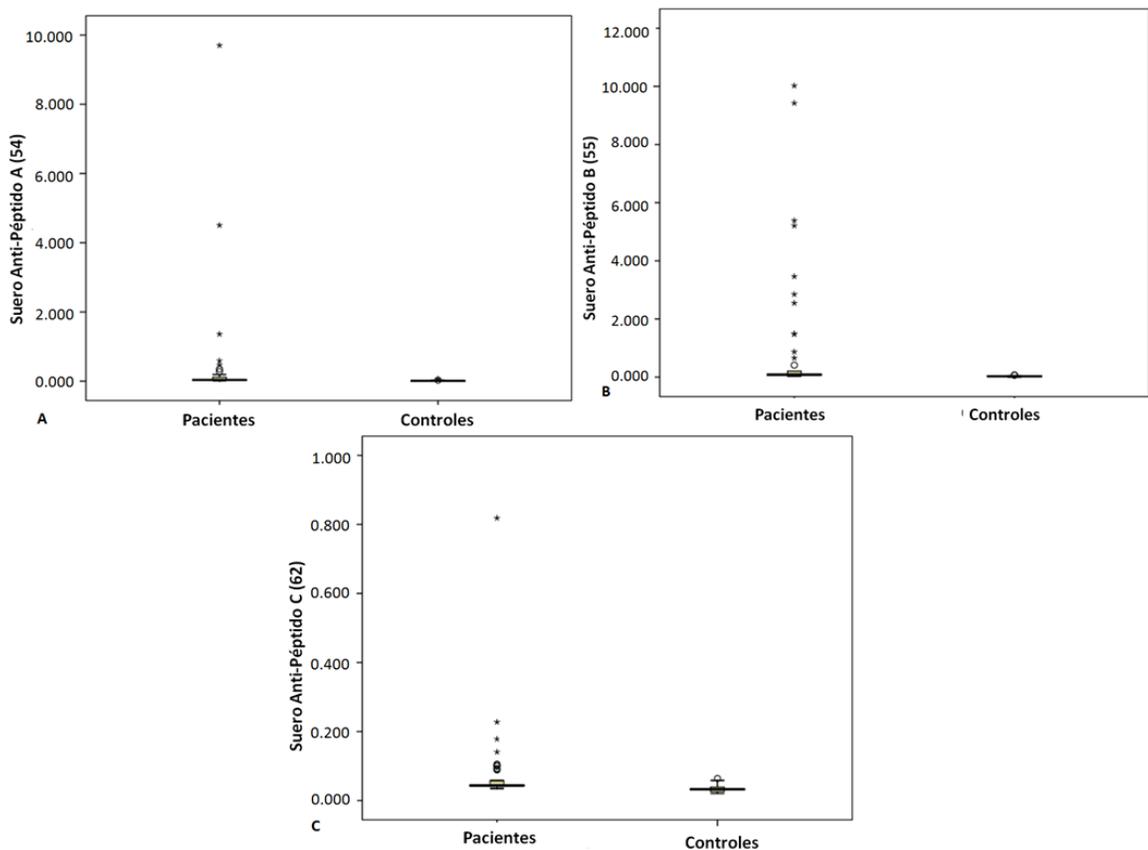
	Suero Anti-péptido A (54)	Suero Anti-péptido B (55)	Suero Anti-péptido C (62)
Kolmogorov - Smirnov Z	3,466	4,159	3,466
Valor P de la prueba exacta	0,000	0,000	0,000

**Tabla 17. Valores obtenidos de la aplicación de la prueba de Kolmogorov Smirnov para determinar diferencias entre el grupo de pacientes con cáncer de seno y los individuos sanos.** Los valores muestran que existen diferencias estadísticamente significativas (valor de  $P < 0,05$ ) con los tres anticuerpos entre los dos grupos. Véase la figura 19.

En la *Figura 19* se observa la representación de los datos gráficamente, notándose en el grupo de pacientes la existencia de valores más extremos superiores al grupo de controles, estos valores son los responsables de la significancia que cada suero Anti-péptido A, B ó C posee para diferenciar entre estos dos grupos analizados. Es interesante resaltar que algunos casos tienen valores parecidos a los controles, pero la diferencia la determinan casos en los que los valores son más elevados. Para más claridad en esto se pueden ver los percentiles en la *Tabla 18*:

		Percentiles						
	Cáncer	5	10	25	50	75	90	95
<b>Suero Anti-péptido A (54)</b>	Si	0,011	0,011	0,019	0,034	0,114	0,443	2,618
	No	0,004	0,005	0,007	0,011	0,014	0,020	0,024
<b>Suero Anti-péptido B (55)</b>	Si	0,042	0,046	0,064	0,084	0,207	3,339	7,001
	No	0,011	0,017	0,018	0,027	0,036	0,053	0,059
<b>Suero Anti-péptido C (62)</b>	Si	0,038	0,039	0,039	0,043	0,059	0,104	0,197
	No	0,020	0,022	0,025	0,032	0,039	0,050	0,056

**Tabla 18. Percentiles de la concentración de la proteína según la presencia de cáncer de mama.** Se observa diferencia en el comportamiento entre paciente y controles, aunque en los primeros percentiles los valores son cercanos.



**Figura 18. Análisis de la capacidad de los sueros de conejo para diferenciar entre los grupos de pacientes y controles.** (A) Anticuerpo 54, (B) Anticuerpo 55, (C) Anticuerpo 62. En las tres gráficas se observa como el grupo de pacientes muestra un comportamiento más heterogéneo con presencia de picos de concentración, por el contrario el grupo control muestra un comportamiento más homogéneo

### **9.9.2. Análisis de relación entre la concentración de Mamoglobina y el estatus de los Receptores de Estrógenos, Progesterona y Erb2.**

Los estrógenos son responsables del desarrollo del sistema ductal, mientras que la progesterona es necesaria para el desarrollo lobular. Esto genera que la etiología del cáncer tenga un componente hormonal fuerte. Por lo cual era importante conocer si existía alguna relación entre el estado (positivo o negativo) del receptor de estrógenos o progesterona y la concentración de Mamoglobina, teniendo en cuenta que la Mamoglobina tiene un dominio de unión a esteroides.

#### **\* *Receptor de progesterona (RP)***

Con la aparición de la progesterona por exhibir tanto cualidades anticancerígenas como pro-carcinogénicas en el cuerpo femenino (Lewis, et al., 2004; Skildum, et al., 2005) hay un potencial de mecanismos implicados en esta dualidad de participar en la carcinogénesis de mama. Generando por lo tanto un interés en conocer si existe relación entre el estado de este receptor y la concentración de Mamoglobina.

En la Tabla 19 se observan los valores mínimos, máximos, media y D. estándar para cada suero Anti-péptido A, B ó C, según el estado del receptor de progesterona.

Receptor Progesterona (RP)		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
Positivo	Suero Anti-péptido A (54)	22	0,011	9,700	0,547	2,049
	Suero Anti-péptido B (55)	22	0,020	9,424	0,682	2,039
	Suero Anti-péptido C (62)	22	0,035	0,106	0,051	0,020
Negativo	Suero Anti-péptido A (54)	11	0,012	1,361	0,162	0,398
	Suero Anti-péptido B (55)	11	0,050	2,847	0,589	0,880
	Suero Anti-péptido C (62)	11	0,039	0,227	0,069	0,056

**Tabla 19. Concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor de Progesterona (RP).** No se observan diferencias en los valores mínimos y máximos de la concentración de Mamoglobina determinada con los sueros Anti-péptido A, B y C, en pacientes con RP positivo ó negativo. Nótese las amplias desviaciones estándar y los valores de media tan similares responsables de la falta de significancia.

Al aplicar la prueba de Kolmogorov Smirnov a los datos hallados en el grupo de pacientes con cáncer de mama analizados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el estado positivo o negativo del receptor de progesterona (valor de P: 0,830; 0,429; 0,998. para los sueros Anti péptido A (54), Anti-péptido B (55) y Anti péptido C (62), respectivamente), en la Tabla 20 se observa el resultado después de aplicar la prueba de Kolmogorov Smirnov

	Suero Anti-péptido A (54)	Suero Anti-péptido B (55)	Suero Anti-péptido C (62)
Kolmogorov - Smirnov Z	0,615	0,862	0,369
Valor P de la prueba exacta	0,830	0,429	0,998

**Tabla 20. Significancia según la prueba de Kolmogorov Smirnov de cada uno de los sueros Anti-péptido A, B y C al comparar la concentración de Mamoglobina y el estado del receptor de progesterona.** Nótese que los valores de P fueron >0,05 en todos los sueros, indicando que no existe una diferencia significativa entre la concentración de Mamoglobina de cada paciente y su estado del receptor de progesterona.

Al analizar la información de la concentración de Mamoglobina según los percentiles se percibe que las concentraciones no difieren en los pacientes con cáncer de seno que presentan RP positivo ó negativo *Tabla 21.*

		Percentiles						
	Receptor de Progesterona	5	10	25	50	75	90	95
<b>Suero Anti-péptido A (54)</b>	<b>Positivo</b>	0,011	0,011	0,224	0,039	0,139	0,553	8,334
	<b>Negativo</b>	0,012	0,012	0,014	0,034	0,094	1,111	-
<b>Suero Anti-péptido B (55)</b>	<b>Positivo</b>	0,023	0,043	0,064	0,079	0,130	2,225	8,392
	<b>Negativo</b>	0,049	0,051	0,058	0,134	0,869	2,574	-
<b>Suero Anti-péptido C (62)</b>	<b>Positivo</b>	0,035	0,039	0,039	0,041	0,055	0,098	0,104
	<b>Negativo</b>	0,038	0,039	0,039	0,043	0,091	0,202	-

**Tabla 21. Percentiles de la concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor de Progesterona.** Se observa concentración de Mamoglobina similar entre RP positivos y negativos en todos los percentiles.

**\* Receptor de Estrógenos (RE).**

RE son Factores de transcripción que controlan la expresión de genes necesarios para el crecimiento, el desarrollo y la homeostasis (Christina, et al., 2010). Desempeñan papeles muy distintos en el cáncer de mama. Era es un regulador esencial del crecimiento y el desarrollo de la glándula mamaria y marcador pronóstico clave para el desarrollo del cáncer de mama. Al igual que en el caso del Receptor de Progesterona, fue importante conocer si existía relación entre el estado del RE y la concentración de Mamoglobina

En la Tabla 22 se observan los valores mínimos, máximos, media y desviación estándar para cada anticuerpo según el estado del receptor de estrógenos.

Receptor Estrógenos (RE)		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
<b>Positivo</b>	Suero Anti-péptido A (54)	25	0,011	9,700	0,486	1,925
	Suero Anti-péptido B (55)	25	0,020	9,424	0,664	1,912
	Suero Anti-péptido C (62)	25	0,035	0,106	0,052	0,021
<b>Negativo</b>	Suero Anti-péptido A (54)	9	0,012	1,361	0,192	0,439
	Suero Anti-péptido B (55)	9	0,050	2,847	0,550	0,978
	Suero Anti-péptido C (62)	9	0,039	0,227	0,068	0,062

**Tabla 22. Concentración de Mamoglobina [ng/ml] según el estado del Receptor de Estrógenos.** No se observan diferencias en los valores mínimos y máximos de la concentración de Mamoglobina determinada con los sueros Anti-péptido A, B y C, en pacientes con RE positivo ó negativo. Las amplias desviaciones estándar y los valores de media tan similares entre RE positivos y negativos usando cada Suero Anti-péptido A, B y C, son responsables de la falta de significancia.

Al aplicar la prueba de Kolmogorov Smirnov a los anteriores datos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el estado positivo o negativo del receptor de estrógenos de las pacientes con cáncer de mama analizadas (valor de P: 0,491; 0,888; 0,911 Para los sueros Anti péptido A (54), Anti-péptido B (55) y Anti péptido C (62), respectivamente. En la Tabla 23 se observa el resultado después de aplicar la prueba de Kolmogorov Smirnov

	Suero Anti-péptido A (54)	Suero Anti-péptido B (55)	Suero Anti-péptido C (62)
Kolmogorov - Smirnov Z	0,766	0,526	0,469
Valor P de la prueba exacta	0,491	0,888	0,911

**Tabla 23. Significancia según la prueba de Kolmogorov Smirnov de cada uno de los sueros Anti-péptido A, B y C al comparar la concentración de Mamoglobina y el estado del receptor de estrógeno.** Nótese que los valores de P fueron  $>0,05$  en todos los sueros, indicando que no existe una diferencia significativa entre la concentración de Mamoglobina de cada paciente y su estado del receptor de progesterona.

Al analizar de forma detallada por percentiles de la concentración de Mamoglobina se percibe un comportamiento igual al observado en el receptor de progesterona, en el cual las concentraciones no difieren entre pacientes con cáncer de seno RE positivo ó negativo *Tabla 24.*

		Percentiles						
Receptor de Estrógenos		5	10	25	50	75	90	95
Suero Anti-péptido A (54)	Positivo	0,011	0,011	0,202	0,032	0,122	0,516	6,967
	Negativo	0,012	0,012	0,024	0,040	0,087	-	-
Suero Anti-péptido B (55)	Positivo	0,026	0,044	0,066	0,079	0,153	1,905	7,360
	Negativo	0,049	0,049	0,057	0,104	0,818	-	-
Suero Anti-péptido C (62)	Positivo	0,036	0,039	0,039	0,042	0,056	0,095	0,104
	Negativo	0,038	0,038	0,039	0,041	0,074	-	-

**Tabla 24. Percentiles según el estatus del Receptor de Estrógenos. Se observan concentraciones de Mamoglobina similares entre RE positivos y negativos.**

**\* Receptor Erb2:**

El receptor Erb2 pertenece a la familia de de Receptores de Factores de Crecimiento Epidermal (EGF). Se ha encontrado amplificado y sobre-expresado en una gran variedad de tumores, incluyendo carcinomas de mama, ovario, colon, pulmón y estómago. Siendo de mal pronóstico su presencia en tumores de mama, por lo cual al igual que en los anteriores receptores se quiso identificar si existía alguna relación entre la presencia de este y la concentración de Mamoglobina.

En la Tabla 25 se observan los valores mínimos, máximos, media y desviación estándar para cada anticuerpo según el estatus del receptor de estrógenos.

Receptor Erb2		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
<b>Positivo</b>	Suero Anti-péptido A (54)	10	0,012	0,188	0,669	0,060
	Suero Anti-péptido B (55)	10	0,063	2,545	0,607	0,830
	Suero Anti-péptido C (62)	10	0,039	0,106	0,066	0,027
<b>Negativo</b>	Suero Anti-péptido A (54)	15	0,011	0,592	0,131	0,176
	Suero Anti-péptido B (55)	15	0,042	9,424	0,899	2,462
	Suero Anti-péptido C (62)	15	0,039	0,227	0,057	0,047

**Tabla 25. Concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor Erb2.**

No se observan diferencias en los valores mínimos y máximos de la concentración de Mamoglobina determinada con los sueros Anti-péptido A, B y C, en pacientes con R.Erb2 positivo ó negativo. Obsérvese las amplias desviaciones estándar y los valores de media tan similares entre R.Erb2 positivo y negativo las cuales son responsables de la falta de significancia.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el estatus positivo o negativo del receptor Erb2 (valor de P: 0,732; 0,338; 0,223. Para los anticuerpos 54, 55 y 62, respectivamente), en la Tabla 26 se observa el resultado después de aplicar la prueba de Kolmogorov Smirnov.

	Suero Anti-péptido A (54)	Suero Anti-péptido B (55)	Suero Anti-péptido C (62)
<b>Kolmogorov – Smirnov Z</b>	0,653	0,898	0,980
<b>Valor P de la prueba exacta</b>	0,732	0,338	0,223

**Tabla 26. Significancia según la prueba de Kolmogorov Smirnov para cada uno de los sueros Anti-péptido A, B y C al comparar la concentración de Mamoglobina y el estado del receptor Erb2.** Se observa que los valores de P fueron  $>0,05$  en todos los sueros, indicando que no existe una diferencia significativa entre la concentración de Mamoglobina de cada paciente y su estado del receptor Erb2.

Al analizar de forma detallada por percentiles de la concentración de Mamoglobina se percibe un comportamiento igual a la observada en el receptor de progesterona y estrógenos, en Erb2 positivo ó negativo las concentraciones no difieren entre pacientes con cáncer de seno *Tabla 27.*

		Percentiles						
Receptor. Erb2		5	10	25	50	75	90	95
Suero Anti- péptido A (54)	Positivo	0,011	0,011	0,013	0,046	0,116	0,181	-
	Negativo	0,011	0,011	0,027	0,047	0,121	0,516	-
Suero Anti- péptido B (55)	Positivo	0,063	0,063	0,070	0,123	1,021	2,438	-
	Negativo	0,041	0,044	0,064	0,104	0,141	5,477	-
Suero Anti- péptido C (62)	Positivo	0,039	0,039	0,040	0,053	0,094	0,105	-
	Negativo	0,038	0,039	0,040	0,043	0,052	0,126	-

**Tabla 27. Percentiles de la concentración de Mamoglobina según el estado del Receptor Erb2.** Se observa un comportamiento similar entre la presencia de Erb2 positivo ó negativo.

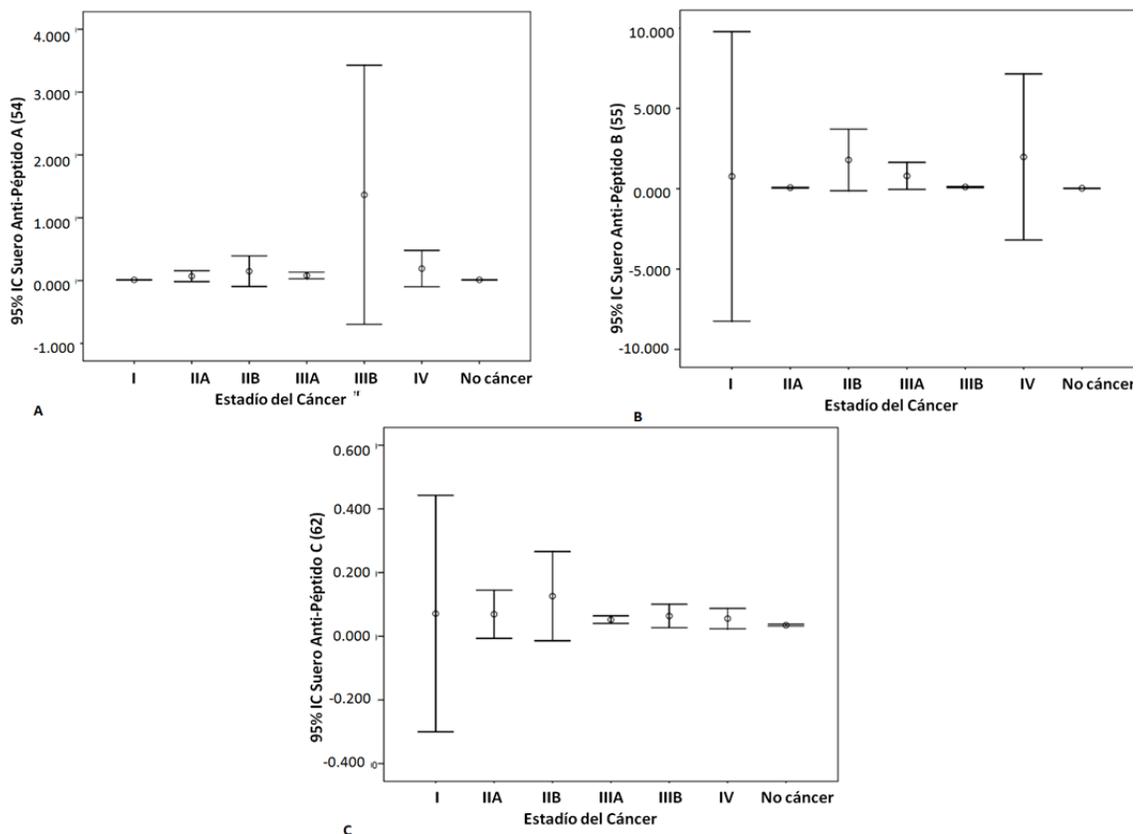
### 9.9.3. Análisis de la relación entre la concentración de Mamoglobina y estadio del cáncer

Al analizar las concentraciones de Mamoglobina que presentan las pacientes de los diferentes estadios, no se observan diferencias significativas entre estadios, en los cuales se encuentran valores mínimos y máximos similares para cada suero anti-péptido A, B y C utilizado *Tabla 28*.

En la *Figura 20* se observa de forma clara las diferencias en los intervalos de confianza usando cada uno de los sueros Anti-péptido A, B y C en los diferentes estadios.

Estadío		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
<b>I</b>	Suero Anti-péptido A (54)	2	0,012	0,012	0,012	0,0005
	Suero Anti-péptido B (55)	2	0,061	1,479	0,770	1,002
	Suero Anti-péptido C (62)	2	0,042	0,100	0,071	0,041
<b>IIA</b>	Suero Anti-péptido A (54)	5	0,023	0,193	0,070	0,069
	Suero Anti-péptido B (55)	5	0,042	0,105	0,069	0,025
	Suero Anti-péptido C (62)	5	0,040	0,178	0,069	0,060
<b>IIB</b>	Suero Anti-péptido A (54)	12	0,011	1,361	0,149	0,383
	Suero Anti-péptido B (55)	12	0,051	10,022	1,796	3,021
	Suero Anti-péptido C (62)	12	0,039	0,818	0,125	0,220
<b>IIIA</b>	Suero Anti-péptido A (54)	16	0,012	0,351	0,081	0,098
	Suero Anti-péptido B (55)	16	0,042	5,386	0,799	1,581
	Suero Anti-péptido C (62)	16	0,039	0,106	0,051	0,022
<b>IIIB</b>	Suero Anti-péptido A (54)	11	0,012	9,700	1,365	3,068
	Suero Anti-péptido B (55)	11	0,020	0,208	0,1095	0,060
	Suero Anti-péptido C (62)	11	0,035	0,227	0,063	0,054
<b>IV</b>	Suero Anti-péptido A (54)	5	0,012	0,592	0,191	0,233
	Suero Anti-péptido B (55)	5	0,062	9,424	1,979	4,162
	Suero Anti-péptido C (62)	5	0,039	0,100	0,055	0,025
<b>No cáncer</b>	Suero Anti-péptido A (54)	51	0,003	0,062	0,012	0,008
	Suero Anti-péptido B (55)	51	0,003	0,069	0,030	0,014
	Suero Anti-péptido C (62)	51	0,020	0,064	0,034	0,010

**Tabla 28. Comportamiento de Mamoglobina según el estadio del cáncer.**  
Comparando la concentración de la proteína con este set de tres anticuerpos, no se observaron diferencias entre los valores mínimos y máximos en las pacientes de cada estadio.



**Figura 19. Comparación de los intervalos de confianza para la concentración de Mamoglobina en el grupo de pacientes según el estadio. (A) Suero Anti-péptido A (54), (B) Suero Anti-péptido B (55), (C) Suero Anti-péptido C (62).** En las gráficas se observan los intervalos de confianza para cada uno de los estadios con los 3 sueros utilizados, nótese que no se evidencia la existencia de diferencias en la concentración de Mamoglobina entre los estadios, solo la presencia de una alta variabilidad en algunos casos.

#### 9.9.4. Relación entre la concentración de Mamoglobina y la presencia de metástasis

En la *Tabla 29* se observa la descripción de la concentración de Mamoglobina de acuerdo a la presencia de metástasis. No se realizó análisis estadístico debido a los pocos casos que presentaron metástasis (N=8):

Metástasis		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
Si	Suero Anti-péptido A (54)	8	0,012	0,466	0,132	0,146
	Suero Anti-péptido B (55)	8	0,046	0,208	0,123	0,058
	Suero Anti-péptido C (62)	8	0,039	0,100	0,052	0,021
No	Suero Anti-péptido A (54)	43	0,011	9,700	0,427	1,611
	Suero Anti-péptido B (55)	43	0,020	10,022	1,077	2,330
	Suero Anti-péptido C (62)	43	0,035	0,818	0,078	0,122

**Tabla 29. Concentración de Mamoglobina según la presencia de Metástasis**  
 Se observan que los valores Máximos, al igual que la Media son mayores en el grupo de pacientes que no presenta metástasis, pero debido al pequeño valor de N, resulta ser estadísticamente no significativo

#### 9.9.5. Relación entre la concentración de Mamoglobina y la ocurrencia de recaída

En la *Tabla 30* se observa de la concentración de Mamoglobina de acuerdo a la ocurrencia de recaída. No se realizó análisis estadístico debido a los pocos casos que presentaron recaída (N=4):

Recaída		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
Si	Suero Anti-péptido A (54)	4	0,012	0,116	0,063	0,059
	Suero Anti-péptido B (55)	4	0,063	0,194	0,115	0,061
	Suero Anti-péptido C (62)	4	0,039	0,100	0,055	0,030
No	Suero Anti-péptido A (54)	47	0,011	9,700	0,408	1,541
	Suero Anti-péptido B (55)	47	0,020	10,022	0,997	2,242
	Suero Anti-péptido C (62)	47	0,035	0,818	0,076	0,117

**Tabla 30. Concentración de Mamoglobina [ng/ml] según la ocurrencia de recaída en las pacientes con cáncer de mama analizadas.** Se observan que los valores Máximos, al igual que la Media son mayores en el grupo de pacientes que no presenta ocurrencia de recaída, estas diferencias en las concentraciones determinadas por cada anticuerpo en el grupo que presentó recaída al compararlas con el grupo que no la presentó, no fue posible determinar su significancia debido al pequeño valor de casos con recaída.

**9.9.6. Análisis de la concentración de Mamoglobina en relación al estado menopáusico de las pacientes.**

En la Tabla 31 se observa la descripción de las concentraciones de proteína en ng/ml entre las pacientes con cáncer de seno menopáusicas y no menopáusicas. Los valores mínimos y máximos de concentración no variaron usando cada uno de los Sueros Anti-péptido A, B ó C entre los grupos de pacientes menopáusicas y no menopáusicas.

Menopausia		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
<b>Si</b>	Suero Anti-péptido A (54)	80	0,003	9,700	0,230	1,193
	Suero Anti-péptido B (55)	80	0,012	10,022	0,413	1,433
	Suero Anti-péptido C (62)	80	0,021	0,818	0,055	0,901
<b>No</b>	Suero Anti-péptido A (54)	22	0,007	0,592	0,073	0,134
	Suero Anti-péptido B (55)	22	0,003	9,424	0,717	2,080
	Suero Anti-péptido C (62)	22	0,020	0,227	0,052	0,043

**Tabla 31. Concentración de Mamoglobina [ng/ml] según la presencia de Menopausia.** Se observan que los valores de la media al igual que los mínimos y máximos, son similares entre las pacientes menopáusicas y no menopáusicas y los valores de las desviaciones estándar son altos usando cada suero Anti-péptido A, B ó C.

La prueba de Kolmogorov Smirnov aplicada a estos datos reportó un valor de  $P=0,775$ ;  $0,191$  y  $0,707$  usando los sueros Anti péptido A (54), Anti-péptido B (55) y Anti péptido C (62), respectivamente, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o no de menopausia *Tabla 32*.

	Suero Anti-péptido A (54)	Suero Anti-péptido B (55)	Suero Anti-péptido C (62)
Kolmogorov – Smirnov Z	0,614	1,038	0,642
Valor P de la prueba exacta	0,775	0,191	0,707

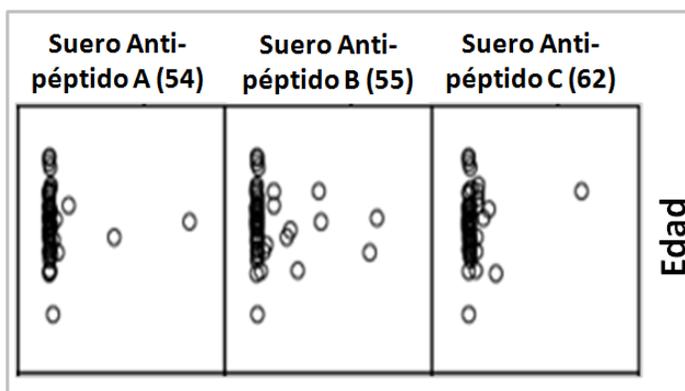
**Tabla 32. Prueba de Kolmogorov Smirnov para determinar la relación entre la concentración de Mamoglobina y ocurrencia de Menopausia.** Se observa que los valores de P fueron  $>0,05$  en todos los sueros, indicando que no existe una diferencia significativa entre la concentración de Mamoglobina de cada paciente y la presencia o no de menopausia.

En la siguiente parte se analizó si existía influencia de la edad en los niveles de la proteína evaluada en las pacientes con cáncer de seno, por lo tanto se utilizó la correlación de Pearson con el fin determinar la relación entre esta y las variables de los tres sueros Anti péptido A (54), Anti-péptido B (55) y Anti péptido C (62) *Tabla 33.*

Edad	Suero Anti-péptido A (54)	Suero Anti-péptido B (55)	Suero Anti-péptido C (62)
Correlación de Pearson	-0,037	-0,084	0,103
Valor de P	0.796	0,558	0,472
N	51	51	51

**Tabla 33. Coeficiente de correlación de Pearson.** En este caso el valor P siempre fue  $P>0.05$  lo que significa que en los datos no se apreciaron evidencias de correlación entre la edad y cada una de las variables.

El valor de P encontrado fue 0.796; 0,558; 0,472 para cada uno de los sueros Anti péptido A (54), Anti-péptido B (55) y Anti péptido C (62), respectivamente. Por lo que siguiendo la lógica de las pruebas de hipótesis, se conduce a aceptar la hipótesis nula, que es de no cambio, lo que significa que en los datos no se apreciaron evidencias de que la correlación entre la edad y cada una de las variables sea diferente de 0. Como la correlación 0 indica no relación esto significó que en los datos no hubo evidencias de relación entre la edad y cada una de las variables. Esto se aprecia gráficamente en la siguiente matriz de diagramas de dispersión entre las variables consideradas en este análisis *Figura 21.*



**Figura 20. Matriz de diagramas de dispersión entre las variables concentración de Mamoglobina y Edad.** En el eje Y se observó la edad y el eje X la concentración de Mamoglobina determinada con cada uno de los sueros Anti-péptido A, B ó C utilizados. En la gráfica se aprecia, que cuando la edad aumenta, los valores de las variables no siguen ningún patrón.

### 9.9.7. Efecto de diferentes variables sobre la concentración de la proteína Mamoglobina utilizando los sueros Anti-péptido A, B y C

En esta parte se construyó una ecuación de regresión para ver el aporte de las demás variables de pareamiento como son copa de brasier, uso de anticonceptivos orales y terapia de reemplazo hormonal, sobre la medición de la concentración de la proteína determinada por cada uno de los sueros Anti-péptido A, B ó C. Una limitación en este análisis fue la poca presencia de individuos con copa C.

#### - Suero Anti-péptido A (54)

Se describen las variables que pudieran influir sobre la medición realizada con el suero Anti-péptido A (54). La presencia de cáncer es la que tiene el valor P más pequeño y que marca una ligera significación del efecto de tener cáncer sobre la medición con el este suero Anti-péptido A. Le sigue brasier copa B, la copa C tiene muy pocos casos y en ese caso el resultado no es muy confiable. Las demás variables no presentan ningún interés en la explicación del suero Anti-péptido A. El coeficiente de determinación en la ecuación es 9.4% lo que unido a la no significación del efecto conjunto de las

variables ( $P=0.151$ ) significa que es poco relevante el aporte conjunto de ellas *Tabla 34*.

Modelo	Coeficientes sin estandarizar		Coeficientes estandarizados		
	B	Error Estándar	Beta	t	Sig
1 (Constante)	1,161	0,615		1,889	0,062
Cáncer	0,408	0,21	0,193	1,945	0,055
Brasier Copa B	-0,622	0,33	-0,225	-1,886	0,062
Brasier Copa C	-0,621	0,57	-0,127	-1,09	0,278
Anticonceptivos	-0,221	0,238	-0,094	-0,928	0,356
THR	-0,369	0,655	-0,059	-0,564	0,574
IMC	-0,022	0,024	-0,102	-0,907	0,367

**Tabla 34. Aporte de las variables sobre la cuantificación con suero Anti-péptido A.** Se analizaron las variables que podrían influir en la concentración de Mamoglobina medida con el suero Anti-péptido A. Se observó que el uso de anticonceptivos y la terapia de reemplazo hormonal (THR) mostraron valores de  $P > 0,05$  lo cual indicó su falta de significancia. Por el contrario la presencia de cáncer mostró valores  $P < 0,05$  mostrando ser significativa.

#### - Suero Anti-péptido B (55)

En el caso suero Anti-péptido B (55) sucedió lo mismo, solo que la copa del brasier no muestra ningún efecto.

Un coeficiente de determinación de 13.5% muestra una mayor relevancia del efecto de las variables ( $P=0.030$ ). Efecto que es debido solamente a la presencia de cáncer *Tabla 35*.

Modelo	Coeficientes sin estandarizar		Coeficientes estandarizados		
	B	Error Estándar	Beta	t	Sig
1 (Constante)	-1,462	0,900		-1,625	0,108
Cáncer	0,895	0,307	0,282	2.914	0,004
Brasier Copa B	-0,157	0,483	-0,038	-0,326	0,745
Brasier Copa C	-0,406	0,835	-0,055	0,487	0,628
Anticonceptivos	0,507	0,348	0,145	1,457	0,148
THR	-0,222	0,959	-0,024	-0,232	0,817
IMC	-0,058	0,035	0,183	1,6627	0,100

**Tabla 35. Aporte de las variables sobre la cuantificación con el suero Anti-péptido B**  
 Se analizaron las variables que podrían influir en la concentración de Mamoglobina medida con el suero Anti-péptido B. Se observa que presencia la copa B y C, la terapia de reemplazo hormonal (THR) y el uso de anticonceptivos y tienen valores de  $P > 0,05$  lo cual indica su falta de significancia. Por el contrario la presencia de cáncer muestra valor  $P < 0,05$  indicando su significancia.

– **Suero Anti-péptido C (62)**

De nuevo solo el efecto del cáncer en un contexto en que las variables no tienen efecto, coeficiente de determinación 9.3% y  $p=0.152$  *Tabla 36.*

Modelo	Coeficientes sin estandarizar		Coeficientes estandarizados		
	B	Error Estándar	Beta	t	Sig
1 (Constante)	-0,030	0,048		-0,621	0,536
Cáncer	0,039	0,016	0,238	2.398	0,018
Brasier Copa B	-0,005	0,026	-0,025	-0,212	0,833
Brasier Copa C	-0,015	0,044	0,039	0,336	0,738
Anticonceptivos	-0,004	0,018	0,022	-0,213	0,832
THR	0,004	0,051	0,008	0,076	0,939
IMC	0,003	0,002	0,168	1,488	0,140

**Tabla 36. Aporte de las variables sobre la cuantificación con el Anticuerpo.** Se analizaron las variables que podrían influir en la concentración de Mamoglobina. Se observa que únicamente la presencia de cáncer muestra valor  $P < 0,05$  indicando su significancia.

*Conclusión de la regresión.* La presencia de cáncer es la única de las variables con posible efecto sobre cuantificación de la proteína estudiada que presenta un cierto efecto sobre los valores.

Comentario: ciertamente el brasier C y la terapia hormonal se consideraron en este análisis de forma simbólica porque hubo muy pocos casos.

### 9.9.8. Índice de Detectabilidad y Curva Roc

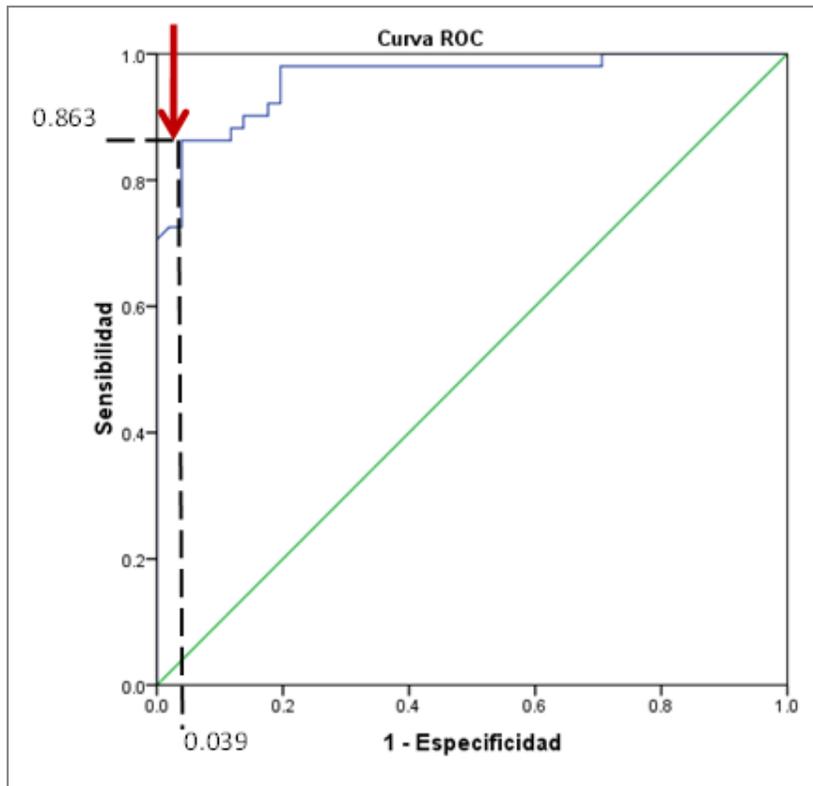
Para ver la capacidad de discriminación entre casos y controles se calculó el Índice de Detectabilidad, este índice describe la diferencia entre los valores medios de los grupos que se comparan, es decir casos y controles, estandarizada con su desviación estándar.

Como se aprecia en la *Tabla 37*, teniendo en cuenta el Índice de Detectabilidad y el Área ROC, el suero Anti-péptido B es el mejor candidato para la una prueba de tamizaje.

Variable	Índice de Detectabilidad	Área ROC
<i>Suero Anti-péptido A (54)</i>	1.8	0.897
<i>Suero Anti-péptido B (55)</i>	3.0	0.961
<i>Suero Anti-péptido C (62)</i>	2.5	0.849

**Tabla 37. Índice de Detectabilidad para cada uno de los sueros empleados.** Se observa los índices de Detectabilidad y el área bajo la curva de los tres sueros empleados. El suero Anti-péptido B presenta tanto el mayor Índice de Detectabilidad, así como el área bajo la curva más cercana a 1.

En el caso de la curva ROC esta discrimina mejor en la medida en que el área se aproxima más a 1. A continuación se construyó la curva ROC para calcular el área determinada por la misma. En la figura 22 se observa la curva ROC para el suero Anti-péptido B.



**Figura 21. Curva ROC el suero Anti-péptido B.** Al realizar la curva se obtiene una Especificidad del 96% y una Sensibilidad del 86,3%.

En este caso se puede apreciar que, aproximadamente, se ha logrado una Sensibilidad del 86.3% y una especificidad del 96%. La elevada especificidad se debe justamente a la presencia de valores muy elevados entre los casos, valores que se habló en la descripción del comportamiento de la proteína entre casos y controles, coexisten con valores semejantes a los observados en los controles, esto hace que la prueba sea más segura para detectar negativos (Especificidad) que positivos (sensibilidad) .

## 10. DISCUSIÓN

Según lo reportado por Watson y Fleming en 1999, la Mamoglobina es específica de glándula mamaria adulta. Por lo cual se ha despertado un especial interés en el análisis de Mamoglobina como marcador de diagnóstico de cáncer de mama. Ellos mostraron que los niveles de ARNm de Mamoglobina fueron más altos en los tumores de mama en comparación con el tejido normal del seno, y no se detectó en otros tejidos normales, tales como útero, ovario y leucoféresis (Zach et al, 1999).

Previamente Cruz et al, 2008, determinaron la expresión de mRNA de Mamoglobina en células tumorales en sangre periférica, en pacientes y controles. En lo cual encontraron expresión tanto en el grupo de pacientes como en el grupo de casos, siendo la expresión de Mamoglobina mayor en el grupo de pacientes con cáncer de seno. Teniendo en cuenta estos resultados, se realizó el presente trabajo con el objetivo de determinar si tanto el grupo de pacientes como de controles expresaban la proteína Mamoglobina y si existían diferencias en la concentración de proteína entre estos grupos.

En el presente estudio el rango de edad de las pacientes estuvo entre 27-85,9 años, se encontró el mayor número de los casos en mujeres mayores de 40 años, conforme a lo reportado por la literatura. El tipo de cáncer más frecuente fue el carcinoma ductal invasivo, seguido del Canalicular infiltrante. El estadio más frecuente fue IIIA, IIB y IIIB. En concordancia a estudios realizados en el INC de Colombia en el 2007, quienes reportan que el tipo de cáncer de mama más frecuente es el carcinoma ductal invasivo y el 40,5% de los casos recién diagnosticados, estaban en estadios mayores a IIB, de acuerdo a clasificación TNM (INC, 2007).

Con el fin de obtener anticuerpos anti-Mamoglobina, se inmunizaron dos conejos con cada péptido sintético de la secuencia proteica de la Mamoglobina denominados A, B, C y D, los cuales mostraron ser inmunogénicos. Los péptidos A y C quienes comprenden parte de las regiones amino y carboxi-terminal de la proteína, fueron similares, a los utilizados por Jaramillo y cols en 2004, los cuales poseen una longitud entre 9-10 aminoácidos y difirieron en 1-2 residuos peptídicos a los utilizados en el presente estudio; estos autores los reportaron como epítopes restringidos al HLA-A2 por lo cual son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>). Estos mismos péptidos fueron utilizados posteriormente en Basha y cols, también reportaron su característica inmunogénica y alta afinidad de unión a HLA-B7 (Basha, et al., 2010).

En cuanto a los péptidos A y D, el presente estudio fue el primero en utilizarlos, la importancia de estos radica en que, el péptido A se encuentra en una región de la proteína que está conformada en gran parte por aminoácidos polares con carácter hidrofílico y además más expuestos espacialmente en la estructura tridimensional predicha de la molécula de Mamoglobina. En cuanto al péptido D, su importancia radica en ser una herramienta clave para la posible detección de la isoforma de Mamoglobina en las pacientes con cáncer de seno.

Todos los sueros de los conejos mostraron reconocimiento de su péptido blanco. Es importante destacar que los sueros Anti-péptido C (62 y 75) y Anti-péptido D (78 y 80), no mostraron reconocimiento cruzado entre estos dos péptidos, los cuales difieren sólo en tres residuos de aminoácidos, lo cual fue importante debido a que el suero Anti-péptido D permitía reconocer la isoforma de la proteína Mamoglobina.

Debido a que el suero Anti-péptido C (75) mostró reconocimiento cruzado hacía otros péptidos como A y B, se pretendió eliminar los anticuerpos responsables del reconocimiento cruzado, efectuando una serie de purificaciones. Aunque se logró disminuir la señal de reconocimiento hacía los péptidos A y B, también disminuyó de forma marcada el reconocimiento hacia péptido C, al punto de perderse señal. Esto mostró que era mayor la afinidad de los anticuerpos presentes en el suero Anti-péptido C por los péptidos A y B, que por el C.

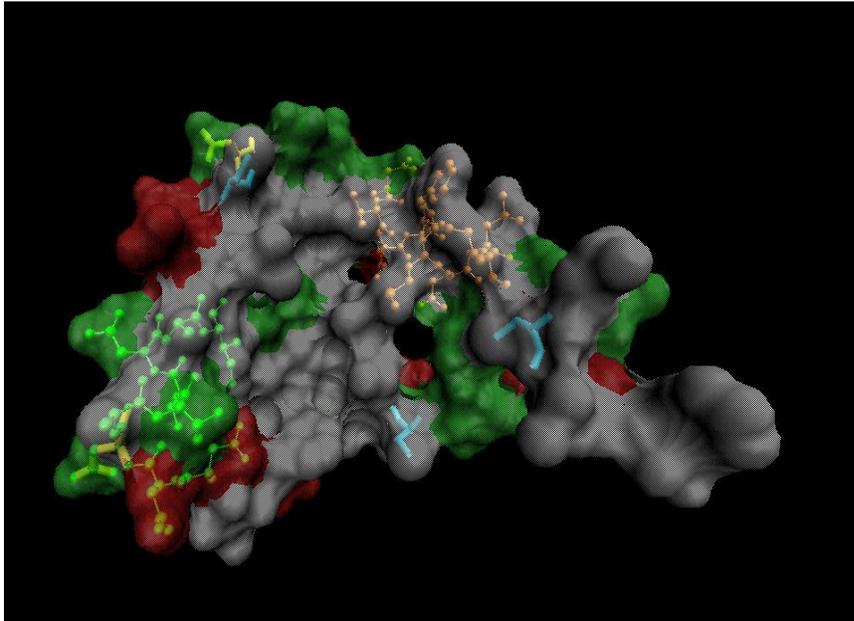
Por lo cual teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de ELISA para evaluar la capacidad y especificidad de reconocimiento de los diferentes sueros para los 4 péptidos sintetizados, se eligieron los sueros Anti-péptido A (54), Anti-péptido B (55), Anti-péptido C (62) y Anti-péptido D (78), para determinar la concentración de Mamoglobina en los grupos de individuos participantes en el estudio.

Estos sueros fueron usados para la construcción de las curvas estándar para lo cual se emplearon una serie de concentraciones de Mamoglobina recombinante (*Human Mammaglobin Ray Biotech, Inc*), partiendo de una concentración de 25ng/ml hasta 0,048ng/ml, tal como había sido previamente reportado por Zehenter y cols en 2004 y Bernstein y cols en 2005. A manera general los anticuerpos mostraron un buen reconocimiento de la Mamoglobina recombinante, los valores de absorbancia fueron directamente proporcionales a la concentración de la proteína recombinante, lo cual confirmó la especificidad de los sueros seleccionados en el reconocimiento de las diferentes regiones de la proteína, sugiriendo su idoneidad para determinar la concentración de Mamoglobina en el suero de pacientes y controles.

El análisis de los sueros de los individuos participantes mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Mamoglobina de los pacientes con relación a los controles, tal como había sido reportado anteriormente por Fanger y cols en 2002; Zehentner y cols en 2004 y Bernstein y cols en 2005. La importancia radica en el hecho que tanto los casos como los controles mostraron algún nivel de Mamoglobina, a pesar de que algunos de los integrantes del grupo de pacientes exhibieron concentraciones iguales a los controles, la significancia está dada por la presencia de valores altos en el grupo de pacientes.

Es importante resaltar que el suero Anti-péptido B detectó concentraciones más elevadas de proteína Mamoglobina en el grupo de pacientes, en comparación al Anti-péptido C que reveló menores concentraciones en este grupo. Mientras que este suero Anti-péptido C al usarse en la realización de la curva estándar reveló mayores valores de absorbancia en comparación al Anti-péptido B.

Esto puede deberse al hecho de que la proteína Mamoglobina recombinante utilizada para realizar las curvas, posee la longitud completa incluyendo el péptido señal, a su vez se encuentra en forma monomérica y no dimérica como normalmente está en suero, esto podría generar un cambio conformacional que permite que el péptido C este más expuesto en la proteína recombinante, mientras que en la proteína sérica al estar el péptido C en una región que posiblemente forma parte del bolsillo (*core*) que se genera al dimerizarse la Mamoglobina con la Lipofilina B, y no está lo suficientemente expuesto para el reconocimiento por dicho suero. En la *Figura 23* se aprecia la ubicación de los péptidos B y C en la estructura de la proteína Mamoglobina, donde se aprecia que el péptido C forma parte de una región conformada por aminoácidos no polares (color blanco).



**Figura 22. Ubicación de los péptidos B y C en la estructura de la proteína Mamoglobina.** La estructura de color verde indica la ubicación del péptidos B (izq.) la estructura de color naranja indica la ubicación del péptidos C (der.). las tres estructuras de color turquesa muestran las Cys 4, 47, 72. Obsérvese que en color verde se representan los residuos polares, en rojo los residuos ácidos y en blanco los residuos no polares. Nótese que los residuos no polares forman parte del núcleo o “core” el cual al formar el complejo con Lipofilina B a través de los puentes disulfuro entre las cisteínas, permitirán la unión de moléculas esteroides para ser transportadas. (Para esta representación se utilizó el programa Visual Molecular Dynamics, Univ. Illinois)

Adicionalmente la especificidad del suero Anti-péptido B para reconocer su respectivo péptido fue confirmada al pre-incubarse con la proteína Mamoglobina recombinante, previo a la detección de la proteína en el suero de los individuos, lo cual dio como resultado valores de absorbancia cercanos al blanco. Simultáneamente algunos sueros de pacientes fueron evaluados con el suero pre-inmune 55, en cuyo caso los valores de absorbancia fueron cercanos al valor del blanco, siendo similares a los obtenidos con el suero Anti-péptido B pre incubado con Mamoglobina recombinante. Estos resultados reflejaron la especificidad hacia el péptido B, de los anticuerpos presentes en el suero Anti-péptido B, los cuales se

generaron producto de las inmunizaciones realizadas con dicho péptido, pues previamente no existían en el conejo inmunizado, como lo demuestran los ensayos efectuados con el suero pre-inmune.

Cabe resaltar que el grupo de pacientes presentó concentraciones más heterogéneas (presencia de niveles bajos y altos) de Mamoglobina, mientras que el grupo control presentó concentraciones más homogéneas (muy parecidas entre sí), sin encontrarse valores extremos en este último grupo. Esta observación aplica para las concentraciones calculadas con sueros Anti-péptido A, B y C. En cuanto al suero Anti-péptido D sólo una muestra de suero del grupo de pacientes mostró valores de absorbancia de 0,247 OD, los cuales fueron muy superiores a los obtenidos para el blanco, lo cual podía estar indicando la presencia de la isoforma en esta paciente. La paciente no presentó ninguna característica especial en cuanto al uso de anticonceptivos, terapia de reemplazo hormonal, estadio, tipo de cáncer, etc.

Es importante mencionar que las muestras de suero del grupo de pacientes que presentaron mayores concentraciones no tenían alguna característica que compartieran entre ellas, como el estadio, la edad, el estado del receptor de estrógenos y progesterona, el tipo de cáncer. La única observación es que dichas pacientes no habían presentado metástasis a otros órganos y tampoco estaban en recaída. Lo cual podría aproximarnos a lo ya publicado por otros autores quienes reportan a la Mamoglobina como un marcador de buen pronóstico (Nuñez-villar, et al, 2003).

Las células de la glándula mamaria normalmente expresan receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), los cuales actúan como factores de transcripción que se unen al ADN con el fin de regular la expresión génica. En pacientes con cáncer de mama, la presencia de los receptores de progesterona y estrógenos, son predictores de mejor pronóstico. Durante un

proceso tumoral la ausencia o pobre funcionamiento de RE se ha asociado con una respuesta pobre a terapia endocrina. Está demostrada la relación de acción esteroide con los factores de crecimiento y oncogenes (erbA), lo cual propicia el crecimiento de tumores. La sobreexpresión de éste último se ha asociado con aumento proliferación celular por lo que se le asigna un status de marcador de mal pronóstico. El análisis estadístico de ésta característica mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov, no arroja diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de Mamoglobina y el estado de estos receptores. Estos hallazgos son contrarios a lo previamente reportado por Nuñez-Villar y cols en 2003, quienes encontraron una correlación significativa entre la elevada expresión de Mamoglobina (mRNA y proteína en tejido) y la presencia de receptores de estrógenos y progesterona positivos; indicando que estas características corresponden a tumores menos agresivos, debido a que como ya se mencionó anteriormente la presencia de los receptores, se relaciona con una mejor respuesta a la terapia endocrina.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas al analizar si la concentración de Mamoglobina estaba relacionada con el estadio de las pacientes con cáncer de mama analizadas. Esta falta de significancia radica en la presencia de amplios intervalos de confianza en los diferentes estadios, usando los sueros Anti-péptido A, B ó C, estos intervalos de confianza se solapan entre si entre los diferentes estadios, sin observarse diferencia entre ellos, lo cual es producto de la presencia de valores bajos y elevados de la concentración de proteína Mamoglobina en todos los estadios.

Aunque si bien es claro esta expresión de la proteína Mamoglobina en los tumores de mama es frecuente (Span, et al., 2004; Grunewald, et al., 2000) y además al parecer de manera independiente del estadio, grado, o histología

del tumor (Watson y Fleming en 1996; y Fanger y cols en 2002; Raica y cols, 2009). En el presente estudio no se evidencia variación en la concentración de la proteína Mamoglobina en los diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad en las pacientes, contrario a lo reportado por Zehentner y cols en 2004, quienes encontraron variaciones en la concentración de la proteína dependiendo del estadio. Estos autores, evidenciaron la expresión de la proteína, únicamente en los estadios IIa a IV, siendo mayores las concentraciones de Mamoglobina en el estadio IV. Mientras que en el presente estudio se halló concentración de la proteína desde el estadio I hasta el IV, sin observarse concentraciones mayores en algún estadio en particular.

Aunque la presencia de metástasis es quizás la característica de peor pronóstico en las pacientes con cáncer en general, en el presente estudio no se encontró relación con la concentración de Mamoglobina, probablemente se debió al pequeño número de casos que presentaron metástasis (8 de 51 casos). Para lo cual sería conveniente la realización de un estudio donde se incluya un mayor número de casos con metástasis, con el fin de determinar si existe diferencia entre el grupo de pacientes con y sin metástasis.

En cuanto a la presencia o ausencia de recaída en las pacientes con cáncer de mama, no se halló relación con los niveles de Mamoglobina, es posible que el bajo número de casos que presentaron esta característica, interfiera en el análisis de esta característica (4 de 51 casos). Aunque las concentraciones de Mamoglobina fueron menores a la de los demás casos, esto podría ser producto de la falta de una de las glándulas mamarias, teniendo en cuenta que la Mamoglobina es secretada por las células de esta glándula. Cabe aclarar que las pacientes de este grupo de recaída, durante el primer episodio de cáncer de mama recibieron, adicional a la cirugía

tratamiento antitumoral (quimioterapia y/o radioterapia), pero en el momento de ingreso al presente estudio se encontraban sin tratamiento y/o cirugía para el actual episodio de recaída.

Es bien conocido que el riesgo de cáncer de mama aumenta con una mayor exposición a hormonas ováricas endógenas, por lo que la menarquía temprana o menopausia tardía aumentan el riesgo a desarrollar la enfermedad. De igual forma la edad está relacionada con el desarrollo de cáncer de mama, una mayor edad se relaciona con falla en procesos de apoptosis, control del ciclo celular, senescencia y mecanismos de reparación de daños en el material genético, adicionalmente con una mayor exposición a estrógenos.

En cuanto a la correlación entre los niveles de Mamoglobina, la edad y la menopausia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Al analizar la matriz de diagramas de dispersión realizada con el propósito de conocer si existe relación entre la edad y la concentración de Mamoglobina, se observó que a medida que aumenta la edad en el grupo de pacientes con cáncer de seno (la edad no se evaluó en el grupo control puesto que fue una de las variables de pareamiento, por lo cual perdió su significancia, debido a que fue manipulada en este grupo), los valores de la concentración hallados con los tres sueros Anti-péptido A, B y C no siguen ningún patrón *Figura 21*. Lo cual puede indicar que la concentración de Mamoglobina no está influenciada por la edad y las características propias de la mujer a medida que avanza su edad, cómo es el caso de la menopausia, lo que a su vez muestra que no existe relación entre los cambios hormonales y la concentración de Mamoglobina.

El riesgo aumentado de padecer cáncer de mama también se ha relacionado con un retardo en la edad en que las mujeres tienen el primer

hijo. Incluso la nuliparidad, se ha descrito como un factor que puede aumentar el riesgo a desarrollar la enfermedad y la alta paridad, como un factor que disminuye el riesgo, de presentar la enfermedad, al menos después de los 50 años. Sin embargo, los mecanismos endocrinos relativos al embarazo y su relación directa con la variación del riesgo a padecer cáncer de mama son poco conocidos. Factores hormonales exógenos al igual que la terapia de reemplazo de estrógeno, combinado al uso de anticonceptivos orales pueden causar un pequeño aumento en el riesgo de cáncer de mama (Park, Et al., 2000; Key, Et al., 2002). En el presente estudio, se analizaron dichas características en relación a la concentración de Mamoglobina en los sueros de los individuos casos y controles y se encontró que ni el uso de anticonceptivos ni la terapia de reemplazo hormonal no influyen en la concentración de la Mamoglobina. Adicionalmente al analizar el tamaño de copa del brasier, asociada a mayor o menor volumen de masa glandular (A menor, B y C mayor), sólo la copa B mostró una relativa significancia usando el suero Anti-péptido A, en congruencia a lo reportado en anteriores estudios por Bernstein y cols en 2005, los cuales reportan que la concentración de Mamoglobina es directamente proporcional a la copa del brasier, concluyendo la especificidad de la expresión de Mamoglobina hacía el tejido mamario.

En el presente estudio se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Mamoglobina en los sueros de los casos y los controles, siendo mayor en el grupo de casos. No hay evidencia de que exista relación entre la concentración de Mamoglobina con características como: presencia del receptor de estrógenos y progesterona, estadio de la enfermedad, edad de los individuos, edad de la menopausia, entre otros, para ninguno de los los tres sueros usados en las pruebas ( Anti-péptido A. B y C).

Por lo anterior, se determinó cuál de las tres regiones (A, B, C) reconocida por cada uno de los sueros empleados, podrían ser “mejor candidato” para determinar la presencia y concentración de Mamoglobina sérica. Para ello se halló el Índice de Detectabilidad, que permite ver la capacidad de discriminación entre casos y controles, este describe la diferencia entre los valores medios de los grupos que se comparan, es decir casos y controles, estandarizada con su desviación estándar el, el cual mostró que el péptido B es el mejor candidato para ser utilizado en la determinación de la concentración de Mamoglobina en a pruebas de ELISA. Lo cual es de gran relevancia, por ser este el el primer estudio que reporta la utilización de esta región como blanco para la detección de Mamoglobina. Adicionalmente el suero anti-péptido B detectó las mayores concentraciones de Mamoglobina en suero de pacientes con cáncer de mama. Esto posiblemente se deba a que este péptido se encuentra ubicado en una región de la proteína Mamoglobina más expuesta, cuando esta se encuentra en complejo con Lipofilina B.

Así mismo, la la curva ROC para el suero Anti-péptido B, arroja un área bajo la curva de 0,961, una sensibilidad del 86,3% y una especificidad del 96%, esto muestra que la prueba es más segura para determinar negativos que positivos. Valores de sensibilidad y especificidad mayores a los reportados por Bernstein y cols en 2005, quienes obtuvieron una curva ROC con un área bajo la curva de 0.892, una sensibilidad del 68.8% y una especificidad del 88.8%, utilizando un anticuerpo generado a partir de la inmunización de conejos con una secuencia de peptídica de 16 aminoácidos correspondiente a la región carboxi-terminal de la proteína, esa secuencia resultó ser similar en cuanto a su secuencia al péptido C utilizado en el presente estudio, quién mostró un área bajo la curva de 0.849.

## 11. CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que factores como la edad, edad de la menopausia, tamaño de copa de brasier, presencia de receptores RP, RE, Erb2 positivos, estadio de la enfermedad, metástasis, recaída, no afectan la concentración de Mamoglobina en el suero de las pacientes, lo cual le brinda la ventaja de ser estable a pesar de la presencia o ausencia de estos factores que si se han relacionado con la aparición del cáncer de mama.

Se demostró que la proteína Mamoglobina puede ser detectada por un ensayo de Elisa, en el suero de pacientes con cáncer de mama. Mostrándose como un marcador ideal, fácil de usar, no invasivo y estable frente a las diversas características analizadas (edad, estadio, tipo de cáncer, estado de RE, RP, Erb2)

En este estudio, se observó que la proteína Mamoglobina estuvo presente en 100% de las muestras de suero de las pacientes analizadas con los tres anticuerpos que reconocen diferentes regiones de la proteína Mamoglobina nativa. Mientras que estudios previos habían demostrado que 70% a 80% de los tumores de mama son positivos para la expresión Mamoglobina (Bernstein, et al., en 2005).

En conjunto, estos resultados sugieren que anticuerpos que reconozcan la región de la proteína Mamoglobina, en donde se ubica el péptido B, pueden estar reconociendo un nuevo biomarcador sérico para apoyar el diagnóstico de cáncer de mama.

Como tal, este marcador sérico es una promesa significativa para la detección temprana de cáncer de seno.

## 12. PERSPECTIVAS

Generación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido B.  
Aumentar tamaño de muestra para obtener curva ROC más robusta.

Realizar un estudio con un tamaño de muestra mayor en el cual se incluya un número de casos mayor y similar por estadio, con el fin de confirmar si la concentración de la proteína no varían entre estadios ó si en estadios tempranos existen mayores concentraciones de Mamoglobina.

Cuantificar la expresión del gen de la Mamoglobina a nivel de mRNA y compararla con la concentración de la proteína en suero, con el propósito de analizar si una mayor expresión de mRNA se correlaciona con mayores niveles séricos de proteína Mamoglobina en los grupos de casos.

Determinar la presencia de la Mamoglobina en tejido tumoral de glándula mamaria por inmunohistoquímica y a la vez identificar la presencia de Mamoglobina en tejido de ganglios linfáticos con el fin de detectar la posible presencia de micro metástasis, en miras de usarse como un marcador de seguimiento que pueda determinar la presencia de metástasis ocultas en otros tejidos, los cuales podrían haber sido negativos por patología.

### 13. BIBLIOGRAFIA

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010. Atlanta: American Cancer Society, Inc.

BERNSTEIN JL, GODBOLD JH, RAPTIS G, WATSON MA, LEVINSON B, AARONSON SA, FLEMING TP. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6528-35.

CARTER D, DOUGLASS JF, CORNELLISON CD, RETTER MW, JOHNSON JC, BENNINGTON AA, FLEMING TP, REED SG, HOUGHTON RL, DIAMOND DL, VEDVICK TS. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. Biochemistry. 2002 May 28;41(21):6714-22.

COGLIANO V, GROSSE Y, BAAN R, et al. Carcinogenicity of combined oestrogen-progestagen contraceptives and menopausal treatment. Lancet Oncol 2005;6:552-3.

COLDITZ, G.A. Physical activity and body weight. In: Cancer: Principles and Practice of Oncology (6th Edition). Eds. V.T. DeVita Jr., S. Hellman and S.A. Rosenberg. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p610, 2001.

COLDITZ GA, ROSNER BA, CHEN WY, HOLMES MD, HANKINSON SE. Risk factors for breast cancer according to estrogen and progesterone receptor status. J Natl Cancer Inst 2004;96:218-28.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet. 1996;347(9017):1713-1727.

COLLINS JA, BLAKE JM, CROSIGNANI PG. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. Hum Reprod Update. 2005;11(6):545-560.

CHRISTINA L. SIEWIT, BRIDGET GENGLER, ESERA VEGAS, RACHEL PUCKETT, AND MAGGIE C. LOUIE. Cadmium Promotes Breast Cancer Cell

Proliferation by Potentiating the Interaction between ER and c-Jun. *Mol Endocrinol*, May 2010, 24(5): 0000–0000

DALING JR, MALONE KE, DOODY DR, et al. Relation of regimens of combined hormone replacement therapy to lobular, ductal, and other histologic types of breast carcinoma. *Cancer*. 2002; 95(12):2455–2464.

DÍAZ S, PIÑEROS M, SÁNCHEZ O. Detección temprana del cáncer de mama: aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. 2005; 9(3):93-105.

FANGER GR, HOUGHTON RL, RETTER MW, HENDRICKSON RC, BABCOOK J, DILLON DC, DURHAM MD, REYNOLDS LD, JOHNSON JC, CARTER D, FLEMING TP, ROCHE PC, PERSING DH, REED SG. Detection of mammaglobin in the sera of patients with breast cancer. *Tumour Biol*. 2002 Jul-Aug;23(4):212-21.

FERLAY, F. BRAY, P. PISANI, DM. PARKIN. GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Cancer Base No. 5, version 2.0 IARC Press, Lyon 2004.

FIGO Committe on Gynecologic Oncology. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers. Elsevier. 2000; 143-159.

FLEMING TP, WATSON MA. Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 923:78-89.

GIANGRANDE PH, KIMBREL EA, EDWARDS DP, et al. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol*. 2000;20(9):3102–3115.

GRUNEWALD K, HAUN M, FIEGL M, URBANEK M, MULLER-HOLZNER E, MASSONER A, et al. Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Lab Invest* 2002;82(9):1147–53.

HAYES DF, BAST RC, DESCH CE, FRITSCHKE H, KEMENY NE, JESSUP JM, et al. Tumor marker utility gradingsystem: A framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1456-66.

HESELBROCK D, KURPIOS N, HASSELL, J, WATSON, M AND FLEMING, T. PEA3, AP-1, and a unique repetitive sequence all are involved in transcriptional regulation of the breast cancer-associated gene, mammaglobin. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2005; 89: 289–296

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. Anuario Estadístico 2006. 2009. <http://www.cancer.gov.co>.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA. Anuario Estadístico 2007. 2010. <http://www.cancer.gov.co>

ILIAS BASHA H, TIRIVEEDHI V, FLEMING TP, GILLANDERS WE, MOHANAKUMAR T. Identification of immunodominant HLA-B7-restricted CD8(+) cytotoxic T cell epitopes derived from mammaglobin-A expressed on human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jun 11.

JARAMILLO A, NARAYANAN K, CAMPBELL LG, BENSHOFF ND, LYBARGER L, HANSEN TH, FLEMING TP, DIETZ JR, MOHANAKUMAR T. Recognition of HLA-A2-restricted mammaglobin-A-derived epitopes by CD8+ cytotoxic T lymphocytes from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Nov;88(1):29-41.

KEY T, APPLEBY P, BARNES I, REEVES G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:606–16.

KIRSH V, KREIGER N. Estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and risk of postmenopausal breast cancer in Canada. *Cancer Causes Control*. 2002;13(6):583–590.

KOBAYASHI K, MIMURA N, FUJII H, et al. Role of human cytochrome P450 3A4 in metabolism of medroxyprogesterone acetate. *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):3297–3303.

LEWIS MJ, WIEBE JP, HEATHCOTE JG. Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma [electronic article]. *BMC Cancer*. 2004;4:27.

LI CI, MALONE KE, PORTER PL, et al. Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer. *JAMA*. 2003;289(24):3254–3263.

LOZANO,JA, GALINDO,JD, GARCÍA-BORRÓN,JC, MARTÍNEZ-LIARTE,JH, PEÑAFIEL R, SOLANO F. *Bioquímica y biología molecular en ciencias de la salud*. Tercera edición: McGraw-Hill/Interamericana: 2005. p. 501-513

MACCIONI M, RIERA CM, RIVERO VE. Identification of rat prostatic steroid binding protein (PSBP) as an immunosuppressive factor. *J Reprod Immunol*. 2001 May; 50(2):133-49.

MACCIONI M, RIVERO V, RIERA C. PROSTATEIN (or rat prostatic steroid binding protein) is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis. *Clin Exp Immunol*. 1998 May;112(2):159-65.

MIN C, TAFRA L, VERBANAC K. Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Res*. 1998 Oct 15;58(20):4581-4.

MORENO J. Antiflammins: endogenous nonapeptides with regulatory effect on inflammation. *Gen Pharmacol*. 1997 Jan;28(1):23-6. Review.

MUKHERJEE AB, KUNDU GC, MANTILE-SELVAGGI G, YUAN CJ, MANDAL AK, CHATTOPADHYAY S, ZHENG F, PATTABIRAMAN N, ZHANG Z. Uteroglobin: a novel cytokine?. *Cell Mol Life Sci*. 1999 May;55(5):771-87. Review.

NATIONAL CANCER INSTITUTE .<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>

NEVILLE MC. Physiology of lactation. *Clin Perinatol* 1999, 26:253.

NÚÑEZ-VILLAR MJ, MARTÍNEZ-ARRIBAS F, POLLÁN M, LUCAS AR, SÁNCHEZ J, TEJERINA A, SCHNEIDER J. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res*. 2003;5(3):R65-70. Epub 2003 Mar 6.

O`BRIEN N, MAGUIRE T, O`DONOVAN N, LYMCH N, et al. Mammaglobin A: a promising Marker for Breast Cancer. *Clin Chem*. 2002; 48:1362-64.

PARK, K. Textbook of Preventive and Social Medicine (16th Edition). Banarsidas Bhanot, Jabalpur, p283, 2000.

PIKE MC, KRAILO MD, HENDERSON BE, CASAGRANDE JT, HOEL DG. Hormonal risk factors, breast tissue age and the age-incidence of breast cancer. *Nature* 1983;303:767–70.

PIÑEROS, M. HERNÁNDEZ, F. Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: an emerging problem. *Cancer*. 101. 2004; 2285-92.

RAICA M, CÎMPEAN AM, MECHE A, ALEXA A, SUCIU C, MUREȘAN A. Analysis of the immunohistochemical expression of mammaglobin A in primary breast carcinoma and lymph node metastasis. *Rom J Morphol Embryol*. 2009;50(3):341-7

RIVERA P. Utilidad Clínica de los marcadores tumorales. *Rev Mex Pat Clin*. 1997;44:245-58

RUBIAL A. Marcadores tumorales de secreción: situación actual. *Med Clin (Barc)*. 2002;118:750-56.

RUSSO J, RUSSO IH. IN: NEVILLE MC, DANIEL CW, editors. The mammary gland. New York, NY: Plenum Publishing Corporation; 1987. p. 67–93.

RUSSO J, HU YF, YANG X, RUSSO IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000;27:17–38.

RUSSO J, RUSSO IH. Development of the human breast. *Maturitas* 49 (2004) 2–15

SCHROHL AA, HOLTEN-ANDERSEN M, SWEEP F, SCHMITT M, HARBECK N, FOEKENS, et al. Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics*. 2003; 2:378 -87

SKILDUM A, FAIVRE E, LANGE CA. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Endocrinol*. 2005;19(2):327–339.

SUCHY, B. AUSTRUP, F. DRIESEL, G. EDER, C. KUSIAK, I. UCIECHOWSKI, P. GRILL, H. GIESING, M. Detection of mammaglobin

expressing cells in blood of breast cancer patients. *Cancer Letters* 158.2000; 171-178.

VALDÉS V, PÉREZ A, LABBOK M: Fisiología de la glándula mamaria. En: *Lactancia para la Madre y el Niño*, Santiago Mediterraneo, (ed) 1994, p 21.

VENEROSSO C, SIEGEL R, LEVINE P. Early age at first childbirth associated with advanced tumor grade in breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 32 (2008) 215–223

VOGEL FR, HEM SL. Immunologic Adjuvants. En *Vaccines*. Plotkin and Orenstein eds. 4th edition. Elsevier Inc. Filadelfia. 2004

WATSON MA, FLEMING TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996; 56:860-5.

WATSON MA, DARROW C, ZIMONJIC DB, POPESCU NC, FLEMING TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene.* 1998 Feb 12;16(6):817-24.

WATSON MA, DINTZIS S, DARROW CM, VOSS LE, DIPERSIO J, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res.*1999; 59:3028-31.

WIEBE JP, LEWIS MJ. Activity and expression of progesterone metabolizing 5a-reductase, 20a-hydroxysteroid oxidoreductase and 3a(b)-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF- 10A) human breast cancer cells [electronic article]. *BMC Cancer.* 2003;3:9.

WHO | World Health Organization. <http://www.who.int>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

XI L, NICASTRI DG, EL-HEFNAWY T, HUGHES SJ, LUKETICH JD, GODFREY TE. Optimal Markers for Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR Detection of Circulating Tumor Cells from Melanoma,

Breast, Colon, Esophageal, Head and Neck, and Lung Cancers. Clin Chem. 2007;53:1206-15

ZACH O, KASPARU H, KRIEGER O, HEHENWARTER W, GIRSCHIKOFSKY M, LUTZ D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction for mammaglobin mRNA. J Clin Oncol 1999;17(7):2015– 9.

ZEHENTNER B, CARTER D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. Clin Biochem. 2004;37:249-57.

ZEHENTNER BK, PERSING DH, DEME A, TOURE P, HAWES SE, BROOKS L, FENG Q, HAYES DC, CRITICHLow CW, HOUGHTON RL, KIVIAT NB. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. Clin Chem. 2004 Nov;50(11):2069-76. Epub 2004 Sep 16.

ZEHENTNER, DEME, TOURE, HAWES, BROOKS, FENG, HAYES, ZHANG, PERSING, CRITICHLow, HOUGHTON, AND KIVIAT. Expression of Mammaglobin, B305D, GABA $\pi$  and B726P and elevation of Mammaglobin protein in the peripheral blood of women with untreated breast cancers. Clin Chem. 2004 November ; 50(11): 2069–2076.

ZIDMAN I. The fate of circulating tumors cells. I. Passage of cells through capillaries. Cancer Res. 1961; 21: 38-9.

## 14. ANEXOS

### Anexo 1. Organización de la placa ELISA sueros pre-inmune y sangría final vs péptidos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		53 PI	53 PI	54 PI	54 PI	55 PI	55 PI	57 PI	57 PI	61 PI	61 PI	
C		53 SF	53 SF	54 SF	54 SF	55 SF	55 SF	57 SF	57 SF	61 SF	61 SF	
D		75 PI	75 PI	78 PI	78 PI	80 PI	80 PI					
E		75 SF	75 SF	78 SF	78 SF	80 SF	80 SF					
F												
G		Bico	Bico									
H												

Fecha: \_\_\_\_\_

Antígeno: Péptido

Dil Ac primario: 1:100

Dil conjugado 1:5000

## Anexo 2. Ensayo I. Elisa Péptido A vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010

Ensayo Inmunoenzimático-ELISA - Anticuerpos Conejos vs Péptidos											
Placa A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B	53 P.I	53 P.I	54 PI	54 PI	55 PI	55 PI	57 PI	57 PI	62 PI	62 PI	
C	SF	0.063	0.05	0.061	0.057	0.05	0.043	0.052	0.058	0.057	0.064
D		0.192	0.172	1.081	0.93	0.191	0.14	0.083	0.078	0.057	0.073
E	75 P.I	75 P.I	78 P.I	78 P.I	80 P.I	80 P.I					
F	SF	0.07	0.048	0.056	0.049	0.064	0.051				
G	Blco	0.584	0.427	0.107	0.094	0.069	0.053				
H											

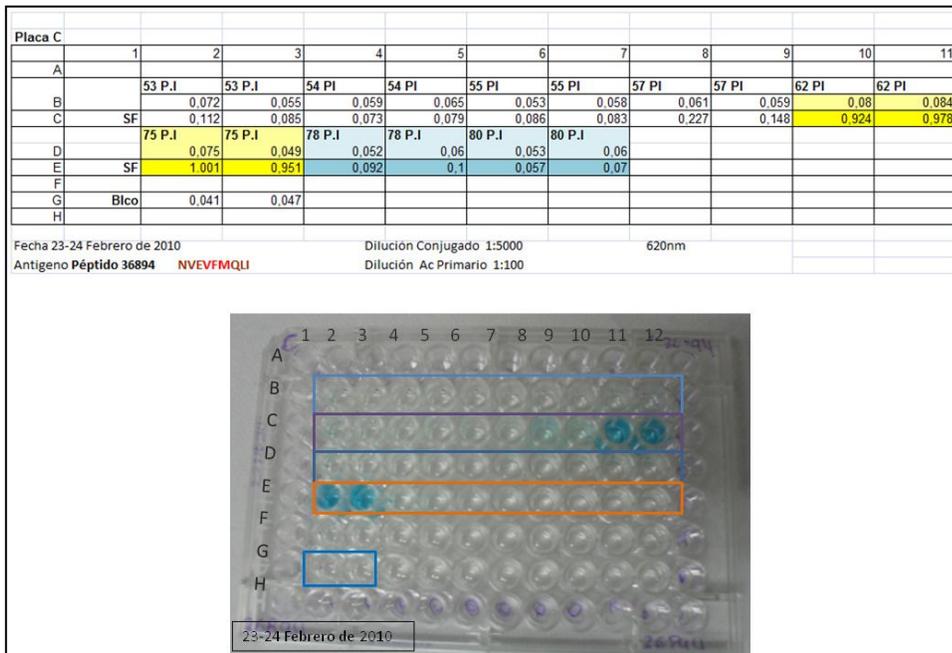
Fecha 23-24 Febrero de 2010 Dilución Conjugado 1:5000 620nm  
 Antígeno Péptido 36892 INPQVSKTE Dilución Ac Primario 1:100

**Anexo 3. Ensayo I. Elisa Péptido B vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010**

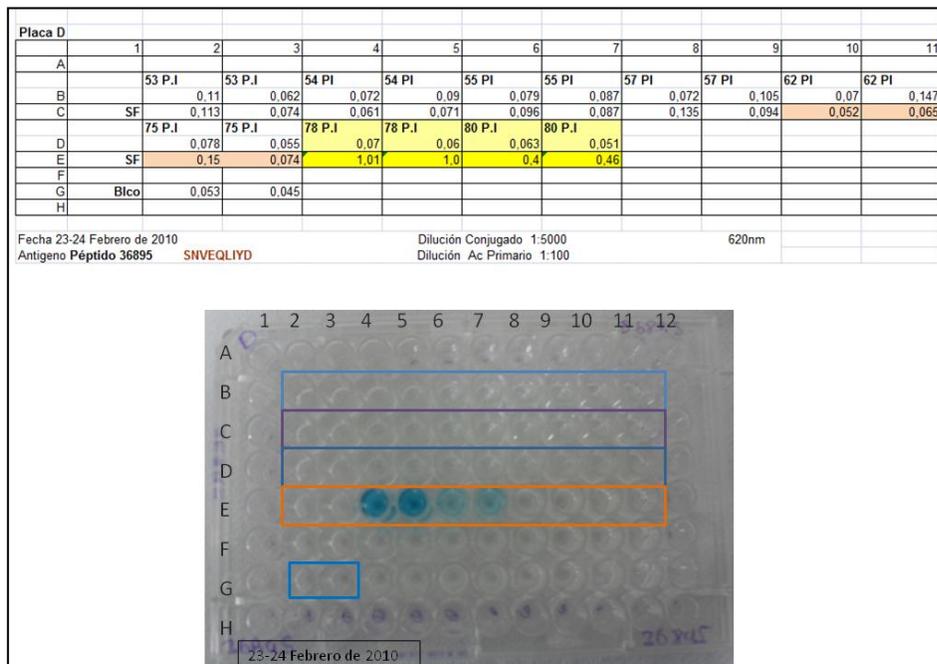
Placa B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B	53 P.I	53 P.I	54 P.I	54 P.I	55 P.I	55 P.I	57 P.I	57 P.I	62 P.I	62 P.I	
C	SF	0.069 0.145	0.051 0.056	0.047 0.06	0.052 0.061	0.054 1.318	0.047 1.315	0.055 1.376	0.056 1.446	0.058 0.421	0.052 0.034
D	75 P.I	75 P.I	78 P.I	78 P.I	80 P.I	80 P.I					
E	SF	0.055 0.326	0.042 0.331	0.048 0.064	0.049 0.067	0.053 0.057	0.046 0.051				
F											
G	Blco	0.055	0.044								
H											

Fecha 23-24 Febrero de 2010      Dilución Conjugado 1:5000      620nm  
 Antígeno Péptido 36893    DDNATTNAI      Dilución Ac Primario 1:100

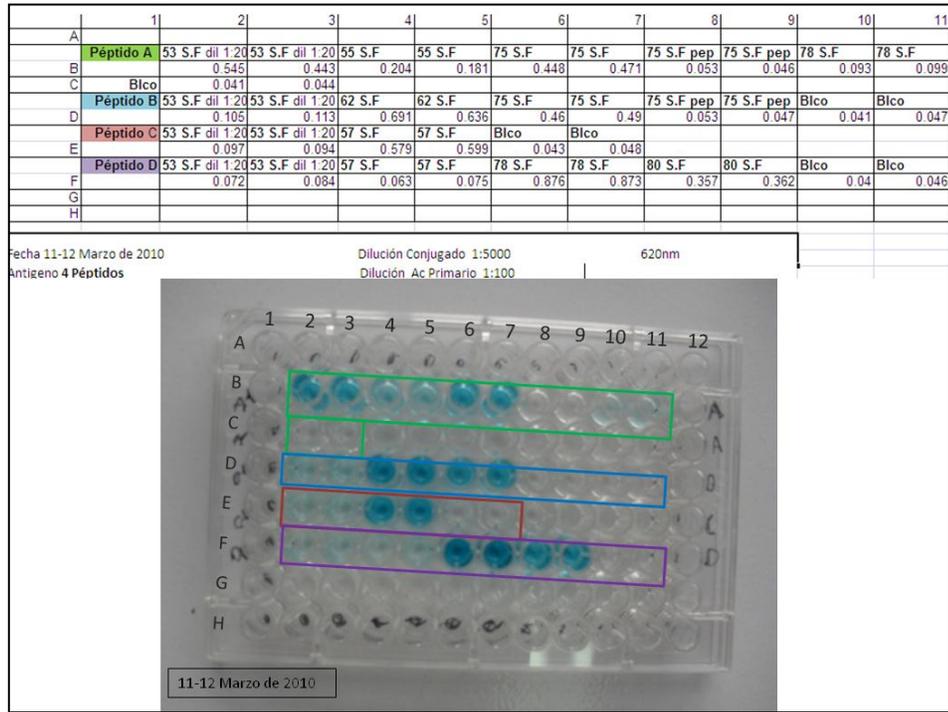
**Anexo 4. Ensayo I. Elisa Péptido C vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010**



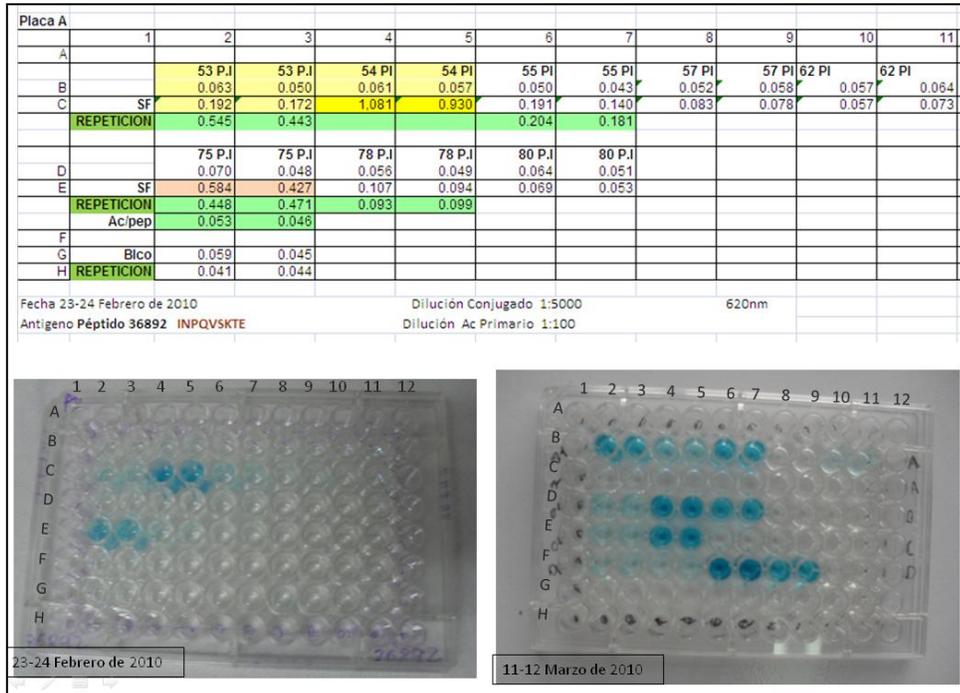
### Anexo 5. Ensayo I. Elisa Péptido D vs suero P.I y S.F. 23-24 febrero de 2010



## Anexo 6. Ensayo II. Elisa Péptidos vs suero S.F. 11-12 Marzo de 2010



## Anexo 7. Comparación Péptido A Ensayos I y II



## Anexo 8. Comparación Péptido B Ensayos I y II

Placa B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B		53 P.I	53 P.I	54 PI	54 PI	55 PI	55 PI	57 PI	57 PI	62 PI	62 PI
C	SF	0.069	0.051	0.047	0.052	0.054	0.047	0.055	0.056	0.058	0.052
	REPETICION	0.145	0.056	0.06	0.061	1.318	1.315	1.376	1.446	0.421	0.034
		0.105	0.113							0.691	0.636
D		75 P.I	75 P.I	78 P.I	78 P.I	80 P.I	80 P.I				
E	SF	0.055	0.042	0.048	0.049	0.053	0.046				
	REPETICION	0.326	0.331	0.064	0.067	0.057	0.051				
	Ac/pep	0.46	0.49								
F		0.053	0.047								
G	Bico	0.055	0.044								
H	REPETICION	0.041	0.047								

Fecha 23-24 Febrero 11-12 Marzo de 2010 Dilución Conjugado 1:5000 620nm  
 Antígeno Péptido 36893 DDNATTNAI Dilución Ac Primario 1:100

23-24 Febrero de 2010

11-12 Marzo de 2010

## Anexo 9. Comparación Péptido C Ensayos I y II

Placa C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B		53 P.I	53 P.I	54 PI	54 PI	55 PI	55 PI	57 PI	57 PI	62 PI	62 PI
C	SF	0.072	0.055	0.059	0.065	0.053	0.058	0.061	0.059	0.08	0.084
	REPETICION	0.112	0.085	0.073	0.079	0.086	0.083	0.227	0.148	0.924	0.978
		0.097	0.094					0.579	0.599		
D		75 P.I	75 P.I	78 P.I	78 P.I	80 P.I	80 P.I				
E	SF	0.075	0.049	0.052	0.06	0.053	0.06				
	REPETICION	1.001	0.951	0.092	0.1	0.057	0.07				
F		0.041	0.047								
G	Bico	0.041	0.047								
H	REPETICION	0.043	0.048								

Fecha 23-24 Febrero 11-12 Marzo de 2010 Dilución Conjugado 1:5000 620nm  
 Antígeno Péptido 36894 NVEVFMQLI Dilución Ac Primario 1:100

23-24 Febrero de 2010

11-12 Marzo de 2010

## Anexo 10. Comparación Péptido D Ensayos I y II

Placa D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B		53 P.I	53 P.I	54 P.I	54 P.I	55 P.I	55 P.I	57 P.I	57 P.I	62 P.I	62 P.I
C	SF	0.11	0.062	0.072	0.09	0.079	0.087	0.072	0.105	0.07	0.147
	REPETICION	0.113	0.074	0.061	0.071	0.096	0.087	0.135	0.094	0.052	0.065
		0.072	0.084					0.063	0.075		
D		75 P.I	75 P.I	78 P.I	78 P.I	80 P.I	80 P.I				
E	SF	0.078	0.055	0.07	0.06	0.063	0.051				
	REPETICION	0.15	0.074	1.01	1.0	0.4	0.46				
				0.876	0.873	0.357	0.362				
F											
G	Blco	0.053	0.045								
	REPETICION	0.04	0.046								
H											
Fecha 23-24 Febrero		11-12 Marzo de 2010			Dilución Conjugado 1:5000				620nm		
Antígeno Péptido 36895		SNVEQLIYD			Dilución Ac Primario 1:100						

23-24 Febrero de 2010

11-12 Marzo de 2010

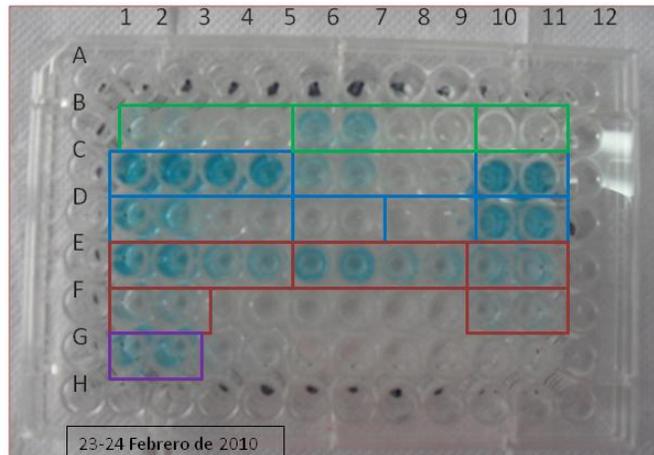
### Anexo 11. Ensayo III. Elisa Sangría Final vs Péptidos – pre-incubando

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Péptido A	55	55	55+A	55+A	75	75	75+A	75+A	Blco	Blco	
		0.25	0.189	0.048	0.05	0.604	0.526	0.048	0.045	0.038	0.044	
C	Péptido B	55	55	55+A	55+A	75	75	75+B	75+B	57	57	
		1.459	1.475	1.357	1.378	0.331	0.318	0.055	0.057	1.471	1.482	
D	Péptido B	62	62	62+B	62+B	Blco	Blco			57+C	57+C	
		0.808	0.241	0.071	0.075	0.051	0.044			1.079	1.164	
E	Péptido C	62	62	62+B	62+B	75	75	75+AB	75+AB	57	57	
		1.056	0.953	0.552	0.58	0.927	0.941	0.448	0.477	0.508	0.489	
F	Péptido C	Blco	Blco							57+C	57+C	
		0.298	0.279							0.285	0.286	
G	Péptido D	80 1:20	80 1:20	Blco	Blco							
		0.898	0.92	0.191	0.127							
H												

Fecha 16-17 Marzo de 2010  
Antígeno 4 Péptidos

Dilución Conjugado 1:5000  
Dilución Ac Primario 1:100

620nm



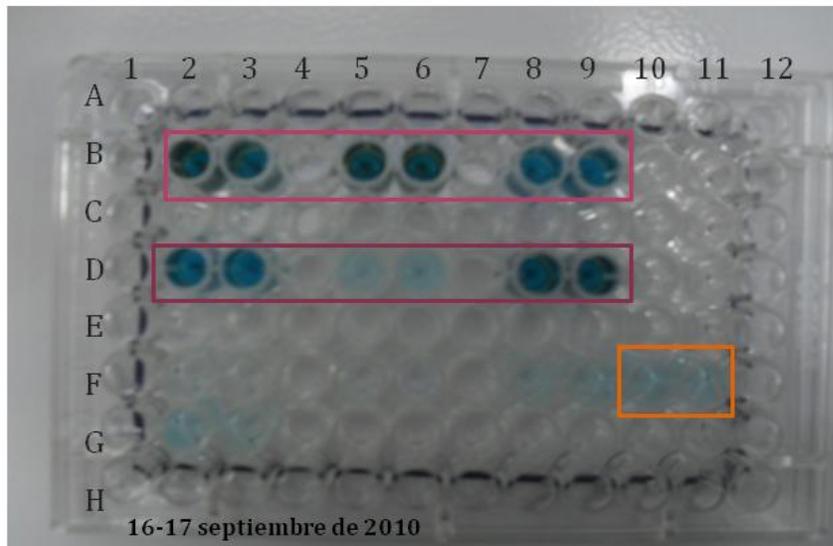
## Anexo 12. Sueros seleccionados

ENSAYO ELISA PÉPTIDOS vs SUEROS DIL 1:10												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	54 - Pep A 1,017	54 - Pep A 0,709		55 - Pep B 0,985	55 - Pep B 0,836			55 - Pep A 0,609	55 - Pep A 0,564			
C												
D	62 - Pep C 0,853	62 - Pep C 0,714		62 - Pep B 0,102	62 - Pep B 0,112			78 - Pep D 0,856	78 - Pep D 0,966			
E												
F									Blco 0,08		Blco 0,071	
G												
H												

Fecha 16-17 Septiembre de 2010  
 Antígeno: Péptidos 10ug/ml  
 Blco: PBS 1X

Dilución Ac Primario ( 2 ) 1:10  
 Dilución Conjugado 1:5000

620nm



### Anexo 13. Absorbancia sueros pacientes y controles

Estadio	Pacientes				Controles			
	54	55	62	78	54	55	62	78
I	0,005	0,108	0,008	0,004	-0,051	0,219	-0,023	-0,046
	-0,001	0,393	0,110	0,029	-0,024	0,019	0,041	-0,024
II A	0,083	0,156	0,013	0,021	-0,056	-0,005	-0,028	-0,006
	0,120	0,124	0,011	0,011	0,031	-0,002	-0,066	-0,020
	0,051	0,083	0,004	0,018	-0,022	0,052	-0,076	-0,031
	0,212	0,132	0,003	0,032	-0,058	0,056	-0,064	-0,033
	0,102	0,075	0,177	0,011	0,019	0,012	-0,042	-0,020
II B	0,017	0,127	0,002	0,029	0,043	-0,003	-0,073	-0,013
	-0,002	0,137	0,014	0,016	-0,010	0,030	-0,028	-0,027
	0,076	0,122	0,000	0,001	-0,036	-0,003	-0,073	-0,034
	0,004	0,505	0,355	0,016	-0,016	-0,003	0,047	-0,024
	0,053	0,165	0,001	0,025	0,036	0,001	-0,023	-0,022
	0,177	0,113	0,004	0,018	-0,035	0,096	-0,065	-0,009
	0,360	0,393	0,112	0,044	0,001	0,219	0,028	0,005
	0,094	0,451	0,023	0,247	0,002	0,003	0,000	-0,007
	0,091	0,092	0,040	-0,007	-0,001	0,032	0,000	-0,010
	0,158	0,345	0,037	0,012	-0,019	0,043	-0,064	-0,012
	0,017	0,320	0,100	0,008	0,006	0,033	-0,024	-0,023
	0,061	0,564	0,150	0,029	-0,073	0,061	-0,011	0,000
III A	0,006	0,107	0,003	-0,001	-0,037	0,296	-0,005	-0,024
	0,078	0,102	0,007	0,010	0,019	0,030	-0,046	-0,008
	0,064	0,132	0,003	0,017	-0,042	0,021	-0,049	0,001
	0,107	0,168	0,020	0,031	-0,028	-0,001	-0,057	-0,009
	0,257	0,149	0,002	0,030	-0,026	0,015	-0,040	-0,032
	0,001	0,441	0,101	0,011	-0,099	0,044	-0,026	-0,039
	0,000	0,469	0,095	0,009	-0,019	0,238	-0,031	-0,010
	0,240	0,173	0,004	0,041	0,127	0,036	-0,069	0,006
	0,163	0,278	0,005	0,007	-0,044	0,040	-0,021	-0,028
	0,066	0,082	0,000	0,027	-0,069	0,139	-0,061	-0,036
	0,124	0,114	0,004	0,074	-0,068	0,170	-0,050	-0,032
	0,178	0,131	0,116	0,024	-0,063	0,217	-0,004	-0,014
	0,025	0,090	0,001	0,001	-0,059	0,049	0,009	0,003
	0,122	0,187	-0,001	0,028	0,016	0,000	0,058	0,003

	0,172	0,074	0,049	0,011	-0,004	0,098	0,005	0,003
	0,065	0,508	-0,001	0,000	0,002	0,098	-0,005	0,004
<b>III B</b>	0,040	0,197	0,038	0,052	0,010	0,086	-0,053	-0,051
	0,066	0,179	0,028	0,030	0,068	0,008	0,030	-0,091
	0,073	0,126	0,000	0,017	-0,019	0,042	0,030	-0,015
	0,152	0,217	0,029	0,001	0,005	-0,040	0,007	-0,039
	0,208	0,010	-0,014	0,008	0,034	0,051	-0,013	0,001
	0,173	0,111	0,003	0,012	0,042	-0,160	-0,056	-0,067
	0,043	0,125	0,001	0,002	-0,028	-0,006	0,041	-0,059
	0,079	0,129	0,037	0,011	0,018	-0,051	-0,030	-0,039
	0,002	0,104	0,206	0,034	0,034	-0,035	-0,006	-0,082
	0,279	0,183	0,049	0,056	0,041	0,083	-0,018	-0,012
	0,450	0,208	0,037	0,056	-0,004	0,051	0,005	0,014
	<b>IV</b>	0,112	0,110	0,001	0,022	0,039	0,070	-0,015
0,210		0,134	0,018	0,042	-0,012	0,028	-0,006	0,007
0,297		0,558	0,035	0,005	0,046	0,121	0,020	0,017
0,001		0,211	0,110	0,029	0,012	0,087	0,004	-0,005
0,173		0,178	0,001	0,006	0,005	0,235	0,000	-0,006

**Anexo 14. Concentración Mamoglobina [ng/ml] suero de pacientes**

<b>Mamoglobina [ng/ml]</b>			
<b>Nº Pareamiento</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>62</b>
<b>1</b>	0.0349	0.1049	0.0437
<b>2</b>	0.0127	0.0606	0.0401
<b>3</b>	0.0146	0.0759	0.0398
<b>4</b>	0.0569	0.0729	0.0428
<b>5</b>	0.0198	0.1651	0.0539
<b>6</b>	0.0115	0.0844	0.0439
<b>7</b>	0.0124	0.0610	0.0419
<b>8</b>	0.0329	0.0570	0.0415
<b>9</b>	0.0230	0.0461	0.0406
<b>10</b>	0.0281	0.1357	0.0495
<b>11</b>	0.0273	0.0798	0.0403
<b>12</b>	0.0320	0.0717	0.0391
<b>13</b>	0.0516	0.0624	0.0393
<b>14</b>	0.0124	5.2085	0.8184
<b>15</b>	0.0235	0.1154	0.0393
<b>16</b>	0.0479	0.1200	0.0462
<b>17</b>	0.1218	0.0645	0.0406
<b>18</b>	0.0308	0.0746	0.0393
<b>19</b>	0.0116	1.4793	0.1003
<b>20</b>	0.1935	0.0802	0.0401
<b>21</b>	0.3508	0.0970	0.0398
<b>22</b>	0.0119	2.5453	0.0929
<b>23</b>	0.0117	3.4623	0.0882
<b>24</b>	0.0452	0.0424	0.1781
<b>25</b>	0.2802	0.1269	0.0405
<b>26</b>	0.1884	0.0820	0.0454
<b>27</b>	0.1005	0.4109	0.0406
<b>28</b>	0.0875	0.2076	0.0499
<b>29</b>	0.1835	0.0204	0.0348
<b>30</b>	1.3609	1.4876	0.1016
<b>31</b>	0.0281	0.0456	0.0391
<b>32</b>	0.1147	0.0634	0.0401
<b>33</b>	0.0600	0.0652	0.0405
<b>34</b>	0.1226	0.0789	0.1056
<b>35</b>	0.0404	2.8466	0.0476
<b>36</b>	0.0207	0.0742	0.0393

<b>37</b>	0.0163	0.0499	0.0393
<b>38</b>	0.0388	0.0513	0.0549
<b>39</b>	0.5915	9.4243	0.0526
<b>40</b>	0.0585	0.1484	0.0389
<b>41</b>	0.1132	0.0419	0.0593
<b>42</b>	0.0331	0.0771	0.0535
<b>43</b>	0.0120	0.0583	0.2274
<b>44</b>	0.0119	0.1942	0.1003
<b>45</b>	0.1155	0.1342	0.0394
<b>46</b>	0.0941	0.8695	0.0535
<b>47</b>	0.0275	5.3863	0.0389
<b>48</b>	0.0147	0.6573	0.0917
<b>49</b>	0.0261	10.0224	0.1407
<b>50</b>	0.4662	0.1419	0.0593
<b>51</b>	4.5045	0.1867	0.0535

**Anexo 15. Concentración Mamoglobina [ng/ml] suero de controles**

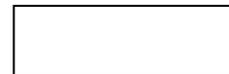
<b>Mamoglobina [ng/ml]</b>			
<b>Pareamiento</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>62</b>
<b>31</b>	0.0060	0.0694	0.0323
<b>2</b>	0.0086	0.0227	0.0556
<b>38</b>	0.0056	0.0174	0.0308
<b>4</b>	0.0175	0.0180	0.0222
<b>25</b>	0.0088	0.0328	0.0204
<b>21</b>	0.0054	0.0343	0.0227
<b>45</b>	0.0150	0.0210	0.0273
<b>1</b>	0.0206	0.0178	0.0210
<b>42</b>	0.0103	0.0255	0.0309
<b>41</b>	0.0073	0.0177	0.0209
<b>46</b>	0.0095	0.0177	0.0582
<b>6</b>	0.0187	0.0184	0.0323
<b>29</b>	0.0074	0.0536	0.0225
<b>18</b>	0.0119	0.0507	0.0495
<b>44</b>	0.0120	0.0189	0.0393
<b>8</b>	0.0116	0.0262	0.0393
<b>13</b>	0.0091	0.0295	0.0227
<b>43</b>	0.0127	0.0265	0.0320
<b>27</b>	0.0045	0.0362	0.0357
<b>47</b>	0.0072	0.0536	0.0375
<b>3</b>	0.0150	0.0255	0.0265
<b>15</b>	0.0068	0.0232	0.0258
<b>14</b>	0.0081	0.0182	0.0241
<b>26</b>	0.0084	0.0217	0.0279
<b>50</b>	0.0032	0.0300	0.0313
<b>5</b>	0.0092	0.0280	0.0300
<b>49</b>	0.0624	0.0273	0.0217
<b>36</b>	0.0066	0.0285	0.0328
<b>22</b>	0.0047	0.0282	0.0233
<b>28</b>	0.0048	0.0399	0.0256
<b>33</b>	0.0051	0.0674	0.0378
<b>16</b>	0.0054	0.0315	0.0422
<b>17</b>	0.0144	0.0183	0.0640
<b>40</b>	0.0111	0.0545	0.0406
<b>12</b>	0.0120	0.0545	0.0376
<b>9</b>	0.0134	0.0477	0.0248
<b>35</b>	0.0288	0.0200	0.0504
<b>24</b>	0.0091	0.0291	0.0506

<b>34</b>	0.0124	0.0118	0.0415
<b>37</b>	0.0183	0.0322	0.0351
<b>39</b>	0.0203	0.0031	0.0243
<b>23</b>	0.0081	0.0171	0.0553
<b>48</b>	0.0149	0.0104	0.0304
<b>20</b>	0.0183	0.0124	0.0370
<b>11</b>	0.0200	0.0461	0.0337
<b>51</b>	0.0112	0.0324	0.0376
<b>19</b>	0.0195	0.0401	0.0345
<b>7</b>	0.0101	0.0249	0.0371
<b>30</b>	0.0215	0.0230	0.0462
<b>32</b>	0.0136	0.0482	0.0406
<b>10</b>	0.0124	0.0271	0.0391

## Anexo 16. Consentimiento informado



COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL OBJETO DE REALIZAR UN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el instituto de Ciencias Básicas laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario con la participación de:

**Sandra Ramírez Clavijo, Milena Galvis.**

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.
- d) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la universidad del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los Resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos y permanecerán en el anonimato.
- e) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Dras. Sandra Ramírez y Milena Galvis. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Tel (57-1) 3474570 (Ext 270, 241, 503)

Dr. Alberto Velez Van Meerbeke. Presidente Comité de Ética. Tel (57-1) 3474570 (Ext 236)



COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



### **EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO**

**OBJETIVO:** El cáncer de seno es la tercera causa de muerte por cáncer en nuestro país y aproximadamente el 60% de los cánceres de seno diagnosticados corresponden a estadios tardíos, en donde la mortalidad es mucho más alta. Este estudio busca detectar y cuantificar la concentración de la proteína mamoglobina en suero de pacientes con cáncer de seno y compararla con la expresión de la misma en personas sin ningún tipo de cáncer. Las muestras de suero serán analizadas por técnica inmunoenzimática (ELISA) y estarán incluidas dentro del proyecto de investigación “ **EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS CON CÁNCER DE SENO EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA** ”. Los conocimientos generados podrán servir para desarrollar una estrategia diagnóstica que permita un manejo temprano y oportuno del cáncer de seno.

**PROCEDIMIENTO:** Se realizará una entrevista clínica con usted y se tomará una muestra de aproximadamente 10 ml de sangre mediante punción en vena periférica. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio de Biología Celular y Molecular.

**RIESGOS E INCOMODIDADES:** La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y los efectos adversos estarán representados por molestias como hematomas, enrojecimiento y/o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se realice la punción venosa. Adicionalmente, están contempladas las molestias post-quirúrgicas generadas por la remoción del tejido por parte del cirujano, las cuales serán de manera transitoria.

**RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES:** Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

- a) **El riesgo existente en una toma de muestra de sangre periférica es muy bajo, por lo tanto no reviste riesgo para su salud.**
- b) **Es su responsabilidad seguir las indicaciones y tratamientos de su médico tratante.**

**MANEJO DE RESULTADOS:** Los resultados que se obtengan de la investigación sólo tendrán sentido si son tomados en forma conjunta y no tendrán validez en forma individual. Sin embargo, una vez finalizado el estudio, los resultados serán entregados directamente al médico tratante para que él le informe a usted en el momento de la consulta.



COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**AUTORIZACION:** La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

**Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio.** Si  No

**Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio , en las situaciones señaladas a continuación:** Si  No

- a) En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, enviando la muestra al exterior a el(los) laboratorio(s) de el(los) instituto(s) antes mencionado(s). Si  No
- b) En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia. Si  No
- c) En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación. Si  No
- d) En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación. Si  No
- e) En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación. Si  No

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:**  
"EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS CON CÁNCER DE SENO EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA "

Habiendo sido enterada(o) del contenido del presente estudio, informada(o) que no tendré ningún beneficio directo en el mismo y que se han resuelto todas mis dudas acerca de la investigación Yo, \_\_\_\_\_ con documento de identificación número: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre, con el fin de realizar el análisis de biomarcadores asociados con cáncer de seno. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: 153 \_\_\_\_\_



COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



\_\_\_\_\_

Firma Paciente o Acudiente / Representante legal

Nombre \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Parentesco \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

CC. \_\_\_\_\_

Testigo 1

Nombre \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Parentesco \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

CC. \_\_\_\_\_

Testigo 2

\_\_\_\_\_

Investigador

## Anexo 17. Hoja de Registro

### EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS CON CÁNCER DE SENO EN UNA POBLACIÓN COLOMBIANA

Nº \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_ Apellidos \_\_\_\_\_  
Sexo: Masculino \_\_\_\_\_ Femenino \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_ Estrato 1 2 3 4 5 6  
Teléfono: \_\_\_\_\_

#### 1- Datos Sociodemográficos

- 1.1 Fecha de nacimiento (D/M/A) \_\_\_\_\_ Municipio \_\_\_\_\_  
Dpto. \_\_\_\_\_  
¿Cuál es su edad, años cumplidos? \_\_\_\_\_
- 1.2 Ciudad de origen de su padre \_\_\_\_\_ Dpto. \_\_\_\_\_  
1.3 Ciudad de origen de su madre \_\_\_\_\_ Dpto. \_\_\_\_\_  
1.4 ¿Ciudad en la que reside actualmente? \_\_\_\_\_ Dpto. \_\_\_\_\_  
1.5 ¿Estado civil actual? Soltero/a(1) \_\_\_ Casado/a(2) \_\_\_ Unión Libre(3) \_\_\_ Viudo/a(4) \_\_\_  
1.6 ¿Cuál es su nivel educativo?  
Primaria(1) \_\_\_ Secundaria(2) \_\_\_ Técnico(3) \_\_\_ Universitario(4) \_\_\_ Postgrado(5) \_\_\_  
1.7 ¿Principal ocupación en los últimos cinco años? \_\_\_\_\_  
1.8 ¿A que régimen se encuentra afiliado?  
Contributivo(1) \_\_\_ Subsidiado(2) \_\_\_ Vinculado(3) \_\_\_ Particular(4) \_\_\_  
1.9 EPS: \_\_\_\_\_  
1.10 ¿Peso actual?(Kg.) \_\_\_\_\_  
1.11 Estatura (Mts.): \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_  
1.12 Copa y Talla de Brasier \_\_\_\_\_

#### 2- Antecedentes Clínicos:

- 2.1 ¿Principales enfermedades que ha sufrido?  
\_\_\_\_\_
- 2.2 ¿Consumo algún tipo de droga actualmente? SI(1) \_\_\_ NO(2) \_\_\_  
¿Cuál? \_\_\_\_\_
- 2.3 ¿Presenta algún tipo de reacción alérgica? \_\_\_\_\_
- 2.4 Antecedentes Gineco-obstétricos:  
a. ¿Edad a la que presentó su primera menstruación? \_\_\_\_\_  
b. Número de Gestaciones (1) \_\_\_\_, Partos (2) \_\_\_\_, Abortos (3) \_\_\_  
c. ¿Edad del primer embarazo? \_\_\_\_\_  
d. ¿Utilizo o utiliza algún método anticonceptivo? SI(1) \_\_\_ NO(2) \_\_\_  
e. ¿Método utilizado para planificar? DIU(1) \_\_\_ Anticonceptivos Hormonales(2) \_\_\_  
f. ¿Tiempo de uso?(Meses) \_\_\_\_\_  
g. ¿Uso de terapia Hormonal? SI (1) \_\_\_ NO(2) \_\_\_ Cual? \_\_\_\_\_  
¿Tiempo de uso? \_\_\_\_\_  
h. ¿Cuál fue la fecha de su última menstruación? \_\_\_\_\_

### 3. Antecedentes de Hábitos

3.1 ¿Fuma? SI (1) \_\_\_\_ NO(2)\_\_\_\_  
Nunca\_\_\_\_ A veces\_\_\_\_ Siempre\_\_\_\_

3.2 ¿Consume carnes ahumadas o asadas? SI (1) \_\_\_\_ NO (2)\_\_\_\_  
1 vez por semana\_\_\_\_menos de 1 vez a la semana\_\_\_\_menos de 1 vez al mes\_\_\_\_

3.3 ¿Consume Enlatados? SI (1) \_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_  
1 vez por semana\_\_\_\_menos de 1 vez a la semana\_\_\_\_menos de 1 vez al mes\_\_\_\_

3.4 ¿Consume Café? SI (1) \_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_  
1 vez al día\_\_\_\_ mas de 1 vez al día\_\_\_\_

3.5 ¿Consume Embutidos? SI (1) \_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_  
1 vez por semana\_\_\_\_menos de 1 vez a la semana\_\_\_\_menos de 1 vez al mes\_\_\_\_

3.6 ¿Ingiere Alcohol? SI (1) \_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_  
Nunca\_\_\_\_ a veces\_\_\_\_ Siempre\_\_\_\_

### 4- Antecedentes Familiares de Cáncer:

4.1. ¿Alguno de sus familiares, en primer o segundo grado, sufre o ha sufrido de cáncer?  
SI (1) \_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_

4.2. ¿Qué tipo de Cáncer?  
Seno (1) \_\_\_\_ Cuello Uterino (2) \_\_\_\_ Gástrico (3) \_\_\_\_ Piel (4) \_\_\_\_ Otro: SI\_\_\_\_ NO\_\_\_\_  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

### 5- Historia de la Enfermedad (Cáncer de Seno):

4.1. ¿Fecha de Diagnostico? (D/M/A) \_\_\_\_\_

4.2. ¿Tipo de Cáncer de Seno?

Carcinoma lobular in situ (1) \_\_\_\_Carcinoma ductal in situ (2) \_\_\_\_ Carcinoma lobular  
invasivo (3)\_\_\_\_Carcinoma ductal invasivo (4) \_\_\_\_

4.3. Progestágenos \_\_\_\_\_

4.4. Estrógenos \_\_\_\_\_

4.5. Erb2 \_\_\_\_\_

## Anexo 18. Alineamiento secuencias de Secretoglobinas humanas y uteroglobina de conejo.

Con el fin de conocer si existe homología entre estas y los péptidos sintetizados en el presente proyecto, al igual que los péptidos usados por Jaramillo y cols en 2004 y Basha y cols en 2010

SCGB1A1	MKLAVTLTLVTLALCCSSASAEICPSFQRVLETLL--MDTPSSYEAMELFS	PDQDMREAG	59	
SCGB1A1Ocuniculus	MKLAI TLALVT LAL LCS PASAGI C PRFAHVIENLL--LGTPSSYETSLKEFE	PDDTMKDAG	59	
SCGB1D2	MKLSVCLLLVTLALCCYQANAEC PALVSELLDEF--FISEPLFKLSLAKFD	APPEAVAAK	59	
SCGB1D4	MRLSVCLLMVSLALCCYQAHALVCPAVASEITVEL--FLSDAAVNLQVAKLN	PPPEALAAK	59	
SCGB1D1	MRLSVCLLLLTALCCYRANAVVCQALGSEITGEL--LAGKPVFKFQLAKFK	APLEAVAAK	59	
SCGB2A2	MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSG--CPLEENVISKTI	INPQVSKTEYKELLQEFI	DDNATTNAI	59
M7.7Bash	-----	NPQVSKTEY	9	
M2.7Jaram	-----	TINPQVSKT	9	
M2.5Jaram	-----	-----	-----	
M7.5Bash	-----	-----	-----	
SCGB2A2Isof	MKLLMVLMLAALSQHCHYAGSG--CPLEENVISKTI	INPQVSKTEYKELLQEFI	DDNATTNAI	59
SCGB2A1	MKLLMVLMLAALLHCHYADSG--CKLLEDMVEKTI	NSDISIPEYKELLQEFI	SDAAAAM	59
	*:* : * : : * * . . : : : : *			
SCGB1A1	AQLKKLVDTLPOKPRESI IKLMEKIAQSSLCN----	91		
SCGB1A1Ocuniculus	MQMKKVLDSL P-----	70		
SCGB1D2	LGVKRCTDQMSLQKRSLIAEVLVKILKKS SV-----	90		
SCGB1D4	LEVKHCTDQISFKKRLSLKKS S W W K-----	83		
SCGB1D1	MEVKKCVDTMAYEKRVLTIKTLGKIAEKCDR-----	90		
SCGB2A2	DELKECFLNQTDETLSNVEVFMQLIYDSSLCDLF--	93		
M7.7Bash	-----	-----		
M2.7Jaram	-----	-----		
M2.5Jaram	-----	-----		
M7.5Bash	-----	-----		
SCGB2A2Isof	DELKECFLNQTDETLSNVE----OLIYDSSLCDLF--	90		
SCGB2A1	GKFKQCFLNQHRTLI N FGLMMHTVYDSIWCNMKSN	95		
	:*			

El recuadro morado muestra la región que comprende el péptido A, el verde la del péptido B y el naranja el péptido C.