



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA**

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIO DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

TESIS

***COMPARACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR
ESTROGÉNICO BETA EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CÁNCER
COLORECTAL Y BIOPSIAS DE COLON SIN PATOLOGÍA
NEOPLÁSICA***

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

Presenta

Diego Acevedo Cantorán

Directores:

M. en C. Cheryl Zilahy Díaz Barrientos

D. en C. Verónica Vallejo Ruiz

D. en C. María Alicia Díaz y Orea †

Puebla, Pue.

Enero 2022

DIRECTORAS DE TESIS

M. en C. CHERYL ZILAHY DIAZ BARRIENTOS

D.EN C. VERÓNICA VALLEJO RUIZ

MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS E INVESTIGACION

COMITÉ REVISOR DE TESIS

M. EN C. MÓNICA HEREDIA MONTAÑO

DR. ROGELIO GONZÁLEZ LÓPEZ

D. EN C. TERESITA ROMERO OGAWA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. CVU 652579 permitiéndome dedicarme de tiempo completo a la realización de mis estudios.

Al Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), al cuerpo académico de la maestría en Ciencias Médicas e Investigación. Por su compromiso con la enseñanza y disposición para mi formación académica, al Hospital Universitario de Puebla (HUP) por permitirme desarrollar mi protocolo en sus instalaciones al igual que al Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR).

A mis directoras de Tesis, Dra. Cheryl Z. Diaz Barrientos, D.C. Verónica Vallejo Ruiz, por sus enseñanzas, paciencia, apoyo y consejos para la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité tutorial, MC. Mónica Heredia Montaña, D.C. Teresita Romero Ogawa, Dr. Rogelio González López, por el tiempo y disposición otorgados para la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi maestra y amiga la Dra. María Alicia Díaz y Orea t, a mi familia, a mi novia y mi familia por su comprensión, apoyo y amor, en este largo camino para realizar este proyecto en mi vida.

RESUMEN

Antecedentes generales: El cáncer de colon es una de las neoplasias con mayor incidencia y la segunda causa de muerte por enfermedades oncológicas en México. Debido a que su diagnóstico se realiza en estadios avanzados, las investigaciones se han enfocado a la búsqueda de métodos que permitan identificar la enfermedad en etapas iniciales, así como buscar tratamientos más efectivos que mejoren el pronóstico de vida.

Los estudios sobre el receptor estrogénico beta sustentan un probable papel protector contra el cáncer colorectal, sin embargo, se requieren más estudios que muestren su papel en la protección contra el desarrollo de cáncer de colon. Adicionalmente, existen reportes que muestran una disminución en la expresión del receptor estrogénico beta en pacientes con cáncer de colon, por lo que nos interesa evaluarlo en población mexicana con cáncer de colon con la finalidad de profundizar en su estudio.

El cáncer de colon es una de las neoplasias con mayor incidencia y la segunda causa de muerte por enfermedades oncológicas en México. Debido a que su diagnóstico se realiza en estadios avanzados, las investigaciones se han enfocado a la búsqueda de métodos que permitan identificar la enfermedad en etapas iniciales, así como buscar tratamientos más efectivos que mejoren el pronóstico de vida.

Los estudios sobre el receptor estrogénico beta sustentan un probable papel protector contra el cáncer colorectal, sin embargo, se requieren más estudios que muestren su papel en la protección contra el desarrollo de cáncer de colon. Adicionalmente, existen reportes que muestran una disminución en la expresión del receptor estrogénico beta en pacientes con cáncer de colon, por lo que nos interesa evaluarlo en población mexicana con cáncer de colon con la finalidad de profundizar en su estudio.

Objetivo: comparar el nivel de expresión del receptor estrogénico beta en biopsias de pacientes con cáncer colorectal y sin patología neoplásica.

Material y métodos: Se realizó un estudio comparativo, observacional, transversal, ambielectivo y homodémico en biopsias de pacientes con diagnóstico de cáncer colorectal y biopsias de tejido sin patología neoplásica.

Resultados: Se obtuvieron 10 biopsias de pacientes con cáncer colorectal y 16 biopsias sin patología neoplásica, Encontrando en el grupo con cáncer menor nivel de expresión comparado con el grupo sin patología neoplásica.

Conclusiones: las muestras con cáncer mostraron un cambio de localización celular del receptor estrogénico beta, observándose preferentemente en citoplasma a diferencia de las muestras sin alteración neoplásica en las que se observa en el núcleo, este cambio de localización fue estadísticamente significativo.

Palabras clave: Cáncer colorectal, receptor estrogénico beta, biopsias de colon, nivel de expresión, sitio de expresión.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.....	1
1. Antecedentes generales	1
1.1 Cáncer colorrectal.....	1
1.2 Factores de riesgo	2
1.3 Carcinogénesis	3
1.4 Respuesta inmunológica contra el Cáncer Colorectal	5
1.5 Diagnóstico.....	7
2. Antecedentes específicos	10
2.1 Receptores estrogénicos	10
2.2 RE β como abordaje terapéutico.....	12
CAPÍTULO 2.....	15
3. Planteamiento del problema	15
4. Hipótesis Científica	16
5. Justificación	16
6. Objetivos	17
6.1 Objetivo general.....	17
6.2 Objetivos particulares	17
7. Metodología.....	18
7.1 Diseño del estudio	18
7.2 Ubicación espacio-tiempo	18
7.3 Marco muestral	18
7.4 Criterios de selección de la muestra	19
7.5 Definición de las variables y escalas de medición (Anexo 1)	20
7.6 Técnicas y procedimientos.....	20
7.7 Análisis de datos.....	27
8. Resultados.....	28

8.1 Características de la muestra estudiada	28
8.2 Edad.....	28
8.3 Sexo.....	29
8.4 Diagnóstico.....	30
8.5 Estadio del CCR (TNM)	31
8.6 Nivel de expresión del REB	31
8.7 Diferencia en la localización de la expresión del REB.....	36
9. Discusión	41
10. Conclusiones	45
CAPÍTULO 3.....	46
11. Sesgos y limitaciones	46
12. Fortalezas	46
13.1 Beneficios	47
14. BIBLIOGRAFÍA.....	48
15. Anexos.....	53
15.1 Anexo 1	53
12.2 Anexo 2.	54

Lista de cuadros

Tabla 1. Edad	Página 29
Tabla 2. Sexo	Página 30
Tabla 3. Diagnósticos grupo control	Página 30
Tabla 4. Estadio de la enfermedad (TNM)	Página 31
Tabla 5. Número de pacientes y nivel de expresión del REB	Página 35
Tabla 6. Nivel de expresión del REB por grupos	Página 36
Tabla 7. Localización del REB por grupos	Página 40

Lista de figuras

Figura 1. Modelo de carcinogénesis	Página 4
Figura 2. Respuesta inmune al cáncer	Página 6
Figura 3. Diagrama de flujo	Página 26
Figura 4. Nivel de expresión bajo del REβ	Página 32
Figura 5. Nivel de expresión medio del REβ	Página 33
Figura 6. Nivel de expresión alto del REβ	Página 34
Figura 7. Localización nuclear del REβ	Página 37
Figura 8. Localización ambos del REβ	Página 38
Figura 9. Localización Citoplasma del REβ	Página 39

Cuadro de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CCR	Cáncer colorectal
CCRe	Cáncer colorectal esporádico
CCRh	Cáncer colorectal hereditario
CCRhNAP	Cáncer colorectal hereditario no asociado a pólipos
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
NK	Natural killer
CEA	Antígeno carcinoembrionario
RE	Receptor estrogénico
REα	Receptor estrogénico alfa
REβ	Receptor estrogénico beta
OR	Razón de momios
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
CIBIOR	Centro de Investigación Biomédica de Oriente
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
HUP	Hospital Universitario de Puebla

CAPÍTULO 1

1. Antecedentes generales

1.1 Cáncer colorrectal

A nivel mundial, el cáncer colorrectal (CCR) representa la tercera neoplasia con mayor frecuencia en hombres por detrás de los tumores de próstata y pulmón. En mujeres ocupa el segundo lugar por detrás del cáncer de mama (1), (2). El riesgo de desarrollar CCR por la predisposición genética y por factores ambientales, se encuentra ligado a la edad, ya que más del 90% de los CCR esporádicos ocurren en personas mayores de 50 años. Aproximadamente el 5% de todos los CCR se deben a mutaciones genéticas heredadas mientras que del 95% restante de los casos, un porcentaje del 20% tiene una historia familiar positiva. El CCR evoluciona a través de la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, las que conducen a la transformación de la mucosa colónica normal en cáncer invasivo. (3)

El CCR es la neoplasia de mayor frecuencia en vías digestivas, se presenta en dos escenarios: el esporádico y el genético. El esporádico oscila entre el 80% y 90% de los casos. Al parecer, sigue en la secuencia el adenocarcinoma asociado a factores ambientales y estilos de vida. En el escenario genético, los individuos presentan mayor riesgo, definido por presentar antecedentes familiares como la presencia de enfermedades polipósicas y no polipósicas del colon y la enfermedad inflamatoria intestinal. (4)

Aproximadamente un 20-30% de los CCR presentan algún tipo de componente hereditario. Se estima que un 5% aparecen dentro de síndromes hereditarios definidos, que son secundarios a uno o varios defectos genéticos bien caracterizados. Los más prevalentes son el síndrome de Lynch, la poliposis adenomatosa familiar (PAF), la poliposis asociada a mutaciones en el gen MUTYH

y otros síndromes polipósicos menos frecuentes. En el 20-25% restante de casos con componente familiar el defecto genético heredado responsable no se ha logrado identificar con precisión. (2)

1.2 Factores de riesgo

La edad, los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo del CCR. Los síndromes de CCR hereditario incluyen el síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis), PAF, poliposis asociada a MUTYH. El síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar contribuyen a la gran mayoría del síndrome de CCR hereditario. La presencia de antecedentes familiares de cáncer de colon en parientes de primer grado, incluso en ausencia de los síndromes de cáncer de colon hereditario anteriores, aumenta el riesgo de desarrollo de CCR en aproximadamente el 20% de los casos. El riesgo aumenta más del doble, en comparación con la población general, con antecedentes de CCR en familiares de primer grado. Otras asociaciones conocidas con el CCR incluyen: etnia afroamericana, el sexo masculino, la enfermedad inflamatoria intestinal: colitis ulcerosa con más frecuencia que la enfermedad de Crohn, obesidad, estilo de vida sedentario, consumo de carne roja y carne procesada, consumo de tabaco, consumo de alcohol, antecedentes de radiación abdominal, acromegalia, trasplante renal con uso de medicamentos inmunosupresores. Así mismo, la diabetes mellitus y la resistencia a la insulina, la terapia de privación de andrógenos, colecistectomía, enfermedad de las arterias coronarias y anastomosis ureterocólica. (5)

Estudios epidemiológicos observacionales que se han realizado en humanos han demostrado con evidencia que la dieta excesivamente calórica, excesiva en grasas de proteínas de origen animal y de carnes rojas se correlaciona con un incremento del riesgo de aparición de CCR. La dieta rica en grasas saturadas estimula la secreción de ácidos biliares, los cuales podrían desempeñar un papel

promotor en el desarrollo de CCR, provocando daño en la membrana intracelular, mitocondrial o, por efecto genotóxico directo. (6)

Por otra parte, la dieta rica en fruta, fibra, vegetales, ácido fólico, vitamina B6, calcio, vitamina D, magnesio, ajo y pescado es uno de los factores protectores de cáncer de colon. Muchos estudios epidemiológicos han relacionado estos factores ambientales con una menor incidencia de esta enfermedad. (7)

Respecto al consumo de fibra, el efecto beneficioso podría deberse a que diluye carcinógenos presentes en el colon, con el efecto de inactivar promotores carcinogénicos, acelerando el tránsito intestinal, disminuye el tiempo de contacto de los mismos con la mucosa colónica. (6)

1.3 Carcinogénesis

El primer modelo de carcinogénesis colorrectal fue propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990. Este modelo se basa en la acumulación progresiva de mutaciones genéticas tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores que conducen a la transformación de la mucosa normal hacia adenoma y, luego, hacia carcinoma. (3) figura 1. Modelo de la carcinogénesis Fearon y Volgelstei.

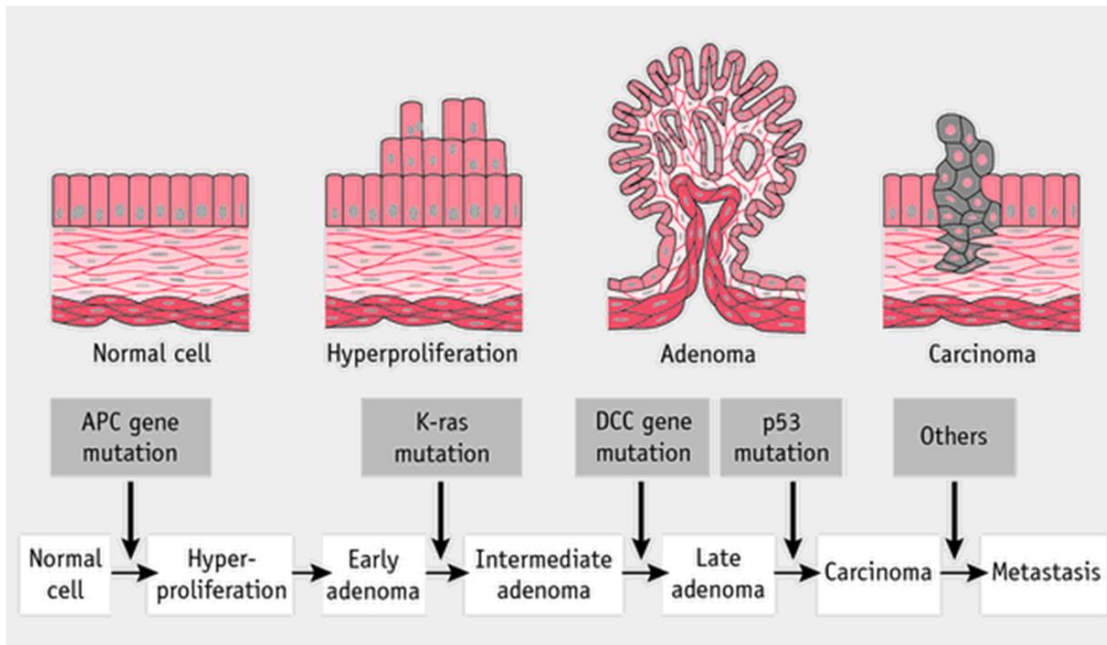


Figura 1. Progresión de adenoma a carcinoma explicada por la secuencia clásica adenoma- carcinoma desarrollado por Fearon y Vogelstein.

Los CCR pueden surgir de uno o una combinación de tres mecanismos diferente: inestabilidad cromosómica (chromosome instability o CIN), fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) e inestabilidad de microsatélites (MSI). Según Fearon, la vía clásica de CIN comienza con la adquisición de mutaciones en la poliposis adenomatosa coli (APC), seguida de la activación mutacional del oncogén KRAS y la inactivación del gen supresor de tumores, TP53. La aneuploidía y la pérdida de heterocigosidad (LOH) son los principales actores en los tumores CIN, que no solo constituyen la mayoría de los tumores esporádicos (85%) sino que también involucran casos de poliposis adenomatosa familiar, asociados con mutaciones de la línea germinal en el gen APC. (8)

El gen APC es un regulador negativo clave de la β -catenina, un componente de la vía de señalización WNT. (9) La mutación a nivel del gen APC implica una disminución de la proteína APC que permite el acúmulo de β -catenina, exceso molecular que al unirse a los factores de transcripción de las células T permite la

activación de la transcripción genética a través de la vía WNT, señal de transducción implicada en la homeostasis epitelial. Por lo tanto, la mutación del gen APC conlleva un incremento de la β -catenina a nivel de las criptas de la mucosa del colon, lo que provoca la hiperproliferación del epitelio del colon que favorece la aparición de fenómenos displásicos. (10)

1.4 Respuesta inmunológica contra el Cáncer Colorectal

Los antígenos tumorales pueden presentarse por complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II en la superficie de las células tumorales y también por las células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas (DC) que las capturan, las procesan y las presentan a las células T. Múltiples mecanismos efectores inmunes participan en el reconocimiento de células anormales. Las células asesinas naturales (NK), que forman parte de la inmunidad innata, reconocen y eliminan las células tumorales nacientes, un proceso en el que también contribuyen los macrófagos y neutrófilos. Como parte de la respuesta inmune adaptativa activada, los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ que pueden destruir las células neoplásicas, se consideran las principales células efectoras antitumorales. Este proceso es regulado por células T CD4+ auxiliares (TH) con distintos perfiles de citocinas que promueven la respuesta inmune, o células T reguladoras (Tregs) que pueden suprimir la respuesta inmune. La respuesta inmune adaptativa también incluye respuestas humorales, en las que los antígenos tumorales solubles son reconocidos por células B específicas y con la ayuda de células TH CD4+, maduran y producen anticuerpos específicos de antígeno tumoral. A diferencia de la inmunidad innata, que es inespecífica y de corta duración, la respuesta adaptativa es específica y tiene memoria a largo plazo. Los componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa, incluidos tipos de células particulares, moléculas efectoras y vías colectivamente suprimen el crecimiento tumoral. (11)

En la actualidad se ha estudiado al cáncer como una enfermedad sistémica, tomando en cuenta el enfoque de la célula tumoral como un hospedero y el microambiente que desarrolla y da crecimiento al tumor, los tumores malignos tienen la capacidad de eludir la respuesta inmune a través de su microambiente, el cual presenta una respuesta inflamatoria con la finalidad de eliminar las células tumorales y aprovechar este estado inflamatorio crónico para promover su crecimiento y prevenir su eliminación (Figura 2). (12)

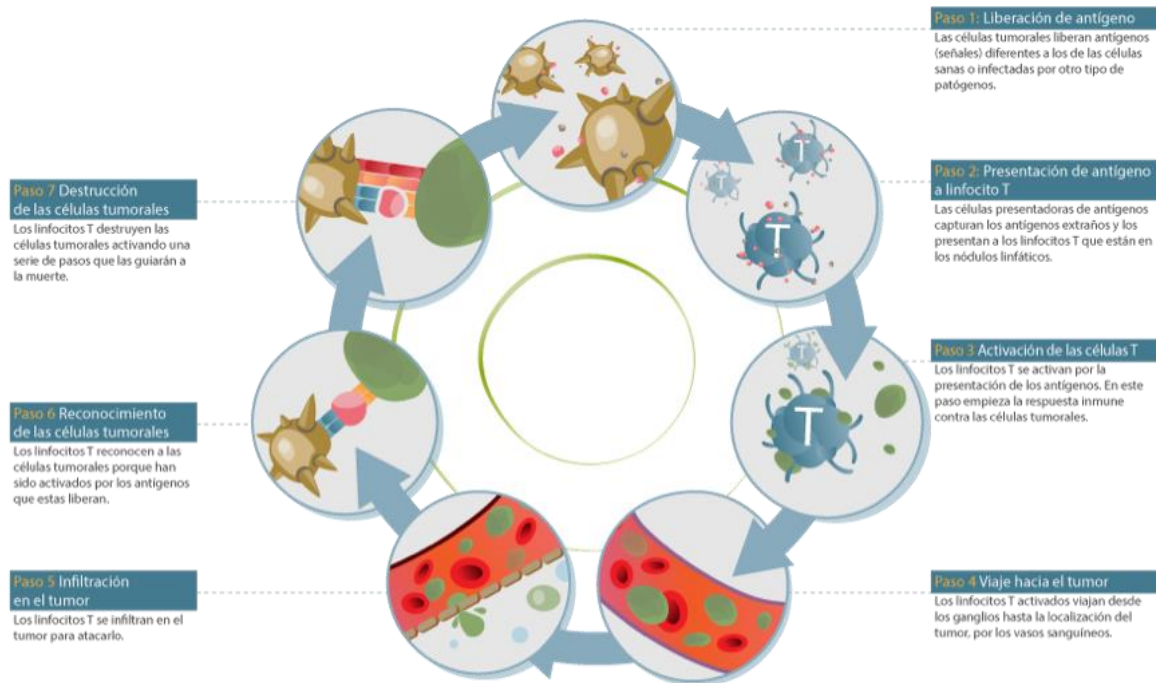


Figura 2. Etapas de la liberación de autoantígenos como respuesta inmunológica contra el cáncer.

El proceso de transformación oncogénica produce antígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Hay dos tipos de antígenos tumorales: autoantígenos, compartidos por el tumor y células normales, pero sobre expresados o anormalmente modificados (o procesados) en células tumorales, y neoantígenos mutados que son exclusivos de tumores individuales. Los neoantígenos son típicamente generados por mutaciones, que incluyen las de controladores

oncogénicos como KRAS, TP53, BRAF y PIK3CA, pero en su mayoría son aleatorios sin un papel funcional aparente en la tumorigénesis.(11)

1.5 Diagnóstico

El CCR puede cursar de forma asintomática durante gran parte de su historia natural. Es cuando el momento en que se presenta la sintomatología la cual es muy variable y depende en gran medida de la localización del tumor. En el colon derecho las heces suelen tener una consistencia líquida o semisólida, lo que unido a la mayor distensibilidad y diámetro del colon derecho favorece que el CCR pueda alcanzar un gran tamaño antes de producir síntomas obstructivos o cambios en el hábito deposicional. Estas lesiones suelen ulcerarse y producir un sangrado crónico e insidioso que no suele modificar el aspecto de las heces. Los síntomas más frecuentes suelen ser molestias abdominales inespecíficas, síndrome anémico o sensación de masa abdominal. (2)

En general los programas de tamizaje para la prevención o detección oportuna de alguna neoplasia maligna inician estableciendo una población blanco de acuerdo con los factores de riesgo inherentes a dicha población. Para establecer el riesgo sobre alguna neoplasia maligna se deben considerar factores ambientales, genéticos, clínicos y de estilo de vida. (13)

Los pacientes que pueden desarrollar CCR se podrían clasificar en dos tipos Los pacientes de riesgo promedio y los pacientes de riesgo elevado o riesgo alto. El Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (NCI), define con riesgo promedio a aquellos pacientes mayores de 50 años sin afecciones como Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF), Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP) o antecedentes familiares positivos de neoplasia colorrectal (adenoma o CCR). (13)

De la misma manera el NCI y la Asociación Americana de Cirujanos Colorrectales (ASCRS), establece que los pacientes con riesgo elevado para CCR con base a historia familiar son aquellos que cumplen con alguno de los dos siguientes criterios:

1. Si hay antecedentes de cáncer colorrectal o pólipos adenomatosos en un pariente de primer grado antes de los 60 años, o en dos o más parientes de primer grado a cualquier edad (síndrome no hereditario), el examen debe comenzar a los 40 o 10 años previos al caso más joven, lo que ocurra primero. Una colonoscopia es la prueba recomendada en este caso, con exámenes de detección cada 5 años.

2. Si hay antecedentes de cáncer colorrectal o pólipos adenomatosos en un pariente de primer grado de 60 años o más, o en al menos dos o más parientes de segundo grado a cualquier edad, entonces el examen debe comenzar a la edad de 40 años. Para estos pacientes se recomienda cualquiera de las opciones de detección oportuna para individuos de riesgo promedio junto con los mismos intervalos de detección.

De la igual forma encontramos descritos a los pacientes con alto riesgo para CCR con base a antecedentes genéticos y que cumplan con los siguientes:

1. Si hay pruebas genéticas positivas para la PAF o sospecha de PAF sin pruebas, entonces el examen debe comenzar a la edad de 10 a 12 años. El examen debe incluir una sigmoidoscopia flexible anual y consideración para las pruebas genéticas si aún no se han realizado. Se recomienda valorar la colectomía cuando la prueba es positiva.

2. Si existe un diagnóstico genético o clínico de Síndrome de Lynch (SL) o una persona con riesgo aumentado de SL, la evaluación debe comenzar entre los 20 y los 25 años o 10 años antes del caso más joven. Esto debe incluir la colonoscopia cada 1 a 2 años y las pruebas genéticas si aún no se han realizado. Además, se deben ofrecer pruebas genéticas a todos los familiares de primer grado si se identifica una mutación asociada a SL.

3. Las personas con enfermedad inflamatoria intestinal [Colitis Ulcerativa Crónica (CUCI) o Enfermedad de Crohn (EC)] deben comenzar la detección 8 años después de la aparición de pancolitis o de 12 a 15 años después de la aparición de colitis izquierda. El examen debe realizarse mediante colonoscopia cada 1 a 2 años, con biopsias que evalúen el grado de displasia de las lesiones.

No existe un consenso categórico sobre la técnica preferida de tamizaje para neoplasias y CCR porque ninguna de las pruebas utilizadas es completamente idónea para todos los grupos de riesgo. La elección de la prueba depende en muchos casos de la eficiencia y desempeño de la prueba además del nivel de recursos del lugar donde se establezca el programa. Sin duda la colonoscopia es el estándar de oro, sin embargo, la recomendación general para un programa de tamizaje sería someter a la población a un proceso rápido, usando una prueba de sangre oculta en heces (preferentemente FIT) y seleccionar a los individuos que obtengan un resultado positivo para una colonoscopia. Independientemente de la técnica utilizada, un programa organizado de tamizaje debe asegurar la calidad de desempeño y garantizar su alcance a proporciones altas de la población. (13)

2. Antecedentes específicos

2.1 Receptores estrogénicos

Los estrógenos son hormonas que influyen el crecimiento, diferenciación y función de los órganos del sistema reproductor como la mama, útero, y ovarios, pero que también tienen un efecto en tejidos como el sistema cardiovascular, óseo y nervioso. (14)

Los estrógenos cumplen una función vital en la fisiología reproductiva tanto femenina como masculina estimulando el crecimiento y diferenciación celular en tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata. (14)

El receptor de estrógenos (RE) es una proteína perteneciente a la super familia de receptores nucleares, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas, el receptor de la vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos. En 1958, Elwood Jensen descubrió el RE al demostrar que los tejidos reproductivos femeninos eran capaces de absorber estrógeno de la circulación al unirse a proteínas. Desarrolló un modelo para explicar cómo el estradiol lleva a cabo su acción a nivel del núcleo al unirse a un receptor específico, el receptor de estrógenos. Más de 20 años después, se clonó el primer receptor de estrógeno humano (conocido hoy como RE α) utilizando ARN de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano. De manera similar, el segundo receptor de estrógeno denominado como receptor estrogénico beta (RE β) fue descrito diez años más tarde por el equipo de investigación dirigido por el Dr. Jan-Ake Gustafsson. El laboratorio de Gustafsson descubrió que una proteína que se expresaba principalmente en las células epiteliales secretoras de la próstata y en las células de la granulosa del ovario, compartía un alto grado de homología con el RE α (dominio de unión al ADN, 95%; unión a ligando dominio, 55%). Como resultado de estas similitudes, el equipo sugirió que la proteína se llamara RE β . (14)

El tamaño de longitud completa de RE α es de 595 aminoácidos y 67 kDa. RE β tiene 530 aminoácidos de longitud y 59 kDa. La principal diferencia entre las dos proteínas es que RE β tiene un dominio amino terminal más corto que RE α . Como

miembros de la superfamilia de reguladores de la transcripción de receptores de hormonas nucleares, las estructuras de los receptores de estrógeno RE α y RE β están compuestas de varios dominios funcionales y tienen varias regiones estructurales en común. En los seres humanos, el RE α está codificado por el gen *ESR1*, ubicado en el cromosoma 6, locus 6q25.1. Además de la isoforma RE α de longitud completa (66 kDa), se han identificado varias isoformas más cortas (36 kDa, 46 kDa) como resultado de la presencia de codones de inicio alternativos o como productos de empalme alternativo. Por otro lado, RE β está codificado por el gen *ESR2* ubicado en el cromosoma 14 (14q23-24) y tiene cinco isoformas conocidas. (14)

Como hormona esteroidea, el estrógeno puede atravesar la membrana plasmática e interactuar con los RE α y RE β intracelulares para ejercer efectos directos al unirse a las secuencias de ADN. Alternativamente, el estrógeno puede activar cascadas de señalización intracelular a través de la interacción con GPER1 y/o RE α y RE β . (14) Ambos receptores nucleares, que se dimerizan y traslocan al núcleo después de la unión del ligando, regulan la transcripción de genes diana mediante la unión a elementos de respuesta a estrógenos en el ADN. Además, se han descrito efectos no genómicos a través de la fosforilación y regulación de enzimas que afectan la fisiología celular, como quinasas y fosfatasas, y la actividad a través del receptor 1 de estrógeno acoplado a la proteína G unido a membrana (GPR30/GPER1). Si bien, el RE α no se detecta en el epitelio colónico o en el CCR se ha confirmado que RE β es la forma predominante de RE en varios estudios. (15)

Ambos receptores poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción. (16)

El RE predominante en el epitelio colónico normal es el RE β , según se determina tanto en los niveles de proteína como de ARN mensajero (ARNm). La inmunohistoquímica ha demostrado además una disminución de la expresión de RE β durante la progresión del cáncer de colon. El polimorfismo en el gen RE β afecta el riesgo y la supervivencia del cáncer de colon. Los estudios en animales han demostrado que RE β media el efecto protector del estrógeno contra el cáncer de

colon. (16)

Existe una fuerte asociación entre la obesidad y el cáncer colorectal, especialmente en hombres, el colon es el primer órgano que responde a una dieta alta en grasa y el REβ puede atenuar el desarrollo del cáncer colorectal. En un estudio se alimentaron ratones con dieta alta en grasa y se les administraron ligandos estrogénicos selectivos del receptor. Se registró un impacto sobre el metabolismo, la proliferación de las criptas del colon, la infiltración de macrófagos y el transcriptoma del colon. La activación selectiva del REβ redujo el peso corporal, atenuó la infiltración de macrófagos inducida por la dieta y disminuyó la proliferación de células epiteliales. (17)

2.2 REβ como abordaje terapéutico

Evidencia sustancial ha demostrado una relación inversa entre la expresión de REβ en el colon y la presencia y estadio de pólipos y tumores colorrectales (18). Actualmente se han demostrado que una mezcla de fitoestrógenos y fibras puede reducir el tamaño y el número de pólipos duodenales (19), se informó de un caso en el que la misma mezcla antes mencionada logró reducir el tamaño y el número de pólipos del intestino delgado en un paciente afectado por el síndrome de Lynch. (15)

Se ha sugerido que la reducción de los niveles de REβ puede estar relacionada con la progresión del estadio clínico del cáncer colorectal, pero la función de REβ como marcador pronóstico en CCR permanece indeterminado. REβ tiene cinco isoformas (REβ 1-5) y REβ1 se considera la isoforma de tipo salvaje de longitud completa.(20)

Existen estudios que respaldan que la activación de REβ reduce los pólipos adenomatosos colorrectales y modula las vías involucradas en el control del CCR. El tratamiento de los pólipos adenomatosos colorrectales a través de la dieta, los suplementos dietéticos y los alimentos que generalmente se reconocen como

seguros, representa una opción complementaria a los tratamientos.(21). Dentro de las principales funciones asociadas al control del CCR del RE β están: regular la reparación del ADN y la apoptosis a través de la señalización de p53, así como, la represión de la expresión de algunos oncogenes. (18)

Barone y colaboradores evaluaron la expresión de RE β en material de biopsia de archivo de seis pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF) sometidos a colectomía. Los resultados mostraron que la expresión de RE β se redujo significativamente tanto en tejido adenomatoso con altos niveles de displasia como en tejidos carcinomatosos en comparación con la mucosa normal ($p < 0,001$). (18)

En cuanto a las líneas celulares de cáncer de colon, se ha encontrado que la reintroducción de RE β en las células de cáncer de colon reduce la proliferación en las líneas celulares SW480, HT29, HCT8, pero no en HCT116 ya que no afectó la inducción de la apoptosis. El RE β potencia el efecto antiproliferativo del raloxifeno y afecta la migración e invasión celular en las células de cáncer de colon HCT-116. (15)

Las funciones de RE β , refuerzan el papel protector en el cáncer de colon, por lo que se podría considerar a los agonistas selectivos de RE β como una estrategia prometedora para la terapia quimiopreventiva del cáncer de colon. Además de servir para predecir la metástasis del cáncer de colon. (15)

Se sabe que las mujeres tienen un riesgo menor de CCR que los hombres. Se ha informado que los pólipos y tumores colorrectales ocurren con más frecuencia en hombres que en mujeres, con razón de momios (OR) de 1,52 y 1,43, respectivamente. La Women's Health Initiative mostró que las mujeres premenopáusicas tienen un 40% menos de probabilidades de sufrir CCR en comparación con los hombres de la misma edad. Las mujeres mayores, por otro lado, tienen un peor pronóstico de supervivencia global que los hombres de edad

similar, presumiblemente debido a la pérdida de estrógenos asociada con la menopausia. Además, en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) seguidos durante más de 10 años, el riesgo general de CCR fue un 60% mayor entre los hombres que entre las mujeres. Varias pruebas sugieren que las hormonas sexuales femeninas, específicamente el estrógeno, forman la base de este efecto protector en las mujeres. (15)

Hases y colaboradores, identificaron varias diferencias sexuales significativas: mientras que RE β fue protector contra el desarrollo de tumores en ambos sexos, los hombres que carecían de RE β intestinal mostraron un aumento en el número de tumores, por otra parte, las mujeres presentaron un aumento en el tamaño del tumor. Los tumores más grandes en las mujeres no se acompañaron de un aumento de la proliferación celular. (22)

Las líneas celulares de cáncer de colon que expresan RE β tratadas con estrógeno han mostrado inducción en la apoptosis. Así mismo, se ha demostrado claramente que las mujeres menopáusicas tratadas con terapia de reemplazo de estrógenos tienen una reducción significativa tanto en su riesgo relativo como en su tasa relativa de desarrollar cáncer de colon. (23)

CAPÍTULO 2

3. Planteamiento del problema

El CCR es un problema de salud pública, con alta incidencia (18.1 millones de nuevos casos en 2018) y mortalidad (880 772 muertes) mundial. En México corresponde al segundo tipo de cáncer más frecuente en hombres y al quinto tipo de cáncer más frecuente en mujeres, con una alta mortalidad (5700 casos por ambos sexos). Debido a la deficiente cultura de la prevención, a la clínica inespecífica de la sintomatología en sus etapas iniciales, así como la carencia de pruebas de cribaje sensibles y específicas sobre esta patología, su diagnóstico suele realizarse en etapas avanzadas en las cuales el pronóstico para los pacientes suele ser malo para la vida y la función. La identificación del nivel de expresión del RE β en cáncer colorectal, podría ser utilizado como un biomarcador que complemente el diagnóstico y también podría ser utilizado como un biomarcador pronóstico del CCR. Por lo anterior se planteó la siguiente pregunta:

¿El nivel de expresión del RE β en biopsias de cáncer colorectal se modifica con respecto a las biopsias de colon sin patología neoplásica?

4. Hipótesis Científica

H1: El nivel de expresión del RE β en biopsias de cáncer colorectal es menor que en biopsias de colon sin patología neoplásica.

H0: No existe diferencia en el nivel de expresión del RE β entre biopsias de cáncer colorectal y biopsias de colon sin patología neoplásica.

5. Justificación

El CCR es una de las neoplasias con mayor incidencia entre la población y la segunda causa de muerte por enfermedades oncológicas a nivel mundial, debido a que su diagnóstico se realiza en estadios avanzados, se han desarrollado investigaciones para la búsqueda de biomarcadores inmunológicos en cáncer colorectal, que identifiquen la enfermedad en etapas iniciales para un tratamiento temprano y con esto se alcance un mejor pronóstico de supervivencia.

A la fecha existen poca información sobre la expresión del RE β en la población mexicana con cáncer colorectal. Los estudios muestran a este receptor como un importante factor de protección contra el desarrollo de cáncer colorectal, estudiar su expresión en las biopsias de colon puede aportar información al clínico sobre la posible respuesta al tratamiento y evolución de la enfermedad.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Comparar el nivel de expresión del RE β en biopsias de pacientes con cáncer colorectal y biopsias de colon sin patología neoplásica

6.2 Objetivos particulares

Describir las características demográficas de la población de estudio.

Describir la frecuencia de las diferentes patologías no neoplásicas en las biopsias del grupo control.

Determinar el nivel de expresión del RE β en biopsias de cáncer colorectal.

Determinar el nivel de expresión del RE β en biopsias sin patología neoplásica

Identificar la localización celular del RE β en biopsias de cáncer colorectal y sin patología neoplásica

7. Metodología

7.1 Diseño del estudio

Diseño del estudio: Comparativo, observacional, transversal, ambilectivo, homodémico

7.2 Ubicación espacio-tiempo

El trabajo de investigación se realizó durante el periodo de tiempo comprendido de septiembre de 2020 a mayo de 2021, Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y en el Hospital Universitario de Puebla (HUP). Dicho protocolo cuenta con registro de aprobación por el comité de investigadores de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla con número de registro No. SIEP/C.I/066/2020, número de registro por parte del comité de ética e investigación del hospital universitario de Puebla, No.CEIHUP/2019/042. Bajo los estatutos de los lineamientos de bioética. (Anexo 1,2,3)

7.3 Marco muestral

7.3.1 Definición de la población

Biopsias de pacientes del Departamento de Anatomía Patológica del archivo de patología del Hospital Universitario de Puebla que cuenten con diagnóstico de cáncer colorectal y biopsias de colon sin patología neoplásica.

7.3.2 Selección de la muestra

Biopsias de pacientes con cáncer de colon y recto (adenocarcinoma)

Biopsias de colon de pacientes sin patología neoplásica

7.3.3 Tamaño de la muestra

No probabilístico a conveniencia del investigador.

7.4 Criterios de selección de la muestra

7.4.1 Criterios de inclusión

Biopsias de pacientes con diagnóstico histopatológico de CCR en cualquier estadio, con adenocarcinoma, mayores de 18 años y de cualquier sexo.

Grupo control:

Biopsias de colon de pacientes sin patología neoplásica, mayores de 18 años y de cualquier sexo.

7.4.2 Criterios de exclusión:

Pacientes con diagnóstico de cáncer sincrónico, diferente a colon.

7.4.3 Criterios de eliminación

Pérdida de las muestras durante el procesamiento.

Datos incompletos en el expediente clínico.

7.5 Definición de las variables y escalas de medición (Anexo 1)

7.5.1 Variables de estudio

REβ

Estadio TNM

Edad

Sexo

Localización del REβ

Nivel de expresión del REβ

7.6 Técnicas y procedimientos

7.6.1 Método de recolección de datos

Se realizó una base de datos en Excel con los datos del archivo clínico del Hospital Universitario de Puebla

7.6.2 Técnicas y procedimientos

Se recabó información del expediente de patología de los pacientes que cumplieron los criterios de selección, se llenó base de datos de los pacientes.

En las biopsias de dichos pacientes se realizó la determinación de RE β a mediante la técnica de inmunohistoquímica por colorimetría utilizando, un anticuerpo monoclonal contra el RE β , se evaluaron las preparaciones en un microscopio.

La técnica de inmunohistoquímica empleada fue la siguiente:

1) Las biopsias se cortaron en el micrótopo en secciones de 4 micras y se montaron en los portaobjetos con poli-L-lisina (P 8920 POLY-L-LYSINE SOLUTION, SIGMA-ALDRICH, USA) y se procesaron simultáneamente tanto los casos con cáncer como los controles.

2) Desparafinación de las muestras: Las laminillas fueron desparafinadas para remover el medio de embebido y poder ser rehidratadas. Las laminillas con las muestras se colocaron en un horno a 60°C de 40 a 60 minutos. Ya que es necesario eliminar los restos de parafina por que puede dar un falso positivo.

3) Rehidratación de las muestras: Las muestras se rehidrataron en soluciones decrecientes de alcohol etílico y finalmente en buffer fosfato salino (PBS 0.15 M PH 7.3). Después de desparafinar se sometieron inmediatamente en un baño de xilol durante 5 minutos. Se cambio de baño y se repitió nuevamente, este paso es importante para que el tejido se adhiera mejor a la laminilla; xilol al 100% incubar 5 minutos, con xilol II 100%. Se eliminó el exceso de xilol y las laminillas fueron sumergidas en etanol absoluto por 5 minutos. Se cambió de baño y se repitió nuevamente este paso: etanol I 100% por 5 minutos y II 100% 5 minutos.

Se eliminó el exceso del etanol absoluto y las laminillas fueron sumergidas en etanol al 96% por 5 minutos, se cambió de baño y se repitió nuevamente este paso, pero ahora con etanol al 80% por 5 minutos y con etanol al 70% por 5 minutos y

finalmente con PBS 1X M pH 7.3, 5 minutos. Las soluciones de xilol y alcoholes fueron cambiadas después de procesar 40 laminillas.

4) Después de hidratar las muestras se sometieron a la tinción de inmunohistoquímica:

Paso 1. Recuperación antigénica: Este paso es importante para romper los puentes de hidrógeno que se formaron con el formol y la parafina y así exponer los epítomos que fueron enmascarados durante la fijación del tejido. Se llenó un vaso de Coplin con la cantidad suficiente de la solución recuperador antigénico (Target retrieval solution, pH9 ready-to-use, DakoCytomation DenmarkA/S, Dinamarca) para cubrir las laminillas con las secciones de tejido, se tapó el Coplin y se colocó en baño maría en una olla de presión, se incubó a una temperatura de 95-99 °C, durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el Coplin con las laminillas y el recuperador antigénico del baño maría y se dejó enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se decantó la solución de recuperador antigénico y las laminillas se lavaron con PBS 0.15 M pH 7.3 tres veces por 5 minutos cada lavado.

Paso 2. Anticuerpo primario: Para el anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal específico contra el receptor (Dako, Thermo Scientific) en una dilución 1:50 en los PBS-BSA al 1%. Se eliminó el exceso de buffer secando alrededor del tejido con un papel cuidando de no tocarlo y de que no quede seco, se colocaron 40 µl de la dilución del anticuerpo monoclonal o a cubrir el tejido. Las secciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal específico toda la noche en cámara húmeda a 4° C. Posteriormente, se lavaron 3 veces en PBS 0.15 M pH 7.3 por 5 minutos cada lavado. Como control positivo para REβ se usará un tejido histológico de adenocarcinoma como lo indica y proporciona el fabricante.

Paso 3. Revelado de la reacción: Para el revelado de la reacción antígeno anticuerpo se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a la enzima peroxidasa, la dilución empleada fue 1:1000, se incubó por 1 hr a TA en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados con PBS 0.15 M pH 7.3 por 5 minutos cada lavado. Posteriormente se utilizó un substrato, la diaminobencidina (DAB) el

cuál se preparó de la siguiente manera: se colocaron 2.5 mg de DAB en 5 ml de Tris-HCL a 0.2 M pH 7.4, para activar la solución se agregó una gota de agua oxigenada (Omnichen sac, México). Los cortes se cubrieron con la DAB activada y se incubaron en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces en con agua corriente por 5 minutos cada lavado.

Paso 4. Contra tinción: se sumergieron las laminillas en un baño de hematoxilina por 30 segundos y posteriormente se lavaron con agua corriente, hasta asegurarse que todos los residuos de hematoxilina se eliminaron.

Paso 5. Deshidratación y aclaramiento de las laminillas: se sumergieron en etanol al 70% por 5 minutos, se cambió de baño y se repitió nuevamente este paso pero ahora con etanol al 80%, luego con etanol al 96%, con etanol al 100%, nuevamente con etanol al 100%, posteriormente las laminillas se sumergieron en xilol durante 5 minutos, se cambió de baño y se repitió nuevamente este paso. Finalmente las laminillas se colocaron en etanol al 70% 5 minutos, etanol al 80% por 5 minutos, etanol 96% 5 minutos, etanol I al 100% por 5 minutos, etanol II al 100% por 5 minutos, xilol I 100% 5 minutos, xilol II 100% 5 minutos.

Paso 6. Montaje: se eliminó el exceso de xilol secando alrededor del tejido con un papel cuidando de no tocarlo y se le puso una gota de resina (Entellan®, Merk, Alemania) y finalmente se le colocó el cubreobjetos. Las laminillas se observaron en un microscopio de luz para determinar la presencia y nivel de expresión del RE β a través de la coloración marrón.

7.6.2.1 Determinación de RE β

La determinación del nivel de expresión del RE β se realizó mediante observación de la intensidad de coloración, clasificada como nulo, bajo, medio y alto por dos observadores, en caso de existir alguna discrepancia se volvió a valorar por ambos observadores. Si hubiera existido alguna laminilla en la que no se llegara a un consenso respecto al nivel de expresión se llamaría a un tercer observador, sin embargo, eso no sucedió.

A los niveles de expresión se les asignó la siguiente numeración para poder realizar pruebas estadísticas numéricas

Nulo = 0 Bajo = 1

Medio = 2 Alto = 3

7.6.2.2 Descripción de las laminillas

Se determinó la localización celular del RE β mediante la observación de la fotografía tomada la laminilla con un microscopio LEICA DM 1000 LED con cámara PROGRES GRYPHAX de la marca JENOPTIK a un aumento de 100x y 200x identificándose en núcleo, citoplasma y/o en ambos de igual forma descrita por 2 observadores.

7.6.3 Estrategia de trabajo

Se identificaron las biopsias de tejido de colon que cumplieron con los criterios de inclusión para formar parte de este protocolo.

Se obtuvieron las biopsias tumorales provenientes de pacientes con diagnóstico histopatológico de CCR en el Servicio de Patología del Hospital Universitario de Puebla.

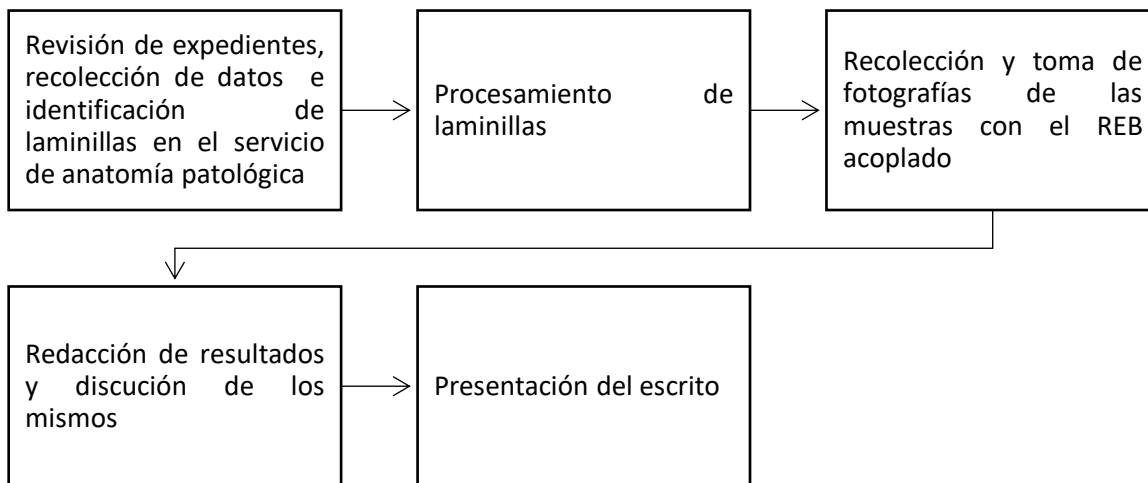
Se obtuvieron las biopsias de tejido sin patología neoplásica.

Para evaluar la expresión del RE β , se realizaron cortes a partir de las biopsias incluidas en parafina. Posteriormente los cortes fueron desparafinados e hidratados, se llevó a cabo la recuperación antigénica para la reactivación de epítomos, aplicación de anticuerpos y observación mediante microscopia.

Las evaluaciones del nivel de expresión fueron realizadas por el mismo investigador previamente capacitado y estandarizado con el estándar de referencia (gold estándar), obteniendo un valor de kappa interobservador de 0.942 e intraobservador de 0.941. Por otro lado, en la estandarización de la localización de la expresión se obtuvo un valor de kappa tanto inter como intraobservador de 1. Lo anteriormente mencionado, demuestra una alta concordancia.

Se diseñó una tabla para la recolección de datos del bloque de parafina, dicha tabla contendrá el nombre del paciente, número de expediente, edad, sexo, estadio de la enfermedad.

Diagrama de flujo. (Figura 3)



7.7 Análisis de datos

Los datos fueron analizados en el programa SPSS versión 23, se aplicó estadística descriptiva e inferencial.

Medidas de tendencia central, dispersión, gráficos.

Prueba de Shapiro-Wilk para valorar la distribución de las variables.

Prueba chi cuadrada para variables nominales. Prueba t de Student para variables numéricas con distribución Gaussiana.

8. Resultados

8.1 Características de la muestra estudiada

De las biopsias obtenidas y listas para procesamiento por parte del Hospital Universitario de Puebla, 10 corresponden a pacientes con cáncer colorectal y 16 a biopsias sin patología neoplásica.

Se realizó prueba de normalidad Shapiro-Wilk a la variable edad para determinar la distribución normal de los datos con un valor de $p= 0.17$

Se realizó pareo de los grupos por edad y sexo, existiendo similitud entre los grupos.

8.2 Edad

La media de la edad de los pacientes con cáncer fue de 70.3 años, para los pacientes sin patología neoplásica la media fue de 64.6 años, se realizó la prueba de t de Student para determinar la similitud de los grupos con un valor de $p= 0.93$ con lo cual se determina que los grupos no presentan diferencias significativas.

En el grupo con cáncer la edad mínima es de 46 años y la máxima 81 años.

En el grupo sin patología neoplásica la edad mínima fue de 44 años y la máxima de 84 años. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Análisis de edad por grupo de estudio, se muestra la media, la desviación y el valor de p

	Cáncer	Sin patología neoplásica	Valor de p
N	10	16	0.93*
Media	70.3	64.6	
Desviación estándar	10.5	10.4	
Mínimo	46	44	
Máximo	81	84	

*t de student

8.3 Sexo

En el grupo de muestras con cáncer, predominaron las mujeres representando el 70% de los casos, para el grupo control de muestras de tejido sin patología neoplásica también encontramos como sexo predominante a las mujeres con un 69% del total, se realizó chi cuadrada para determinar la similitud de los grupos por sexo con un valor de $p= 0.94$ lo cual nos indica que los grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de sexo por grupos se muestra el número de pacientes porcentaje y el valor de p

		Cáncer N (%)	Sin patología neoplásica N (%)	N	Valor de p
Sexo	M	7 (70%)	11 (69%)	18	0.94*
	H	3 (30%)	5 (31%)	8	
Total		10	16	26	

*chi cuadrada

8.4 Diagnóstico

El diagnóstico más común por los reportes de patología de las muestras de tejido control, fue inflamación inespecífica con un total de 7 de las 16 muestras con un porcentaje del 43.8 % siendo la más común (Tabla 3.)

Tabla 3. Frecuencia de diagnósticos para grupo sin patología neoplásica

Diagnósticos	Frecuencia	Porcentaje
Grupo control		
CUCI	1	6.3
Infeccioso	1	6.3
Inflamación inespecífica	7	43.8
Pólipo	6	37.3
Sano	1	6.3
Total	16	100

8.5 Estadio del CCR (TNM)

El estadio más común del cáncer de colon de las muestras fue el estadio III con una frecuencia de 4 de las 10 muestras representando el 40%. lo que nos podría sugerir que nuestra población se diagnóstica en etapas avanzadas de la enfermedad, sin embargo, es algo que no podemos asegurar ya que trabajamos con muy pocas muestras. (Tabla 4.)

Tabla 4. Frecuencia y porcentaje de muestras de acuerdo con el del estadio de cáncer

Estadio	Frecuencia	Porcentaje
I	2	20
II	2	20
III	4	40
IV	2	20
Total	10	100

8.6 Nivel de expresión del REB

Para evaluar el nivel de expresión de RE β , se realizó mediante observación de la intensidad de coloración, clasificada como nulo, bajo, medio y alto por dos observadores, a los hallazgos se les asignó la siguiente numeración para poder realizar pruebas estadísticas numéricas

Nulo = 0 Bajo = 1 Medio = 2 Alto = 3

En la siguiente imagen se muestra el nivel de expresión bajo del RE β en tejido sin patología neoplásica y con cáncer. (Figura 4)

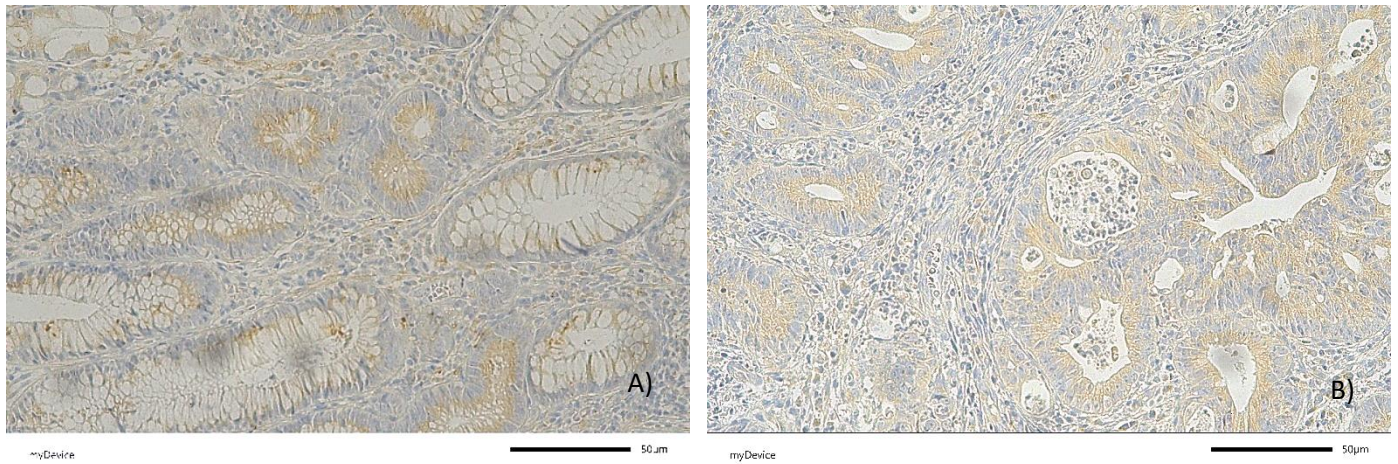


Figura 4. Biopsias de tejido de colon sin patología neoplásica y con cáncer, bajo Inmunohistoquímica para detección del RE β , la intensidad del color marrón nos indica la expresión del receptor en el tejido. A) nivel de expresión bajo del RE β en biopsia sin patología neoplásica, B) nivel de expresión bajo del RE β en biopsia con cáncer, aumento a 100X. Fotografías tomadas con microscopio LEICA DM 1000 LED con cámara PROGRES GRYPHAX de la marca JENOPTIK.

La imagen nos muestra el nivel de expresión medio del RE β en tejido sin patología neoplásica y con cáncer. (figura 5)

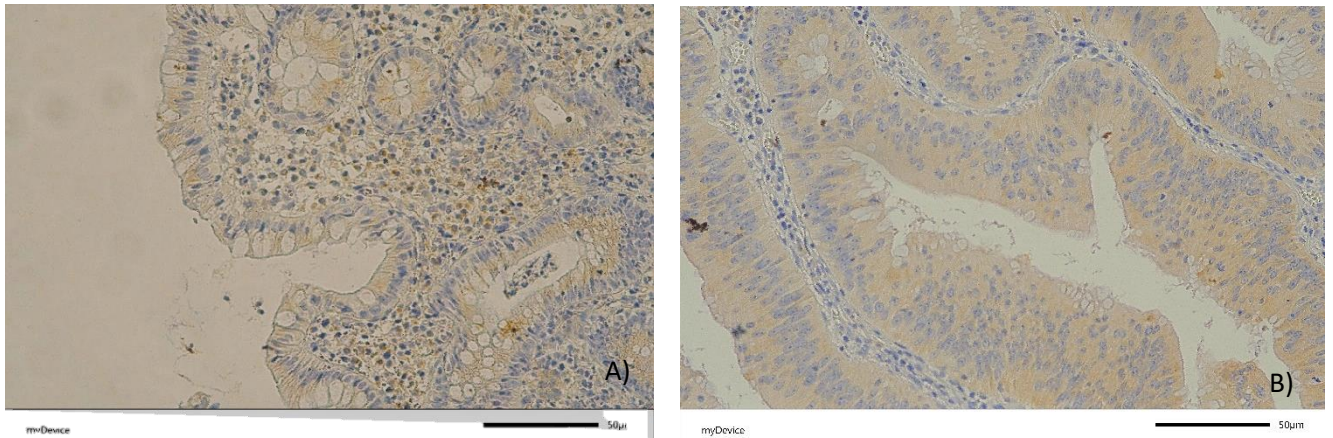


Figura 5. Biopsias de tejido de colon sin patología neoplásica y con cáncer, bajo Inmunohistoquímica para detección del RE β , la intensidad del color marrón nos indica la expresión del receptor en el tejido. A) nivel de expresión medio en biopsia sin patología neoplásica aumento 100x, B) nivel de expresión medio en biopsia con cáncer aumento 200x. Fotografías tomadas con microscopio LEICA DM 1000 LED con cámara PROGRES GRYPHAX de la marca JENOPTIK.

Para la siguiente figura se muestra el nivel de expresión alto del RE β en tejido sin patología neoplásica. No se encontró en nuestro estudio nivel de expresión alto en tejido con cáncer. (figura 6)

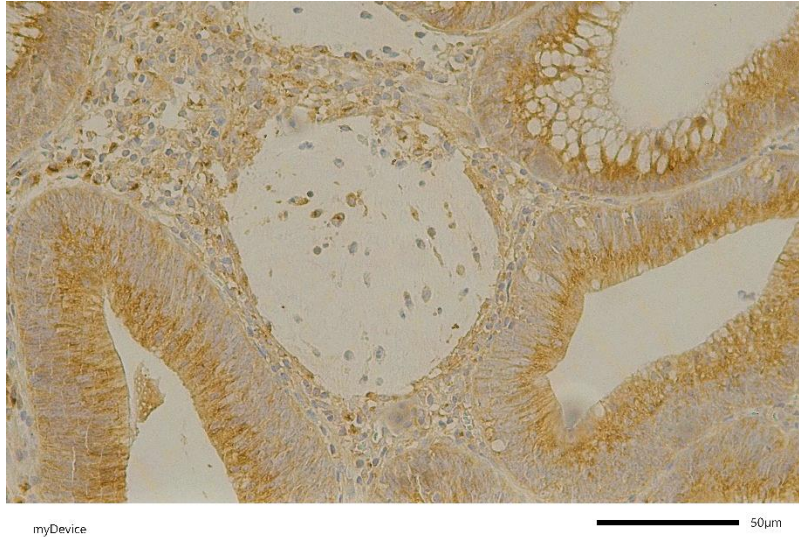


Figura 6. Biopsias de tejido de colon sin patología neoplásica, bajo inmunohistoquímica para detección del RE β , la intensidad del color marrón nos indica la expresión del receptor en el tejido. A) nivel de expresión alto en biopsia sin patología neoplásica, aumento a 100X. Fotografías tomadas con microscopio LEICA DM 1000 LED con cámara PROGRES GRYPHAX de la marca JENOPTIK.

Se evaluó el nivel de expresión del RE β para determinar si existían diferencias en el nivel de expresión entre biopsias de cáncer y tejido sin patología neoplásica de colon, encontrando en el grupo con cáncer predominancia del nivel de expresión bajo comparado con las biopsias sin patología neoplásica en las cuales predomina el nivel de expresión alto. (Tabla 5.)

Tabla 5. Número de pacientes de acuerdo con el nivel de expresión de RE β en grupo cáncer y grupo sin patología neoplásica

Nivel de expresión	Cáncer	Sin patología neoplásica
1	5	4
2	4	3
3	1	9
Total	10	16

Se realizó prueba t de student para comparar las medias de los valores del nivel de expresión del RE β , con un valor de 0.12 con lo cual se determina que no hay diferencia en el nivel de expresión entre ambos grupos. (Tabla 6)

Tabla 6. Análisis de nivel de expresión por grupos se muestra media, desviación estándar y valor de p

	Cáncer	Sin patología neoplásica	Valor de p
N	10	16	
Media	1.6	2.3	0.12*
Desviación estándar	0.65	0.83	

*t de student

8.7 Diferencia en la localización de la expresión del REB

Se describió la localización celular del REβ mediante la observación de la fotografía tomada la laminilla determinándose en núcleo, citoplasma y ambos, de igual forma descrita por 2 observadores.

En esta imagen se representa la localización nuclear del REB en biopsia sin patología neoplásica. (figura 7)

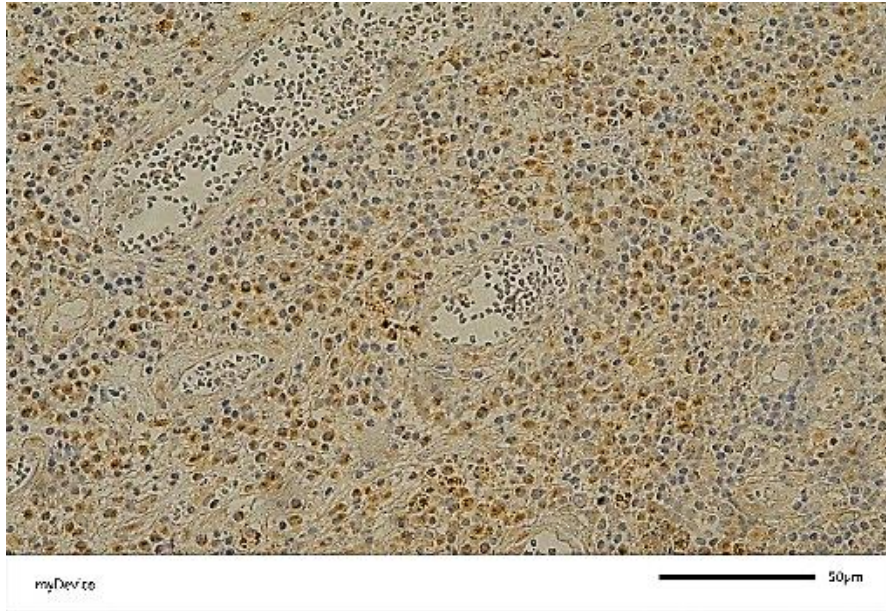


Figura 7. Biopsia de tejido de colon sin patología neoplásica, procesada por inmunohistoquímica para detección del RE β , la intensidad del color marrón nos indica la expresión del receptor en el tejido y su localización celular. A) localización del RE β a nivel nuclear, aumento a 100X. Fotografías tomadas con microscopio LEICA DM 1000 LED con cámara PROGRES GRYPHAX de la marca JENOPTIK

En la siguiente imagen se muestra la localización del REB a nivel nuclear y citoplasma para tejido sin patología neoplásica y con cáncer. (figura 8)

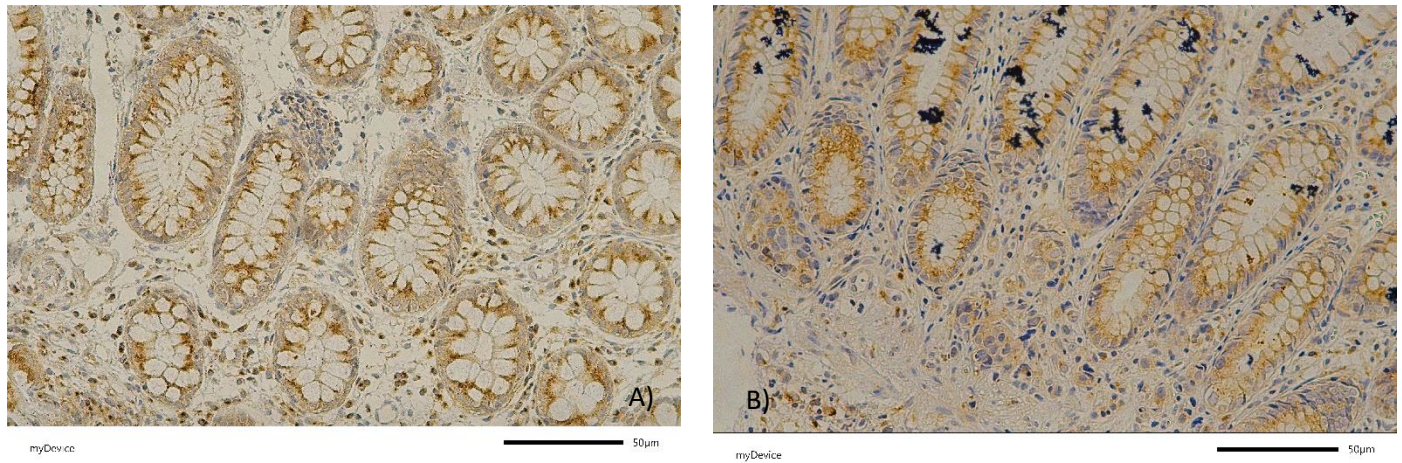
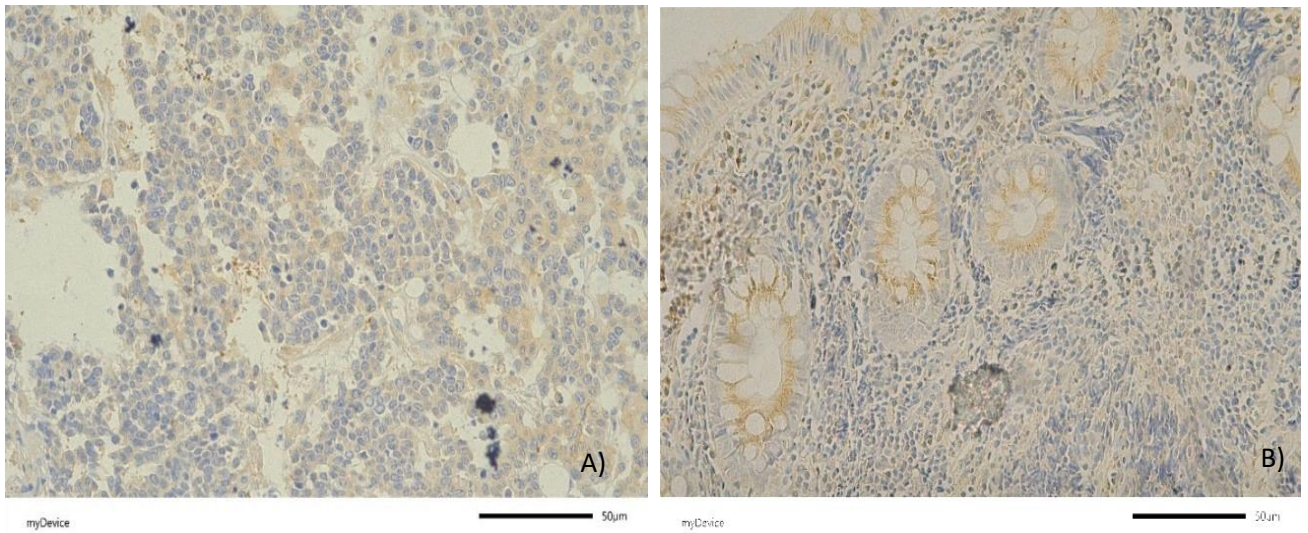


Figura 8. Biopsias de tejido de colon sin patología neoplásica y con cáncer, procesada por inmunohistoquímica para detección del RE β , la intensidad del color marrón nos indica la expresión del receptor en el tejido y su localización celular. A) tejido sin patología neoplásica con localización del REB a nivel nuclear y citoplasma, B) tejido con cáncer con localización del REB en núcleo y citoplasma, aumento a 100X. Fotografías tomadas con microscopio LEICA DM 1000 LED con cámara PROGRES GRYPHAX de la marca JENOPTIK

El RE β es un receptor nuclear, también descrito a nivel citoplasmático, por técnica de inmunoperoxidasa marca el contorno nuclear de color café fuerte y en membrana y nivel citoplasmático de café claro.

Al realizar la tinción de inmunoperoxidasa para determinar la presencia del RE β , observamos diferencia en la expresión siendo positivas a nivel citoplasmático preferentemente en tejido con cáncer, Como se muestra en las siguientes imágenes (Figura 9).

Figura 9. Biopsias de tejido de colon con cáncer. En donde se observa mayor



expresión a nivel citoplasma. A) El RE β se observa en expresión baja y a nivel citoplasma, B) se observa pérdida de la expresión a nivel nuclear del tejido encontrando expresión bajo y en su mayoría a nivel citoplasma. aumento a 100X. Fotografías tomadas con microscopio LEICA DM 1000 LED con cámara PROGRES GRYPHAX de la marca JENOPTIK.

8.8 Localización de la expresión

La localización de la expresión con mayor frecuencia en el grupo con cáncer fue en el citoplasma con un 90% de los casos, y en el grupo sin patología neoplásica la localización más frecuente fue tanto nuclear como citoplasma (ambos) con un 81% de los casos. Se realizó prueba de chi cuadrada para comparar ambos grupos con un valor de 0.00 con lo cual se determina que hay una diferencia en la localización de la expresión celular del REB. (Tabla 7.)

Tabla 7. Análisis de localización de la expresión por grupo de estudio, se muestra el número de muestras, el porcentaje y el valor de p

Sitio de expresión	Cáncer N (%)	Sin patología neoplásica N (%)	Valor de P
Ambos	1 (10)	13 (81)	
Citoplasma	9 (90)	2 (13)	
Nuclear	0	1 (6)	0.00*
Total	10	16	

*chi cuadrada

9. Discusión

La edad promedio de nuestro grupo con cáncer fue alrededor de los 70 años, dicho dato concuerda con Torrecillas, quien reporta una mayor frecuencia en población de más de 50 años. Así mismo, también reporta la edad promedio de diagnóstico en 68 años para hombres y 72 años para mujeres; dichos números también son similares en la presente investigación. (24)

En un estudio acerca de la prevalencia del cáncer de colon se encontró una frecuencia muy similar tanto en hombre como mujeres, sin embargo, en la muestra del presente estudio, el sexo mujer fue el más común con un 70%, por lo tanto el comportamiento para nuestra población es diferente. (25)

Para el grupo control encontramos como patología más común por colonoscopia la inflamación inespecífica con un 43.8% del total de las muestras, a diferencia de lo reportado por José Reyes y colaboradores quienes reportaron pólipos de alto riesgo como patología por colonoscopia más común con un 23% de sus casos. Sin embargo, en el presente estudio se encuentra como segundo lugar el pólipo de colon, en las biopsias de colonoscopia del grupo sin patología neoplásica. (26)

Como resultado encontramos al estadio III según la clasificación de TNM para cáncer de colon como el más común con un 40% del total de nuestras muestras procesadas, a diferencia de lo reportado en un estudio, quienes reportan para España el estadio I como el más frecuente. Con esto se sugerimos que nuestra población se diagnostica en etapas avanzadas, esto debido a la falta de cultura para realizar la colonoscopia tanto por parte de los pacientes, como del personal médico. (26)

En nuestro estudio se encontró que la expresión del RE β fue mayor en el grupo sin patología neoplásica. Los hallazgos de este estudio son similares con los obtenidos por Konstantunopoulos y colaboradores quienes mencionan que la

expresión de RE β fue significativamente menor en las células de cáncer de colon, en comparación con las de epitelio colónico normal, así mismo, reportan disminución progresiva en la expresión de RE β , además la pérdida de diferenciación de células cancerosas. Estudiaron 90 muestras de cáncer colorectal, de los cuales 50 son hombres y 40 mujeres, concluyendo que no existe diferencia en la expresión entre hombres y mujeres, ni en la localización celular del RE β en los tumores de colon, a diferencia de los factores estrogénicos donde los hombres tienen menor riesgo de cáncer de colon que las mujeres, y una expresión más baja en los tejidos con cáncer de colon comparados con el tejido sano. (27)

En un estudio con 120 pacientes diagnosticados con pólipos adenomatosos espontáneos, poliposis adenomatosa familiar y pólipos asociados a cáncer colorectal se determinaron los niveles de expresión de RE β , de progesterona y andrógenos. Los niveles de expresión del RE β difirieron entre grupos: el grupo con poliposis adenomatosa familiar tenía menor expresión del RE β que el grupo de pólipos esporádicos. Con la transformación de los pólipos esporádicos en cáncer, hubo una disminución considerable en la expresión del RE β . La expresión del RE β fue menor en los tumores en etapa T3/T4 que en los T1/T2, la supervivencia global a 5 años de los pacientes con cáncer colorectal que expresaron positivamente el RE β excedió a la de los pacientes sin niveles de expresión detectables. Las diferencias de la expresión del RE β representan un mecanismo potencial a través del cual el estrógeno podría alterar la susceptibilidad al cáncer de colon.(28)

Se han propuesto varias formas en las que RE β puede reducir la tumorogénesis en humanos. En un estudio observaron una regulación positiva de la expresión génica de la reparación de desajustes del ADN en células epiteliales del colon humano, que se correlacionaban con concentraciones de estrógeno en suero mayor a 45pg/ml. Se ha demostrado que el RE β induce la apoptosis a través de varios mecanismos, incluida la fragmentación del ADN en las células de cáncer de colon y un aumento de p53. Este estudio tiene como hallazgo importante que demostró que la sobre expresión del RE β condujo a un aumento de la señalización de p53, aumentando la apoptosis y reduciendo la proliferación celular. También

demonstró que el estradiol indujo la reparación del ADN mediada por p53 en colonocitos no malignos.(18)

En nuestro estudio encontramos que, en tejido con cáncer, el RE β mostró mayor positividad de la tinción en el citoplasma y pérdida de la tinción a nivel núcleo, a diferencia de lo reportado por Rath-Wolfson y colaboradores, quienes encuentran mayor positividad del núcleo. Además, los autores concluyen que hay una expresión menor en estadios avanzados de la enfermedad, apoyando la teoría de que existe una relación del estrógeno en el desarrollo y progresión de tumores de colon.(29)

En cuanto a la localización de la expresión del RE β , encontramos en el tejido sin patología neoplásica, mayor expresión a nivel nuclear y citoplasmático; en nuestro grupo con cáncer no encontramos expresión del RE β a nivel nuclear, a diferencia de Rath-Wolfson y colaboradores que reportaron la presencia del RE β tanto en el núcleo como en el citoplasma de biopsias de pacientes con adenocarcinoma de CCR y tejido sano. (29)

De acuerdo con Wada-Hiraike la deficiencia del RE β en el núcleo conduce a hiperproliferación, pérdida de diferenciación y disminución de la apoptosis de la mucosa del colon, características principales del desarrollo de las neoplasias. En el presente estudio se encuentra disminución de la expresión de RE β en el núcleo de las biopsias con cáncer, con lo cual inferimos que el RE β tiene un papel importante en la carcinogénesis, modulando vías como K-ras y p53 las cuales funcionan de forma oncogénica y matadora de las células. Permitiendo las señales proliferativas a anti apoptóticas de las células. (30)

Papaxoinis menciona que el cambio de localización del receptor y del nivel de expresión, podrían tener un efecto en la supresión de la vía WNT β catenina, y tener como consecuencia una progresión en el crecimiento de las lesiones neoplásicas, lo que concuerda con lo observado en nuestras muestras. (31)

El RE β regula la expresión génica a través de la interacción con la cromatina. Se ha demostrado que protege contra el cáncer de colon, se utilizó una secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina para identificar los sitios de

unión en los genes involucrados con el desarrollo tumoral, migración celular, adhesión celular, apoptosis y señalización WNT, identificaron claras diferencias entre el patrón de unión a cromatina del RE β en celular de colon en comparación con células de mama, los resultados proporcionan un mapa de los sitios de unión de la cromatina al RE β en las células de colon y posicionan al RE β como una posible línea terapéutica para el cáncer colorectal. (32)

En carcinoma uterino, la sobreexpresión de RE β se relacionó con un aumento la progresión de cáncer. En nuestro estudio es un comportamiento contrario en el que observamos que en los pacientes con CCR existe una disminución en el nivel de expresión de dicho receptor. Esto sugiere que la función de receptor podría diferir entre el tipo celular. (33)

Por otro lado, en cáncer de mama, se evaluó la expresión de RE β en una cohorte de 1976 a 1996, observando un cambio de localización de RE β en la mayoría de las muestras con cáncer a diferencia de las muestras sin patología neoplásica, estos resultados obtenidos en tumores de cáncer de mama soportan los resultados obtenidos en nuestras muestras. (34)

Lin y colaboradores, evaluaron la expresión de RE β en el núcleo de las células en tumores de cáncer de mama, encontrando que aquellas mujeres que tenían tumores con expresión nuclear del RE β presentaron una mejor supervivencia. Por lo que, considerando los resultados obtenidos en nuestra investigación, sería oportuno evaluar si la disminución del RE β a nivel de núcleo podría relacionarse con la sobrevida de los pacientes con CCR. (35)

10.Conclusiones

La expresión del RE β en tejido de colon se encontró con nivel de expresión bajo en el grupo de pacientes con cáncer y nivel de expresión alto en el grupo sin patología neoplásica, aunque sin significancia estadística. Por otro lado, el receptor mostró un cambio de localización celular, observando una disminución o ausencia en el núcleo de las células tumorales que resultó estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 3

11. Sesgos y limitaciones

La principal limitación del presente estudio fue el hecho de no poder procesar un mayor número muestras y/o realizar un estudio multicéntrico que nos mostrara la reproducibilidad de los resultados obtenidos, esta limitación fue resultado de las restricciones en el trabajo consecuencia de la pandemia.

Otra limitación estuvo relacionada con el hecho de no contar con muestras que no tuvieran ningún tipo de alteración, tales como la inflamación, poliposis, etc., ya que en un momento dado estas alteraciones podrían estar asociadas a cambios en el nivel de expresión del RE β .

12. Fortalezas

En el presente proyecto participaron colaboradores expertos en el área de inmunohistoquímica, así como especialistas en patología y coloproctología que permitieron hacer un grupo multidisciplinario.

Los resultados obtenidos en el grupo de pacientes con cáncer pudo compararse con un grupo control que no tenía patología neoplásica y que permitió identificar no sólo los cambios en el nivel de expresión si no también cambios a nivel de la localización subcelular del receptor nuclear.

13. Perspectivas

Se proponen abrir nuevas líneas de investigación para evaluar al RE β como un posible biomarcador pronóstico para cáncer de colon, así mismo evaluar su papel

protector para el desarrollo de cáncer de colon. Adicionalmente, sería importante evaluar el efecto que puede tener el cambio de localización subcelular del RE β en el desarrollo de este tipo de cáncer.

13.1 Beneficios

Los resultados generados por la presente investigación abren una línea de investigación dirigida a evaluar el potencial uso de la determinación de la localización celular del RE β como un biomarcador pronóstico, como se ha propuesto para cáncer de mama en donde el cambio de localización se asocia con pobre supervivencia.

El presente estudio beneficia a la población abriendo una línea de investigación vinculada a los factores de prevención del cáncer colorectal, dentro de los que estaría el RE β , este tipo de investigación tendría un impacto a largo plazo.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Globocan. New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018 | UICC [Internet]. 2018 [citado el 28 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018#>
2. Santiago ER De, Peñas B, Mesonero F, Albillos SPA. Cáncer colorrectal
Keywords : Rev la Educ Super [Internet]. 2016;12(6):297–307. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.med.2016.03.003>
3. D'Ottavio GE, Wulfson AM, Rojman JA. Carcinogénesis Colorrectal Nuevas Perspectivas E Implicancias Clínicas Para Su Detección. Rev Med Rosario. 2014;80(2):63–74.
4. Vanegas DP, Ramírez López LX, Limas Solano LM, Pedraza Bernal AM, Monroy Díaz AL. Revisión: Factores asociados a cáncer colorrectal. Rev Médica Risaralda. 2020;26(1):68–77.
5. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal cancer and nutrition. Nutrients. 2019;11(1).
6. Cervera-Inolopú W, Díaz-Vélez C. Influencia de la dieta en la aparición del cáncer colorrectal en una población de Chiclayo. Rev Venez Oncol. 2014;26(1):32–40.
7. Lamarca Lete A, Molina Villaverde R, López González JL, Álvarez-Mon Soto M. Cáncer colorrectal. Med [Internet]. 2013;11(25):1519–25. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70488-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70488-8)
8. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. Cancer Biol Med. 2016;13(1):120–35.
9. Ibet Juárez-Vázquez C, Mónica Y, Rosales-Reynoso A, Alejandra M, Reynoso R. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares
ARTÍCULO DE REVISIÓN Correspondencia. Vol. 150, Gac Med Mex. 2014.
10. Menéndez P, Villarejo P, Padilla D, Menéndez JM RMJ. Carcinogénesis del cáncer colorrectal. 2012;XV:27–34.
11. Fletcher R, Wang Y-J, Schoen RE, Finn OJ, Yu J, Zhang L. Colorectal

- cancer prevention: Immune modulation taking the stage. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. abril de 2018;1869(2):138–48. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X17302172>
12. Jacobo Velázquez PM, Huerta López JG, Cravioto Quintana P. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Alergia, Asma e Inmunol Pediátricas*. 2017;26(2):56–63.
 13. González-Duarte José Alberto y cols. Opciones de tamizaje para cáncer colorrectal. *Revista Médica MD. Opciones tamizaje para cáncer Color* [Internet]. 2019;10(04):137–42. Disponible en: 04-2013- 091114361800-203.
 14. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. En: *Cancer Research* [Internet]. 2019. p. 135–70. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-03-3486>
 15. Williams C, DiLeo A, Niv Y, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer Lett* [Internet]. marzo de 2016 [citado el 26 de agosto de 2020];372(1):48–56. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030438351500748X>
 16. Edvardsson K, Nguyen-Vu T, Kalasekar SM, Pontén F, Gustafsson JÅ, Williams C. Estrogen receptor β expression induces changes in the microRNA pool in human colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013;34(7):1431–41.
 17. Hases L, Archer A, Indukuri R, Birgersson M, Savva C, Korach-André M, et al. High-fat diet and estrogen impacts the colon and its transcriptome in a sex-dependent manner. *Sci Rep* [Internet]. el 30 de diciembre de 2020 [citado el 23 de noviembre de 2021];10(1):16160. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73166-1>
 18. Williams C, DiLeo A, Niv Y, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer Lett* [Internet]. marzo de 2016;372(1):48–56. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>
 19. Bringiotti R, Ierardi E, Lovero R, Losurdo G, Leo A Di, Principi M, et al.

- Intestinal microbiota : The explosive mixture at the origin of inflammatory bowel disease ? 2014;5(4):550–9.
20. Taggarshe D, Loboeki C, Silberberg B, Mckendrick A, Mittal VK. Clinicopathological Significance of the Expression of Estrogen Receptor-beta and Vascular Endothelial Growth Factor-A in Colorectal Cancer. *Am Surg* [Internet]. el 1 de diciembre de 2012;78(12):1376–82. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/000313481207801230>
 21. Singh RP, Gu M, Agarwal R. Silibinin Inhibits Colorectal Cancer Growth by Inhibiting Tumor Cell Proliferation and Angiogenesis. 2008;(6):2043–51.
 22. Hases L, Indukuri R, Birgersson M, Nguyen-Vu T, Lozano R, Saxena A, et al. Intestinal estrogen receptor beta suppresses colon inflammation and tumorigenesis in both sexes. *Cancer Lett* [Internet]. noviembre de 2020;492(July):54–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.06.021>
 23. Press OA, Zhang W, Gordon MA, Yang D, Haiman CA, Azuma M, et al. Gender-related survival differences associated with polymorphic variants of estrogen receptor- β (ER β) in patients with metastatic colon cancer. *Pharmacogenomics J* [Internet]. el 15 de octubre de 2011;11(5):375–82. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/tpj201045>
 24. Torrecillas-Torres L, Cervantes-Sánchez G, Adame-González I, Bornstein-Quevedo L, Calderillo-Ruiz G, Cárdenas-Cárdenas E, et al. Recommendations for diagnosis and treatment of colon and rectal cancer in Mexico. *Gac Mex Oncol*. 2019;18(4):265–332.
 25. Montiel Roa A, Mendoza E, Dragotto Galván A, Diaz Benítez MI, Portillo Sosa JP. Prevalencia del cáncer de colon y su tratamiento quirúrgico en un hospital de alta complejidad durante el periodo enero 2017- diciembre 2018. *Cir parag* [Internet]. 2019;43(3):10–3. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S2307-04202019000300010&script=sci_arttext&lng=pt
 26. José Reyes, Carlos Dolz JC. El cáncer de colon. 2020;35(3):16–23.
 27. Konstantinopoulos P., Kominea A, VANDOROS G, Sykiotis G., Andricopoulos

P, Varakis I, et al. Oestrogen receptor beta (ER β) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* [Internet]. junio de 2003;39(9):1251–8. Disponible en:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804903002399>

28. Stevanato Filho PR, Aguiar Júnior S, Begnami MD, Ferreira FO, Nakagawa WT, Spencer RMSB, et al. Estrogen Receptor β as a Prognostic Marker of Tumor Progression in Colorectal Cancer with Familial Adenomatous Polyposis and Sporadic Polyps. *Pathol Oncol Res* [Internet]. el 5 de julio de 2018 [citado el 23 de noviembre de 2021];24(3):533–40. Disponible en: <http://www.accamargo.org.br>
29. Rath-Wolfson L, Purim O, Ram E, Morgenstern S, Koren R, Brenner B. Expression of estrogen receptor β 1 in colorectal cancer: Correlation with clinicopathological variables. *Oncol Rep*. 2012;27(6):2017–22.
30. Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, et al. Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. el 21 de febrero de 2006;103(8):2959–64. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0511271103>
31. Papaxoinis K, Triantafyllou K, Sasco AJ, Nicolopoulou-Stamati P, Ladas SD. Subsite-specific differences of estrogen receptor beta expression in the normal colonic epithelium: implications for carcinogenesis and colorectal cancer epidemiology. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22:614–9.
32. Indukuri R, Jafferli MH, Song D, Damdimopoulos A, Hases L, Zhao C, et al. Genome-wide estrogen receptor β chromatin binding in human colon cancer cells reveals its tumor suppressor activity. *Int J cancer* [Internet]. el 1 de agosto de 2021;149(3):692–706. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.33573>
33. Huang GS, Gunter MJ, Arend RC, Li M, Arias-Pulido H, Prossnitz ER, et al. Co-expression of GPR30 and ER β and their association with disease progression in uterine carcinosarcoma. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2010 [citado el 16 de agosto de 2021];203(3):242.e1. Disponible en:

[/pmc/articles/PMC2933955/](#)

34. Marotti J, Collins LC, Hu R, Tamimi RM. Estrogen Receptor- β Expression in Invasive Breast Cancer in Relation to Molecular Phenotype: Results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* [Internet]. febrero de 2010 [citado el 16 de agosto de 2021];23(2):197. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3055924/](#)
35. Lin S-L, Yan L-Y, Zhang X-T, Yuan J, Li M, Qiao J, et al. ER- α 36, a Variant of ER- α , Promotes Tamoxifen Agonist Action in Endometrial Cancer Cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt Pathways. *PLoS One* [Internet]. el 2 de febrero de 2010 [citado el 16 de agosto de 2021];5(2). Disponible en: [/pmc/articles/PMC2814868/](#)

15 Anexos

15.1 Anexo 1

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidades de medición	Instrumento de medición
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la toma de biopsia.	Edad cumplida en el momento de la toma de biopsia	Numérica	Años	Expediente clínico
Sexo	Condición orgánica que distingue hombres de mujeres	Hombre / Mujer	Dicotómica	Hombre / Mujer	Expediente clínico
Receptor estrogénico beta	Receptor estrogénico beta de localización nuclear, con función metabólica en cáncer colorectal.	Receptor estrogénico beta observado por microscopía	Numérica	Nulo (0) /Bajo(1)/ Medio (2) /Alto (3)	Observación directa de la laminilla bajo microscopía
Localización del receptor estrogénico beta	Sitio de localización del receptor estrogénico beta en el tejido	Observado en citoplasma o núcleo celular	Nominal	Citoplasma /núcleo / ambos	Observación directa de la laminilla bajo microscopía
Estadio TNM	Sistema que se usa para describir la diseminación del cáncer en el cuerpo	Estadio: I, II, III, IV	Ordinal	I/II/III/IV	Expediente clínico

12.2 Anexo 2.

Bioética

Este estudio se llevó a cabo bajo la supervisión y dirección de investigadores expertos, adscritos a la Facultad de Medicina; Centro de Investigación Biomédica de Oriente y Hospital Universitario de la BUAP, según lo dispuesto en la declaración de Helsinki, artículo 12, y en el apartado 10 de la Norma Oficial Mexicana que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Además, se ajustó a los principios científicos y éticos de la BUAP. De acuerdo al artículo 17 de la Ley General de Salud, el estudio correspondió a una investigación de riesgo mínimo, ya que se realizó un procedimiento diagnóstico de rutina, se siguieron las disposiciones del artículo 24 de la última modificación de la Declaración de Helsinki (Modificación de Fortaleza, Brasil, 2013)