



Facultad de Ciencias Médicas
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES DE TOXICIDAD
RADIOINDUCIDA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA RADIOTERAPIA
EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**

Lic. Elisa Eugenia Córdoba

Directora: Dra. Alba M. Güerci

Co- director: Dr. Ezequiel Lacunza

Este trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Médicas ha sido realizado en el Instituto de Genética Veterinaria “Ingeniero Fernando Noel Dulout” (IGEVET)- Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de La Plata- CONICET. Y en el Centro Integrado de Oncología- CIO La Plata, Terapia Radiante SA, La Plata, Buenos Aires, Argentina

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que compartieron estos años de trabajo conmigo y a las que estoy infinitamente agradecida por todo su apoyo, por haberse cruzado en mi camino y formar parte de mi vida.

Ante todo quiero dar gracias a Dios por acompañarme en cada momento, especialmente en los más difíciles e iluminarme a cada paso.

A la Facultad de Ciencias Médicas por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme una beca para poder dedicarme exclusivamente.

A Alba, por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo, por su buena predisposición y apoyo constante y por haber compartido generosamente sus conocimientos conmigo en el día a día.

A Ezequiel y a Martín, por haberme compartido sus conocimientos y experiencias, por apoyarme y orientarme en este trabajo.

Al Dr. Oscar Casas y a las Dras. Pilar Peral García y Wanda Di Girolamo quienes desde el plan de tesis estuvieron presentes en su evaluación, realizando aportes valiosos para la mejora de la misma.

A mis compañeras de trabajo y amigas queridas, Nadia, Suani, Laurita, Euge, Clau, Gise y Hernán porque haberlos conocido fue una de las cosas más lindas que me pasaron. Gracias infinitas por las miles de charlas y risas, por ayudarme a transitar este camino, por el compañerismo y la amistad.

A todo el IGEVET, porque desde el primer momento me hicieron sentir parte del instituto. A María, Egle, Moni, Diego, Guille, Pedro, Dani, Hernán O., Agus, César, Julián, Julio, Ana, Gisel, Juana, Carlos, un placer haber compartido los días con ustedes.

A todo el personal del CIO- La Plata, a los médicos, físicos, técnicos y secretarías por su ayuda durante el desarrollo de este estudio y compartir el trabajo diario, especialmente a mis compañeras de laboratorio, Sabri y Yuli, y a Esteban, Cecilia, Marcelo y Ximena.

A Jorge López Camelo, Andrés, Gise y Hernán por haberme brindado desinteresadamente sus conocimientos y aportes para el enriquecimiento de este trabajo.

A mis amigos del alma, Romi, Pato, Silvi, Ile, Caro, Guille, Walter, Dani, porque no importa el tiempo ni la distancia, siempre están ahí.

A Bruno y a toda su familia por el cariño que me brindan siempre.

A mis hermanas queridas porque a pesar de la distancia las siento siempre cerca y a mis sobrinos por ser el mejor regalo del mundo y sacarme siempre una sonrisa.

Finalmente quiero agradecer a mis padres, que siempre están presentes, compartiendo mis alegrías y sufriendo mis tristezas. Gracias por haber hecho quien soy, por su amor incondicional y por alentarme siempre a seguir adelante.

A todos muchísimas gracias!!!

Dedicado a mis queridos padres

ABREVIATURAS

A.

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ala (A): Alanina

Arg (R): Arginina

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNi: ácido ribonucleico de interferencia

ATM: ataxia telagientacsia mutada

B.

BER: *base excision repair* (reparación por escisión de base)

BrEt: bromuro de etidio

C.

CaM: cáncer de mama

CDI: carcinoma ductal infiltrante

CDIS: carcinoma ductal in situ

CLI: carcinoma lobulillar infiltrante

CLIS: carcinoma lobulillar in situ

D.

dNTPs: desoxirribonucleótidos

DDR: *DNA damage response* (respuesta del daño al ADN)

DSB: *double strand break* (ruptura de doble hebra)

E.

EDTA: ácido etilénico diamino tetraacético

ER: enzima de restricción

EORTC: *European organization for research and treatment of cancer* (Organización europea para la investigación y tratamiento del cáncer)

G.

Gy: Gray

GSTA1: *Glutathion-S-transferase alpha 1* (Glutathión S transferasa alfa 1)

GSTP1: *Glutathion-S-transferase pi 1* (Glutathión S transferasa pi 1)

H.

Her-2: *human epidermal growth factor receptor 2* (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano)

HR: *homologous recombination* (recombinación homóloga)

I.

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agencia internacional para la investigación en cáncer).

IC: Intervalos de confianza.

IGRT: *Image-Guided Radiation Therapy* (radioterapia guiada por imágenes)

IL1: *interleukin 1* (Interleuquina 1)

IL6: *interleukin 6* (Interleuquina 6)

Ile (I): isoleucina

IMRT: *Intensity-Modulated Radiotherapy* (radioterapia de intensidad modulada)

K.

KDa: kilodalton

Ki 67: factor de proliferación tumoral

Kpb: kilobases

L.

Leu (L): leucina

M.

MAF: *minor allele frequency* (frecuencia del alelo menor)

MDR: *Multifactor Dimensionality Reduction* (Reducción de la dimensionalidad multifactorial).

MV: Megaelectronvoltio

N.

NHEJ: *non homologous end joining* (unión de extremos no homólogos)

O.

OR: *Odds Ratio* (razón de proporciones)

P.

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PM: Peso molecular.

Pro (P): prolina

Q.

QT: quimioterapia

R.

RE: receptor de estrógeno

RFLP: *restriction fragment length polymorphism* (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas del oxígeno)

RP: receptor de progesterona

RT: radioterapia

RTOG: *radiation therapy oncology group* (grupo de oncología radioterápica)

S.

SNP: *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleótido simple)

SSB: *single strand break* (ruptura de hebra simple)

T.

TE: Tris- EDTA

TGF β : *transforming growth factor beta* (factor de crecimiento transformante beta)

TNF- α : *tumoral necrosis factor alpha* (factor de necrosis tumoral alfa)

TP53: *tumoral protein p53* (proteína tumoral p53)

Tris/Cl: tris- ácido clorhídrico

U.

UV: ultravioleta

X.

XRCC1: *X-ray repair cross-complementing protein 1*

RESUMEN

La radioterapia (RT) es uno de los pilares fundamentales en el tratamiento del cáncer. Aproximadamente el 60% de los pacientes diagnosticados con esta patología requieren de este procedimiento, tanto de manera curativa como paliativa. Si bien el éxito de la RT en la erradicación del tumor depende principalmente de la dosis total de radiación, la tolerancia del tejido normal circundante es el factor que limita al tratamiento. Entre los pacientes, se ha observado una considerable variación en la toxicidad desarrollada durante o luego de las aplicaciones, manifestándose desde lesiones leves hasta carcinomas radio-inducidos. Se sugiere que esta radiosensibilidad individual, es un rasgo complejo, de herencia multifactorial, que dependería de genes involucrados en diversas vías radioinducidas. Entre ellos, los genes implicados en la reparación del ADN, en el estrés oxidativo y en la respuesta inflamatoria tendrían un rol predominante. En el presente trabajo, se propuso establecer la identificación y asociación entre polimorfismos en estos genes y radiosensibilidad clínica en pacientes con cáncer de mama (CaM) sometidas a RT. Se incluyó un grupo de 122 pacientes, quienes realizaron un tratamiento convencional o hipofraccionado de RT post-cirugía. Se extrajo una muestra de sangre periférica o hisopado de mucosa bucal y se realizó una entrevista en la que se registraron datos relacionados al paciente y al tratamiento. La radiotoxicidad clínica se evaluó semanalmente siguiendo el score del RTOG (grado 0- 4). Se realizó la extracción del ADN genómico y posteriormente el genotipado de las muestras mediante PCR-RFLP o pirosecuenciación. Se efectuó el análisis estadístico de asociación entre los *SNPs* y la radiotoxicidad y un análisis multivariado incluyendo factores que podrían intervenir en el desarrollo del rasgo. Según la información colectada se observó que el 75,4 % manifestó toxicidad aguda en piel. Desde el punto de vista genético, se observó que las frecuencias genotípicas del polimorfismo T869C del gen $TGF\beta$ -1 y T72P del gen TP53 están asociadas a un menor riesgo de manifestar radiodermatitis aguda. Considerando el *SNP* G894T de NOS3, se mostró, que bajo la acción conjunta de la quimioterapia, está involucrado en el desarrollo de radiodermatitis. También, se observó una interacción sinérgica entre las variantes de los genes GSTP1, NOS3 y GSTA1 en el desarrollo del rasgo, mediante el software MDR. Por otro lado, teniendo en cuenta factores no-genéticos se observó que la edad, el Índice de masa corporal y el tamaño de la mama, son factores de gran relevancia en el aumento de estos efectos agudos.

Se considera que los resultados obtenidos podrían contribuir a la comprensión de los mecanismos que subyacen a la radiosensibilidad individual, así como al establecimiento de modelos predictivos de sensibilidad que conduzcan a la individualización del tratamiento, reduciendo los efectos adversos y mejorando la calidad de vida del paciente.

ABSTRACT

Radiation therapy (RT) is essential in the treatment of cancer. Approximately 60% of patients with cancer require this curative and palliative procedure. While RT success in eradicating the tumor depends mainly on the total radiation dose, the tolerance of the surrounding normal tissue is the limiting treatment factor. Toxicity during or after applications varies considerably among patients, ranging from mild lesions to radio-induced carcinomas. Such individual radiosensitivity is a complex and multifactorial trait would depend on genes involved in various radio-induced pathways, such as genes involved in DNA repair, oxidative stress and inflammatory response, which would play a predominant role. In the present study, we propose to identify and associate gene polymorphisms (SNPs) with clinical radiosensitivity in breast cancer patients undergoing RT. We studied a group of 122 patients who underwent conventional or hypofractionated RT after surgery. Before treatment, peripheral blood samples or oral mucosa swabs were collected and patient and treatment-related data were recorded in an interview. Clinical radiotoxicity was assessed weekly following the RTOG score (grade 0-4). Genomic DNA extraction and sample genotyping were performed by PCR-RFLP or pyrosequencing. The association between SNPs and radiotoxicity was statistically analyzed; the multivariate analysis included factors that could be involved in the development of the trait. Clinical examination of the patients showed that 75.4% reported acute skin toxicity. From the genetic standpoint, the frequency of T869C and T72P SNPs of genes TGF β -1 and TP53 associated with a lower risk of acute radiodermatitis, whereas G894T of NOS3 was involved in radiodermatitis development under the combined action of chemotherapy. A synergistic interaction among variants of genes GSTP1, NOS3 and GSTA1 was observed in the development of the trait using the MDR software. On the other hand, non-genetic factors such as age, body mass index and breast size increased these acute effects. These results should contribute to the understanding of the mechanisms underlying individual radiosensitivity as well as to the establishment of predictive sensitivity models that may lead to treatment individualization, reducing adverse effects and improving the patient quality of life.

ÍNDICE ANALÍTICO

I. INTRODUCCIÓN	2
I.1. CÁNCER DE MAMA	2
I.1.1. Epidemiología del cáncer de mama	2
I.1.2. Estructura de la glándula mamaria.....	4
I.1.3. Clasificación histológica y molecular de los subtipos del cáncer de mama.....	5
I.1.4. Factores de riesgo del cáncer de mama	6
I.1.5. Etiología del cáncer de mama.....	7
I.1.6. Tratamiento del cáncer de mama	9
I.2. RADIOTERAPIA ONCOLÓGICA.....	12
I.2.1. Radiaciones ionizantes.....	13
I.2.2. Proceso del tratamiento.....	13
I.2.3. Tipos de tratamientos radiantes en mama	14
I.2.4. Fundamentos celulares y moleculares de la RT (o Efectos biológicos inducidos por la radiación)	16
I.2.5. Radiosensibilidad clínica.....	18
I.2.6. Ensayos de radiosensibilidad	19
I.3. RADIOGENÓMICA.....	20
I.3.1. Rutas biológicas asociadas con la radiosensibilidad	21
I.3.2. Genes candidatos.....	23
I.3.3. Genes de estrés oxidativo.....	23
I.3.4. Genes de vías de respuesta de daño al ADN	25
I.3.5. Genes de citoquinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas.....	27
I.3.6. Importancia clínica de la radiogenómica.....	29
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
II.1. HIPÓTESIS	32
II.2. OBJETIVOS GENERALES	32
II.3. OBJETIVOS PARTICULARES	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
III.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	34
III.2. ENTREVISTA DE ANAMNESIS E HISTORIA CLÍNICA.....	34
III.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	35
III.4. TRATAMIENTO RADIANTE DE PACIENTES	35
III.5. EVALUACIÓN DE LA RADIOTOXICIDAD	37

III.6. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	37
III.6.1. A partir de muestras de sangre periférica	37
III.6.2. A partir de hisopado de mucosa bucal.....	38
III.6.3. A partir de muestras de sangre en tarjetas whatman FTA elute	38
III.6.4. Cuantificación de la concentración de ADN.....	38
III.7. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPS)	39
III.7.1. Selección de los SNPs.....	39
III.7.2. Amplificación de las secuencias y determinación de los SNPs por RFLP.....	40
III.7.3. Análisis de las variantes polimórficas por pirosecuenciación.....	44
III.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
III.8.1. Frecuencias genotípicas y alélicas.....	47
III.8.2. Equilibrio de Hardy- Weinberg	47
III.8.3. Análisis de asociación de los polimorfismos con radiotoxicidad	48
III.8.4. Interacciones gen-gen por MDR.....	48
III.8.5. Desequilibrio de ligamiento	49
III.8.6. Análisis multivariado mediante análisis de componente principal (ACP).....	50
IV. RESULTADOS	52
IV.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN.....	52
IV.2. MANIFESTACIÓN CLÍNICA DE LA RADIOTOXICIDAD.....	53
IV.3. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE	55
IV.3.1. Asociación de SNPs en genes de estrés oxidativo y radiotoxicidad aguda	57
IV.3.2. Asociación entre SNPs en genes de reparación del ADN y radiotoxicidad aguda.....	60
IV.3.3. Asociación entre SNPs en el gen TGF β -1 y radiotoxicidad aguda	62
IV.3.4. SNPs en los genes ATM, TNF- α e IL6 por pirosecuenciación y su asociación con radiodermatitis severa.....	63
IV.3.5. Interacción entre SNPs por reducción de la dimensionalidad múltiple (MDR).....	65
IV.4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y RADIODERMITIS AGUDA	68
V. DISCUSIÓN.....	72
V.1. RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL. RADIODERMITIS.....	72
V.2. POLIMORFISMOS DE BASE SIMPLE Y RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL.....	73
V.2.1. Polimorfismos en genes de estrés oxidativo implicados en la radiodermatitis.....	74
V.2.2. Polimorfismo asp1853asn en ATM y arg72pro en TP53.....	75
V.2.3. Polimorfismos R194W y R399Q de XRCC1	76
V.2.4. Polimorfismos en G-308A de TNF- α y G-174C de IL-6.....	78
V.2.5. Polimorfismos C-509T y P10L de TGF β -1.....	79

V.2.6. Estudios de asociación basados en SNPs.....	80
V.3. OTROS FACTORES RELACIONADOS A LA RADIOTOXICIDAD AGUDA	81
V.4. PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS EN LA RADIOGENÓMICA	84
VI. CONCLUSIONES.....	86
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
VIII. ANEXO	105
ANEXO1: ENTREVISTA DE ANAMNESIS	105
ANEXO 2: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	109
ANEXO3: DISTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES GRADOS DE RADIODERMITIS POR SEMANA DE TTO.....	110

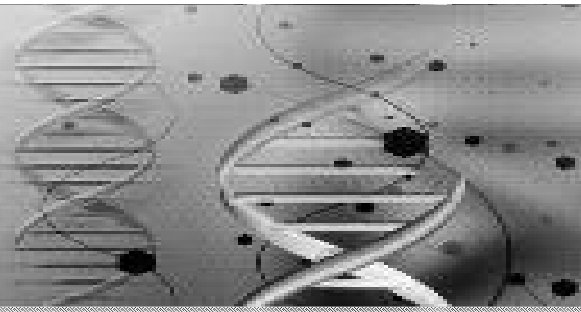
ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Factores de riesgo probables y establecidos para el CaM	7
TABLA 2. Criterios de radiotoxicidad aguda en piel EORTC/RTOG.....	37
TABLA 3. Características de las variantes polimórficas bajo estudio	40
TABLA 4. Secuencias de los cebadores y tamaño de los fragmentos esperados.	42
TABLA 5. Componentes de la mezcla de reacción utilizadas para la reacción de PCR	43
TABLA 6. ER utilizadas para la digestión de los amplicones y los productos obtenidos.	44
TABLA 7. Secuencias de los cebadores para pirosecuenciación	46
TABLA 8. Características clínicas de los pacientes con CaM incluidos en este estudio	52
TABLA 9. Asociación entre los <i>SNPs</i> A313G de <i>GSTP1</i> , T47C de <i>SOD2</i> , G894T de <i>NOS3</i> y C69T de <i>GSTA1</i> y efectos adversos de radiotoxicidad aguda en piel.....	59
TABLA 10. Asociación del polimorfismo G894T del gen <i>NOS3</i> con radiotoxicidad aguda en piel en pacientes con tratamiento radioterapéutico y QT neo-adyuvante.	59
TABLA 11. Asociación entre los <i>SNPs</i> en genes de reparación del ADN analizados en este estudio y efectos agudos de radiotoxicidad.....	61
TABLA 12. Análisis de asociación entre los haplotipos de <i>XRCC1</i> y radiodermatitis	61
TABLA 13. Asociación entre <i>SNPs</i> en <i>TGFβ-1</i> y efectos agudos de radiotoxicidad.	62
TABLA 14. Análisis de asociación entre los haplotipos de <i>TGFβ-1</i> y el desarrollo de radiodermatitis.....	63
TABLA 15. Asociación entre los <i>SNPs</i> G-308A de <i>TNF-α</i> , G-174C de <i>IL6</i> y G1853A de <i>ATM</i> y manifestación de radiodermatitis a lo largo del tratamiento.....	65
TABLA 16. Análisis estadístico de asociación entre factores relacionados al paciente y el tratamiento y radiotoxicidad en piel.	69
TABLA 17. Matriz de correlaciones.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Proporción de nuevos casos y muertes de mujeres con CaM en las Américas.	3
FIGURA 2. Número de nuevos casos y muertes en Argentina por cáncer.....	3
FIGURA 3. Anatomía de la mama femenina	4
FIGURA 4. Características o hallmarks del cáncer.	9
FIGURA 5. Curvas dosis- respuesta para RT.....	13
FIGURA 6. Mecanismos de acción de la interacción de la radiación con el ADN.....	17
FIGURA 7. Esquema simplificado de los mecanismos y vías involucradas en la respuesta celular y tisular de la RT.	22
FIGURA 8. Enfoque general de la potencial aplicación clínica de un test de radiosensibilidad para un tratamiento individualizado.....	30
FIGURA 9. Planificación en volumen total de una mama de tamaño grande.....	36
FIGURA 10. Acelerador lineal de fotones de 6MV de energía.....	36
FIGURA 11. Representación esquemática de la técnica PCR-RFLP.....	41
FIGURA 12. Representación esquemática del proceso de la pirosecuenciación	45
FIGURA 13. Histograma de distribución de frecuencias de edades de pacientes de la población en estudio.....	53
FIGURA 14. Distribución del grado máximo de radiodermatitis desarrollado por las pacientes durante el tratamiento.	54
FIGURA 15. Radiodermatitis aguda en pacientes con CaM sometidas a RT.....	54
FIGURA 16. Distribución de la radiosensibilidad individual, en relación a la dosis absorbida.....	55
FIGURA 17. Histograma de comparación de Frecuencia del alelo menor (MAF) entre distintas poblaciones.....	56
FIGURA 18. Patrón de corte obtenido mediante PCR- RFLP para la identificación de los genotipos de GSTP1, GSTA1, NOS3 y SOD2.....	58
FIGURA 19. Patrón de corte obtenido mediante PCR- RFLP en geles verticales.....	60
FIGURA 20. Genotipificación por RFLP de TGFβ-1.....	62

FIGURA 21. Pirograma obtenido de la genotipificación de G1853A de ATM.....	64
FIGURA 22. Pirograma de la tipificación del SNP G-308A de TNF- α	64
FIGURA 23. Pirograma obtenido de la genotipificación de G-174C de IL6.....	65
FIGURA 25. Descripción de la entropía y sinergia.	67
FIGURA 24. Modelo estadístico de asociación multilocus y el desarrollo de radiodermatitis	67
FIGURA 26. Gráfico del análisis de componente principal.	70



I.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. CÁNCER DE MAMA

El cáncer es un conjunto de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del cuerpo y que se caracteriza por un crecimiento celular anormal producido por la proliferación continua y descontrolada de células transformadas que presentan capacidad de invasión, progresión y metástasis hacia otros tejidos. Desde el punto de vista molecular, es considerado una enfermedad genética originada por diversos mecanismos, tales como, mutaciones y cambios epigenéticos en genes que participan en el control del crecimiento y la diferenciación celular. Particularmente, el cáncer de mama (CaM) se desarrolla en los tejidos que componen esta glándula; y es una patología muy frecuente, por lo cual se han realizado numerosos estudios dirigidos no solo a la enfermedad en sí, sino también a la optimización de sus terapias.

I.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer constituye un problema de salud a nivel mundial. En la medida en que otras causas de mortalidad son controladas y la población envejece, las enfermedades neoplásicas se encuentran entre las más importantes causantes de muerte y discapacidad en el mundo (Ferlay y col., 2010).

El CaM se puede presentar en ambos sexos; si bien en hombres es poco frecuente, en mujeres es la principal causa de muerte en los países desarrollados y en la mayoría de los países en vías de desarrollo (Seibold y col., 2013; <http://globocan.iarc.fr>). Se estima que se producen alrededor de 1.200.000 casos nuevos por año en el mundo, que implican más de 500.000 muertes (Ferlay y col., 2010).

La mortalidad por CaM varía ampliamente de región en región. En el 2012, más de 408.000 mujeres fueron diagnosticadas con CaM en América Latina siendo el tipo de cáncer con mayor incidencia registrada (29%) y el segundo tipo en cuanto a mortalidad (15%) luego del cáncer de pulmón, de esta manera 92.000 mujeres murieron a causa de la enfermedad en ese año (Figura 1). Las proyecciones actuales sugieren un aumento del 46% durante las próximas dos décadas (GLOBOCAN, 2012).

Según la Organización Panamericana de la Salud, en el 2010, la Argentina presentó la segunda tasa de mortalidad en el continente (Ferlay y col., 2010). Y dentro del país, el CaM se ubica como el tipo más frecuente, en mujeres, tanto en términos de nuevos casos (19.386) como de muertes (6.163). Para el 2017 se calcula una prevalencia de 65.834 casos (GLOBOCAN, 2012; Figura 2). Desde el punto de vista geográfico, la incidencia de la

enfermedad también es heterogénea. Algunas regiones muestran tasas de mortalidad más altas, entre ellas, la Ciudad de Buenos Aires (28,0/100.000) y la región de Cuyo (24,1/100.000), mientras que las provincias del Noroeste, exhiben indicadores inferiores al resto del país (Viniegra y col., 2010).

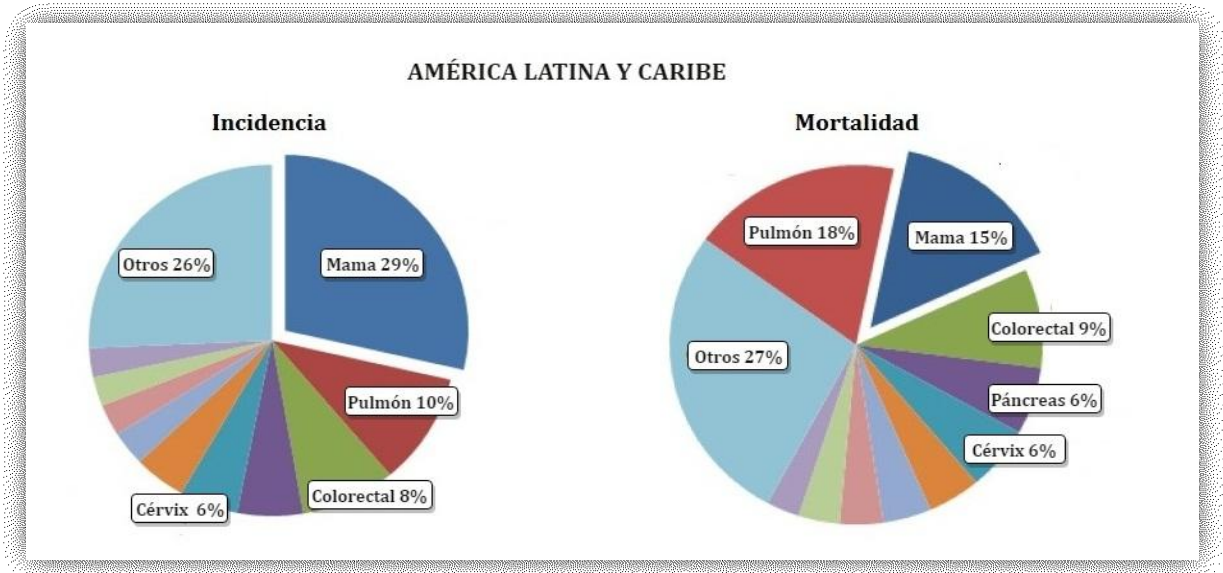


FIGURA 1. Proporción de nuevos casos y muertes de mujeres con CaM en las Américas en el año 2012. Se observa una incidencia del 29% en la población con respecto a los otros tipos de cánceres y un 15% en cuanto a mortalidad, siendo la segunda causa de muerte por esta patología. Adaptado de GLOBOCAN 2012 (IARC).

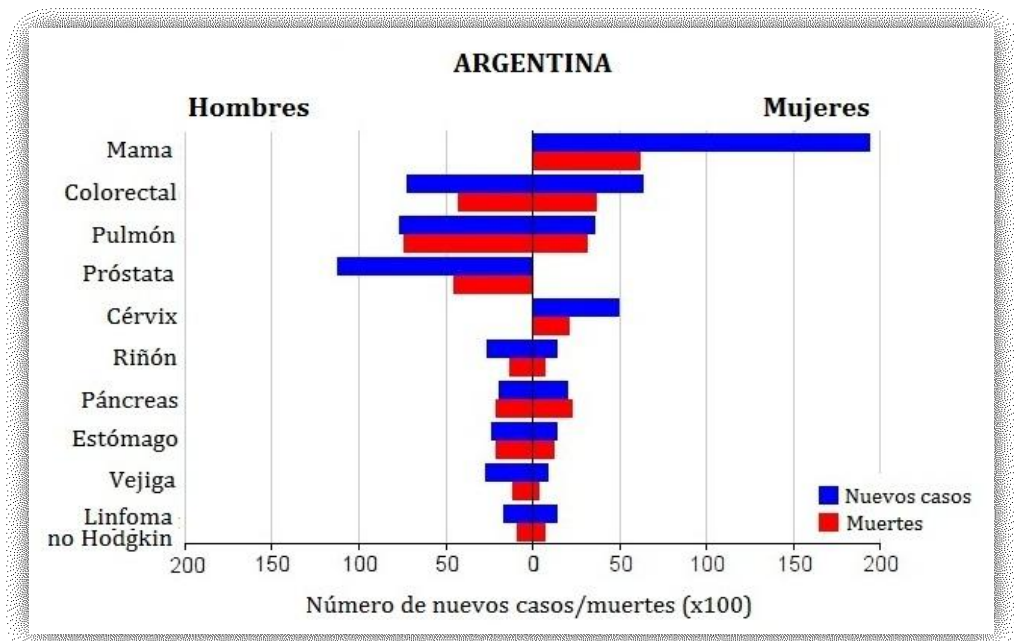


FIGURA 2. Número de nuevos casos y muertes en Argentina por cáncer, en el año 2012. Se observa que el CaM es la principal causa de muerte entre las mujeres y que hay casi 200000 casos nuevos por año de esta enfermedad. Adaptado de GLOBOCAN 2012 (IARC).

I.1.2. ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: glandular de tipo túbulo-alveolar, conjuntivo que conecta los lóbulos y adiposo que ocupa los espacios interlobulares. El tejido celular subcutáneo rodea la glándula sin que exista una cápsula claramente definida, desde éste se dirigen hacia el interior numerosos tabiques de tejido conectivo. Estos tabiques constituyen los ligamentos suspensorios de la mama o ligamentos de Cooper.

Un conjunto de quince a veinte lóbulos mamarios conforma la glándula mamaria, cada uno con su aparato excretor, que se abre en el pezón por medio de un conducto lactífero. Los lóbulos mamarios están constituidos por numerosos lobulillos que se encuentran unidos entre sí por tejido conectivo, vasos sanguíneos y por su sistema excretor compuesto por los conductos lactíferos (Figura 3).

Los lobulillos están formados por diez a cien acinos, cada cual con su conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están estructurados por un conjunto de células secretoras que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción, están rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche.

Cada mama también tiene vasos sanguíneos y vasos linfáticos. Los vasos linfáticos transportan linfa entre los ganglios linfáticos. Estos son estructuras pequeñas con forma ovalada o reniforme que se encuentran en todo el cuerpo. Filtran sustancias en la linfa y ayudan a combatir infecciones y enfermedades. Hay racimos de ganglios linfáticos cerca de la mama, en las axilas, por encima de la clavícula y en el pecho (Instituto Nacional del Cáncer, <http://www.cancer.gov/>).

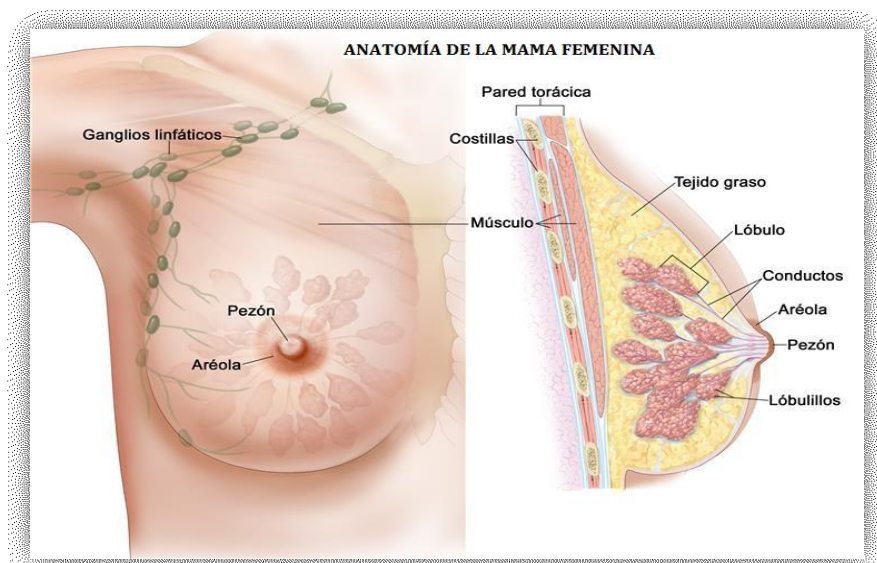


FIGURA 3. Anatomía de la mama femenina. Se muestran el pezón y la areola en la parte externa de la mama, además, los ganglios linfáticos, lóbulos, lobulillos, conductos y otras partes internas de la mama. Fuente: Instituto Nacional del Cáncer.

I.1.3. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS SUBTIPOS DE CaM

El CaM es una enfermedad clínicamente heterogénea, por lo cual se han generado esfuerzos para organizar esta diversidad mediante sistemas de clasificación. De esta manera, considerando el tipo histológico, a grandes rasgos se los puede dividir en carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo o infiltrante.

➤ **Carcinomas *in situ***

Dentro de este tipo de carcinomas no invasivos se encuentran el Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS o carcinoma intraductal) y el Carcinoma Lobulillar *in situ* (CLIS). El CDIS es considerablemente más común que el CLIS y abarca un grupo heterogéneo de tumores (Malhotra y col., 2010). Está constituido por un grupo de lesiones proliferativas limitadas al sistema ducto-lobulillar por la membrana basal, sin invadir el estroma circundante (Haffty y col., 2009). Tradicionalmente ha sido sub-clasificado según las características arquitectónicas del tumor dando lugar a cinco subtipos reconocidos: comedón, cribiforme, micropapilar, papilar y sólido. Si bien el CLIS es considerado como un tumor que confiere riesgo para carcinoma invasivo, no se comporta de forma maligna. No existe un límite divisorio claro entre hiperplasia lobulillar atípica y CLIS. (Haffty y col., 2009).

➤ **Carcinomas Invasivos**

Al igual que en los carcinomas *in situ*, los carcinomas invasivos son un grupo heterogéneo de tumores con subtipos histológicos diferenciados. Los principales tipos de tumores invasivos incluyen ductal infiltrante, lobulillar invasivo, ductal / lobulillar, mucinoso (coloide), tubular, medular y carcinomas papilares (Malhotra y col., 2010). De estos, el carcinoma ductal invasivo (CDI), es el más común, alrededor del 70- 80 % de todas las lesiones invasivas pertenecen a este tipo, mientras que el 5-10% de los casos a CLI (Haffty y col., 2009). El CDI además se puede sub-clasificar en base a los niveles de pleomorfismo nuclear, formación túbulo/ glandular e índice mitótico en: bien diferenciado (grado 1), moderadamente diferenciado (grado 2) o pobremente diferenciado (grado 3) (Lester y col., 2009).

EL CDI comienza en los conductos lácteos de la mama, penetra a través de su pared y crece en el tejido adiposo. En este punto puede tener la capacidad de propagarse (hacer metástasis) hacia otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo. Por otra parte, el CLI hace referencia al cáncer que ha atravesado la pared del lobulillo y ha comenzado a invadir los tejidos de la mama, con el tiempo, puede difundirse hacia los ganglios linfáticos y posiblemente otras zonas del cuerpo. Si bien los carcinomas lobulillares invasivos pueden afectar a mujeres de cualquier edad, son más comunes en mujeres mayores de 60 años.

Desde otro punto de vista, considerando los avances en los tratamientos, ha sido necesaria una estratificación aún más precisa del CaM dando lugar a otro sistema de clasificación que incorpora marcadores moleculares tales como receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), receptores de factor de crecimiento epidérmico humano ErbB2 (HER2/neu) y TP53 (Malhotra y col., 2010; Goldhirsch y col., 2013; Cho, 2016). A partir de estos marcadores el CaM se puede dividir en cuatro clases moleculares:

❖ **Luminal A**

Se caracteriza por presentar RE y RP positivos y HER2 negativo. Además presenta niveles bajos de ki-67 (<14%) y no presenta mutaciones en TP53. De todos los subtipos, este tumor es el que presenta mejor pronóstico.

❖ **Luminal B**

Este tipo de neoplasia presenta RE positivo y HER2 negativo y RP bajo o negativo ($\leq 20\%$). Comparado a los tumores Luminal A, este tipo tiende a presentar una mayor expresión de genes de proliferación (como Ki67) y mutaciones en TP53.

❖ **Subtipo HER2 enriquecido**

Presenta una sobreexpresión o amplificación de HER2, mientras que RE y RP se encuentran ausentes. Este tipo de tumor se encuentra entre el 15% y 25% de los cánceres de mama invasivos y muestran un mal pronóstico, aunque responden bien a los tratamientos anti-HER2.

❖ **Subtipo basal-epitelial**

Está caracterizado por la mínima expresión o ausencia de RE, RP y presentan baja expresión de HER2, son los llamados *triple negativo*. Presentan una alta expresión de citoqueratinas basales y expresión de genes de proliferación. Este tipo de tumor es el de peor pronóstico.

I.1.4. FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE MAMA

El CaM es una patología policausal y multifactorial que involucra factores dietarios, reproductivos, desequilibrios hormonales y genéticos (WHO/IARC, 2003). Se han identificado una serie de elementos que pueden aumentar el riesgo de desarrollar CaM a lo largo de la vida. Algunos son más importantes que otros y pueden variar con el tiempo. Sin embargo en la mayoría de las pacientes no es posible identificar factores de riesgo específicos aparte de la edad y el género (IARC, 2008; Lacey y col., 2009). En la Tabla 1 se pueden observar los más representativos.

TABLA 1. Factores de riesgo probable y establecido para el CaM. Adaptado de McPherson y col., 2000.

FACTOR	RIESGO RELATIVO	GRUPO DE ALTO RIESGO
Edad	> 10	Mayores
Edad de la menarca	3	Antes de los 11 años
Edad de la menopausia	2	Después de los 54
Edad del primer embarazo	3	A los 40 años
Historia familiar	≥ 2	CaM en pariente de primer grado, siendo joven
Enfermedad benigna previa	4-5	Hiperplasia atípica
Cáncer en la otra mama	> 4	
Dieta	1,5	Ingesta alta de grasas saturadas
Peso:		
Pre-menopáusica	0,7	IMC > 35
Pos-menopáusica	0,2	IMC > 35
Alcohol	1,3	Ingesta excesiva
Exposición a RI	3	Exposición anormal en jóvenes luego de los 10 años
Ingesta de hormonas exógenas:		
Anticonceptivos orales	1,24	Uso actual
Terapia de reemplazo hormonal	1,35	Uso por ≥10 años

Además, los antecedentes familiares son un factor de riesgo demostrado, entre un 5-10% de los casos en los que la mutación de algún gen (BRCA1, BRCA2 y otros) se transmite por herencia, la predisposición a padecer CaM se encuentra incrementada. Son relevantes cuando la paciente presenta (McPherson y col., 2000):

- Un familiar de primer grado (madre, hermana o hija) con CaM bilateral o con CaM y ovario.
- Un familiar de primer grado diagnosticado antes de los 40 años y un pariente masculino diagnosticado a cualquier edad.
- Dos familiares de primer o segundo grado diagnosticados antes de los 60 años. Familiar con cáncer de ovario a cualquier edad en el mismo lado de la familia.
- Tres familiares de primer o segundo grado con CaM y ovario en el mismo lado de la familia.

I.1.5. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

El CaM abarca múltiples entidades tumorales, cada una caracterizada por distinta morfología, comportamiento e implicancia clínica (Dai y col., 2016).

En el 2000, Hanahan y Weinberg propusieron seis características distintivas que definen el desarrollo de un tumor maligno y su diseminación en el organismo (Figura 4):

- 1) **Mantenimiento de señales replicativas.** Capacidad de inducir y sostener señales estimuladoras de crecimiento y proliferación de manera descontrolada.
- 2) **Evasión de señales de crecimiento.** Capacidad de evadir señales que regulan negativamente la proliferación celular, algunos dependen de la acción de genes supresores de tumores que se encuentran inactivados.
- 3) **Inmortalidad replicativa.** Potencial replicativo ilimitado por la acción de la telomerasa, que en la mayoría de los tumores se encuentra sobreexpresada, permite el crecimiento descontrolado, evadiendo la apoptosis o la senescencia.
- 4) **Resistencia a la muerte celular.** Evasión de la apoptosis, un ejemplo determinante de esto, son las mutaciones en TP53 o Bcl2, que dan lugar a dicha resistencia.
- 5) **Inducción de la angiogénesis.** Capacidad de inducir y mantener una nueva red vascular que irrigue el tumor, aportándole los nutrientes y el oxígeno necesario como también que puedan evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono.
- 6) **Capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis.** La célula invade los tejidos locales seguido de la intravasación a los vasos linfáticos y sanguíneos próximos, produciéndose luego la extravasación, las células escapan de la circulación y se introducen en el tejido distal, y si se dan las condiciones, se produce el crecimiento del tumor en la zona distal al tumor primario.

En el 2011, Hanahan y Weinberg realizan una actualización, en la que han identificado dos características adicionales del cáncer que están involucradas en la patogénesis de algunos y tal vez todos los cánceres y debido a que ninguna de las dos se ha generalizado y validado completamente, las presentan como *hallmarks* emergentes:

- 7) **Capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular.** Habilidad de reprogramar su metabolismo y la producción de energía incluso en ausencia de oxígeno a través de una glicólisis anaeróbica seguida de una fermentación láctica (efecto Warburg). Este tipo de metabolismo provoca que los intermediarios formados durante la glicólisis formen parte de rutas anabólicas, como aquellas en las que se sintetizan nucleósidos y aminoácidos. Esto facilita la biosíntesis de macromoléculas y orgánulos, necesarios para la formación de nuevas células (Vander Heiden y col., 2009).
- 8) **Evasión de la destrucción inmunológica.** Evasión de la detección y destrucción por el sistema inmune, en particular, por los linfocitos T citotóxicos CD8+ y B, macrófagos y células *natural killer* mediante la secreción de factores inmunosupresores.



FIGURA 4. Características o hallmarks del cáncer. Están compuestas por seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo tumoral, que juntas constituyen un principio organizador para poder comprender la complejidad de las enfermedades neoplásicas. Subyacentes a estas características, la inestabilidad genómica genera la diversidad genética que acelera su adquisición y la inflamación, promueve múltiples funciones de los *hallmarks*. En la última década, un progreso conceptual hizo incluir dos *hallmarks* a la lista: la reprogramación del metabolismo energético y evitar la destrucción inmune. Adaptación de Hanahan y Weinberg, 2011.

Además, los autores, han reportado que la adquisición de estas características dependen en gran parte de: **la inestabilidad genómica y la promoción de la inflamación tumoral**. La inestabilidad genómica conduce a la adquisición de alteraciones genéticas que favorecen la aceleración del proceso neoplásico y permiten la adquisición de otros signos distintivos del cáncer tratados anteriormente. La inflamación producida por las células del sistema inmune innato, puede dar lugar a la activación de otras capacidades distintivas del desarrollo tumoral, mediante la liberación de moléculas bioactivas (factores de crecimiento, de supervivencia, pro-angiogénicos, entre otros) al microambiente tumoral (DeNardo y col., 2010; Grivennikov y col., 2010; Qian y Pollard, 2010).

I.1.6. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

El tratamiento del CaM es un tema complejo y que se encuentra en continua revisión. A lo largo del tiempo se han experimentado cambios, desde el empleo de cirugías agresivas mutilantes (Halsted, 1894) hasta el concepto del CaM como enfermedad sistémica en el que predominan tratamientos locales más conservadores con amplia utilización de tratamientos sistémicos.

Los marcadores de inmunohistoquímica, junto a las variables clínico-patológicas, tales como el tamaño y grado del tumor, la afectación ganglionar, tipo histológico, y los márgenes quirúrgicos, se han utilizado ampliamente para el pronóstico, la predicción y la selección del tratamiento (Cheang y col. 2009; Vallejos y col., 2010).

En la actualidad se dispone de distintas herramientas terapéuticas, como la cirugía, quimioterapia, hormonoterapia y radioterapia.

I.1.6.1. Cirugía

En la mayoría de los casos de mujeres con CaM se emplea algún tipo de cirugía como parte del tratamiento. Esto dependerá del tamaño y localización tumoral (cirugía conservadora o mastectomía) y del compromiso ganglionar (biopsia de ganglio centinela o disección de ganglio linfático axilar).

Hay dos tipos principales de cirugías para la extracción del tumor mamario:

- La **mastectomía radical convencional**, en la cual se realiza la resección total de la mama (se remueve el pezón, la areola y el tejido mamario) y los músculos pectorales. Dentro de esta se encuentra la **Mastectomía radical modificada (MRM)** que es similar a la mastectomía radical pero con disección de los ganglios linfáticos axilares.
- En la **cirugía conservadora** (tumorectomía, cuadrantectomía o mastectomía parcial) se extirpa solamente el tumor con márgenes libres de tejido mamario adyacente confirmados tras el estudio patológico, reduciendo el riesgo de que el cáncer vuelva a crecer.

Además, mediante **Biopsia del ganglio centinela** se determina si hay células tumorales en los ganglios linfáticos de la axila. Sólo se elimina el ganglio (s) linfático que drena el líquido de la mama (ganglio centinela), los ganglios restantes se dejan. Esto reduce significativamente el riesgo de desarrollar un problema de inflamación crónica llamado linfedema. Si se encuentra cáncer en más ganglios centinela, se deberá determinar si se deben remover más ganglios.

I.1.6.2. Quimioterapia

La quimioterapia (QT) es un tratamiento sistémico que se administra, en general, tras la cirugía de mama como tratamiento complementario, con el objeto de prevenir la aparición de metástasis (QT adyuvante). En otras ocasiones, se administra como primer tratamiento con la finalidad de disminuir el tamaño del tumor (quimioterapia neoadyuvante). También se aplica en pacientes con CaM avanzado o metastásico.

En la mayoría de los casos la QT es más eficaz cuando se usan combinaciones de más de un medicamento. En etapas iniciales del CaM, los medicamentos más usados incluyen: Antraciclinas, Taxanos, 5-fluorouracilo (5-FU), Ciclofosfamida, Carboplatin. Con más frecuencia, se usan conjuntamente las combinaciones de 2 o 3 de estos medicamentos. Para el tratamiento del CaM avanzado, se trata con más frecuencia con Docetaxel, Paclitaxel, así como con algunas combinaciones (carboplatino o cisplatino y gemcitabina). Se puede usar uno o más medicamentos que ataquen a la HER2 con QT para tumores que son HER2-positivos.

I.1.6.3. Hormonoterapia

Alrededor de dos de cada tres carcinomas de mama presentan receptores que se unen al estrógeno (cánceres RE-positivo) y/o progesterona (cánceres RP-positivo). En estos casos, los niveles altos de estas hormonas potencian el crecimiento y la propagación del tumor. La alternativa terapéutica para estos cuadros consiste en la administración sistémica de fármacos que bloquean la acción de los estrógenos sobre las células tumorales, impidiendo su proliferación.

La hormonoterapia se emplea con más frecuencia después de la cirugía para reducir el riesgo de que el cáncer reincida, también se puede iniciar antes de la cirugía para reducir el tamaño tumoral.

Existen diversos fármacos disponibles. El Tamoxifeno, es el más conocido, actúa bloqueando los receptores de estrógeno en las células de mama. Se administra durante 5 a 10 años, tras la cirugía, en mujeres con tumores en estadios precoces y pre-menopáusicas. Los inhibidores de la aromatasa como el Anastrozol, Letrozol y Exemestano bloquean la enzima aromatasa que se encuentra en el tejido adiposo y es el responsable de la elaboración de los estrógenos en las mujeres post-menopáusicas, por lo que solo se emplean en dichas mujeres y se deben administrar al menos durante 5 años. Otros fármacos hormonales utilizados son los antiestrógenos puros (Fulvestrant, Toremifeno). Por último, para las pacientes pre-menopáusicas existen fármacos que producen una castración química como el Goserelin y el Leuprolide.

I.1.6.4. Radioterapia

La RT se emplea tras la cirugía conservadora y ocasionalmente tras la mastectomía con el objetivo de eliminar de la zona quirúrgica las posibles células tumorales remanentes. Según la finalidad con que se emplee, la RT puede ser profiláctica para reducir el riesgo de recidiva local (mama o pared costal) y/o regional (ganglios) o paliativa para aliviar síntomas provocados por el CaM o las metástasis.

I.2. RADIOTERAPIA ONCOLÓGICA

En la actualidad, la RT es uno de los tratamientos oncológicos más importantes. Aproximadamente el 60% de los pacientes diagnosticados con esta patología, requieren de este procedimiento durante el curso de su enfermedad (Bentzen, 2006; Burnet y col., 2006). Esta modalidad terapéutica utiliza radiaciones ionizantes (RI) de manera curativa y en la efectiva paliación o prevención de los síntomas de esta patología. Su objetivo es administrar una dosis de radiación, entregada con precisión a un volumen tumoral definido con el menor daño posible al tejido sano circundante, dando como resultado la erradicación del tumor y la prolongación de la supervivencia (*Committee for Radiation Oncology Studies, 1986*) (Figura 5).

Si bien el éxito en la eliminación del tumor depende principalmente de la dosis total de radiación entregada, la misma, se ve limitada por la tolerancia del tejido normal adyacente (Barnett y col., 2009). Las dosis se administran generalmente de modo que <5% de los pacientes sufran efectos tóxicos hasta 5 años después de la RT. Los esquemas del tratamiento, como la dosis total, la dosis por fracción, número de fracciones, el tiempo de tratamiento y el volumen irradiado, se han ido desarrollando de manera empírica para maximizar su efectividad y optimizar su rendimiento (Emami y col., 1991; Bentzen y col., 2010). En términos sanitarios, su eficacia radica en la alta rentabilidad, dado que representa solo el 5% del costo total de la atención oncológica (Barnett y col., 2009). En consecuencia, su impacto social es de gran alcance y se constituye como la piedra angular de la oncología moderna (Bentzen, 2006).

A pesar de que se han realizado mejoras sustanciales en la relación terapéutica (equilibrio entre curación y toxicidad del tratamiento) a través del desarrollo de las nuevas tecnologías, tales como la RT guiada por imágenes o la RT de intensidad modulada (Barnett y col., 2009) entre otras, es imperativo un enfoque celular y molecular que permita optimizar los tratamientos desde la perspectiva biológica (Güerci y Córdoba, 2015).

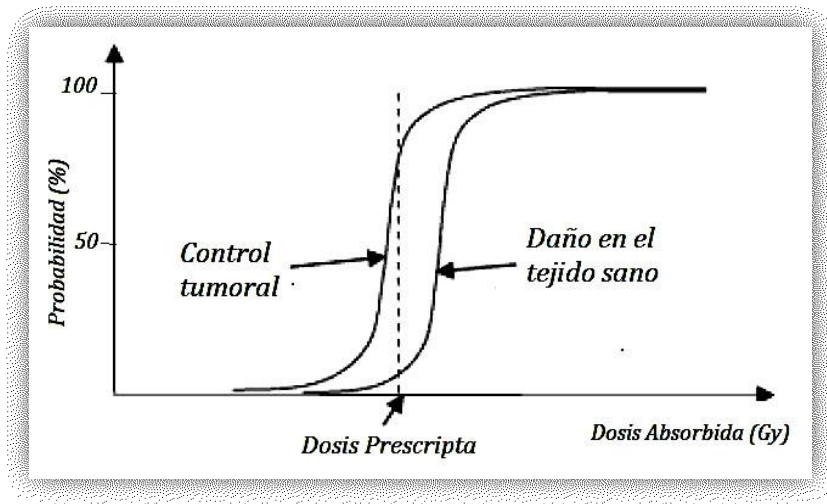


FIGURA 5. Curvas dosis- respuesta para RT. La probabilidad del control tumoral aumenta con la dosis de radiación. Debido a que un pequeño volumen de tejido normal es incluido en el campo de radiación, la probabilidad de daño también aumenta. Los esquemas de RT se han desarrollado para maximizar el control del tumor y minimizar la toxicidad, de modo que < 5% de los pacientes sufra toxicidad grave.

I.2.1. RADIACIONES IONIZANTES

Las RI consisten en un flujo de fotones (rayos x o γ) o partículas cargadas (partículas α , β o neutrones). Se caracteriza por su capacidad de excitar o ionizar átomos de la materia con la cual interactúan (Attix, 1986). Cuando un átomo recibe un aporte energético y los electrones pasan de una capa interna a una capa más externa se produce la excitación; en cambio, si el electrón es separado completamente del átomo se produce la ionización.

En RT generalmente se utilizan fotones de alta energía (>1,24MV). La interacción con la materia ocurre a nivel atómico y de manera aleatoria, siendo capaz de alterar la estructura molecular del ADN; dada la relevancia de esta estructura para las funciones celulares, se constituye en el blanco clave del tratamiento a nivel celular (IARC, 2001).

I.2.2. PROCESO DEL TRATAMIENTO

Cada paciente que ingresa a un servicio de RT atraviesa una serie de diferentes etapas, en las que intervienen profesionales de distintas disciplinas (radioterapeutas, físicos médicos, técnicos, ingenieros y dosimetristas). Estas etapas aluden, en primera instancia, al conocimiento y extensión de la enfermedad (estadio) del paciente. Luego, se determina el tipo de tratamiento que se realizará según su objetivo: radical (definitivo), adyuvante o paliativo. La planificación del tratamiento comienza con la obtención de imágenes (TC, RM, TEP), las cuales permiten la delimitación precisa del volumen blanco a tratar, sobre el que se prescribe una dosis de radiación y simultáneamente una dosis de tolerancia de los órganos en riesgo. Posteriormente se establecen los campos del tratamiento procurando maximizar estos dos

conceptos fundamentales. A través de los histogramas dosis-volumen (HDV) se analiza el plan terapéutico propuesto (Dávila y Romero, 2009; Brosed, 2011).

Antes de la administración del tratamiento, se evalúa la reproducibilidad del posicionamiento del paciente (simulación) y la verificación de la inmovilización en la unidad de tratamiento. Finalmente, para mantener el control de calidad durante el curso de la RT se verifica el mismo periódicamente a través de las imágenes portales (Dávila y Romero, 2009).

Para estos tratamientos se requieren dosis altas de radiación (20-80 Gy), comparadas a las dosis utilizadas para radiodiagnóstico que varían desde aproximadamente 10^{-4} a 10^{-2} Gy (Khan, 2010).

I.2.3. TIPOS DE TRATAMIENTOS RADIANTES EN MAMA

La RT tiene un impacto significativo en el control loco-regional de la enfermedad. Se ha establecido como una modalidad efectiva en el tratamiento de conservación de la mama, como tratamiento adyuvante pos-mastectomía y paliativo (Haffty y col., 2009).

Las diferentes técnicas utilizadas dependerán del tipo de cirugía y de la ubicación y extensión del tumor; y en caso de ser necesario un tratamiento quimioterapéutico, se administra de manera previa.

I.2.3.1. RT en el tratamiento conservador

Esta terapia incluye cirugía conservadora seguida de RT, es considerada como el procedimiento de elección en el manejo del carcinoma invasivo de mama en estadio precoz (Fisher y col., 2002; Poggi y col., 2003) en el CDIS (Fisher y col., 1993) y eventualmente en el CLIS.

❖ RT convencional sobre volumen mamario total

La RT convencional a toda la mama, se considera como el tratamiento estándar. La radiación se administra a la glándula mamaria, sin importar el volumen tumoral detectado, excepto en algunas mujeres mayores de 70 años con tumores más pequeños y menos agresivos. Se administra usando la técnica de haz externo, utilizando campos tangenciales opuestos con fotones de 4-6MV. El tratamiento se realiza en aplicaciones diarias de 1,8-2Gy (de lunes a viernes) durante 5 semanas, hasta completar una dosis total de 50-50,4Gy. Ocasionalmente puede haber una sexta semana para dar una dosis adicional a la zona de la cirugía (*boost*) de 12-18Gy (Haffty y col., 2009).

Ocasionalmente, también se aplica radiación en algunos de los ganglios linfáticos (axilar y/o supraclavicular), con resultado positivo en el estudio histopatológico.

❖ RT convencional en mama parcial

Otro enfoque para el tratamiento conservador, es tratar únicamente el área de la cavidad quirúrgica, dado que la mayoría de los pacientes que tienen recurrencia, la tienen en o cerca de esta cavidad. De esta manera se minimiza la exposición a la radiación para el resto de la mama, pared torácica, corazón y pulmones. Este enfoque, llamado "irradiación parcial de la mama acelerado" (*Accelerated Partial Breast Irradiation- APBI*), se utiliza generalmente para tratar a mujeres mayores de 45-50 años, que presentan tumores pequeños, en estadios tempranos, que han sido completamente extirpados y que no presentan ningún tipo de cáncer en los ganglios linfáticos axilares (Haffty y col., 2009, Smith y col., 2009). El tratamiento es acelerado porque utiliza fracciones diarias mayores a 2Gy administradas en menos de 5 semanas, en lugar de las 5-6 semanas de RT de haz externo tradicional. Se puede realizar con radiación de haz externo, RT intraoperatoria o alternativamente con radiación interna (braquiterapia). Esta última, es más invasiva, debido a que utiliza catéteres o un balón inflable dentro de la cavidad quirúrgica para entregar la radiación, limitando aún más la dosis a las estructuras circundantes normales (Njeh y col., 2010).

❖ RT por hipofraccionamiento

En la actualidad existe gran interés en esquemas hipo-fraccionados. Los modelos radiobiológicos sugieren que una dosis diaria mayor administrada en un tiempo más corto (hipofraccionamiento) podría ser igual de eficaz que los tratamientos estándar (Koulis y col., 2015). Se han reportado tasas bajas de recurrencia local y morbilidad limitada inducida por radiación con estos enfoques. Los esquemas utilizados oscilan entre 40- 44 Gy, con fracciones diarias de 2,5- 2,7 Gy (Whelan y col., 2010).

La ventaja de estos tratamientos es incorporar entre el 20-25% de las pacientes que no acuden al tratamiento convencional por diversas razones como la demora en el inicio de las sesiones dada la escasez de equipos, problemas logísticos (distancias excesivas) y la duración del tratamiento convencional que implica entre 30 a 35 fracciones (Ko y col., 2011).

Si bien el número de trabajos que describen el uso de estos esquemas se encuentra en aumento, no están claros sus fundamentos y quedan por dilucidar muchas cuestiones. Se cree que la eficacia es la misma que para el tratamiento convencional aunque aún se aguarda confirmar la toxicidad tardía.

I.2.3.2. RT adyuvante pos-mastectomía

Esta modalidad es utilizada de rutina en pacientes con ganglios axilares positivos y negativos y en aquellos con un moderado a alto riesgo de recaída loco-regional (Haffty y col., 2009). Mediante estudios prospectivos y retrospectivos se ha demostrado que en tumores primarios mayores de 5cm y/o si hay afectación de 4 o más ganglios, existe un alto riesgo de

recáida loco-regional y en estos casos, se debe considerar el empleo de RT para minimizar el riesgo de recidivas (Pierce y col., 1999; Bartelink, 2000; Overgaard y col., 2007). Aún en pacientes que hayan recibido altas dosis de QT las recidivas son un problema significativo si no se emplea irradiación (Haffty y col., 2009). Además, se tienen en cuenta factores como el grado tumoral, la invasión de los espacios linfovascuales dentro del tumor, los márgenes quirúrgicos y la edad del paciente.

Para el tratamiento de estas pacientes se deben utilizar técnicas elaboradas para evitar la superposición entre los campos adyacentes y minimizar la dosis del tejido pulmonar y cardiaco adyacente (Bartelink, 2000; Recht y col., 2003). Se considera como estándar la irradiación de la pared costal, utilizando campos tangenciales o un campo directo con electrones. Usualmente se utilizan dosis de 1,8-2Gy diariamente, hasta una dosis total de 50Gy. El empleo de una dosis de refuerzo a la cicatriz de la mastectomía (*boost*) no se considera obligatorio en pacientes con márgenes negativos. En la mayoría de los casos, también se requieren tratamiento en la fosa supraclavicular región axilo-supraclavicular o áreas ganglionares (Haffty y col., 2009).

I.2.3.3. RT como tratamiento paliativo

La RT tiene un importante rol paliativo en pacientes con estadíos avanzados o con metástasis, especialmente metástasis óseas dolorosas. El objetivo principal es el control de los síntomas y complicaciones producidos por la enfermedad a nivel local y a distancia, contribuyendo a mejorar la calidad de vida del paciente con una toxicidad aceptable. Por lo tanto sus indicaciones dependen de cada caso individual (Sola, 2006; Haffty y col., 2009).

I.2.4. FUNDAMENTOS CELULARES Y MOLECULARES DE LA RT

Los efectos biológicos de las RI, se clasifican tradicionalmente como efectos estocásticos y determinísticos, siendo los eventos sobre los que se sostienen, la mutación y la muerte celular, respectivamente (Güerci y Córdoba, 2015).

El efecto más nocivo de la interacción de la radiación con las células es el daño al ADN. El mismo se puede producir a través de la acción directa de la radiación sobre la molécula o indirectamente mediante la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno, del inglés *Reactive Oxygen Species*) (Figura 6). La interacción de la radiación con el tejido provoca ionizaciones a lo largo de su trayectoria que inducen la formación de radicales libres, altamente reactivos con la capacidad de modificar enlaces químicos (West y Barnett, 2011). El fenómeno primario de ionización se produce dentro de los 10^{-16} segundos. Consiste en la eliminación de un electrón del conjunto electrónico y da origen a la formación de un radical libre. En los sistemas biológicos, el agua representa el 70- 80% del peso y es el blanco

principal de las RI. El radical catión agua y su base conjugada el radical hidroxilo, son las especies radicalarias más tóxicas para los sistemas biológicos.

Una irradiación puede inducir distintas lesiones en el ADN según el componente de la molécula involucrado: daño de base, ruptura de cadena simple (SSB, del inglés *Single Strand Break*), ruptura de cadena doble (DSB del inglés *Double Strand Break*) y entrecruzamientos de ADN-ADN o ADN-proteína. Entre estas lesiones las DSBs son las de mayor importancia, ya que su reparación es más compleja (O'Driscoll y Jeggo, 2006). Este daño no reparado o mal reparado puede ser letal o mutagénico. Una simple DSB no reparada podría ser letal si se inactiva un gen crítico o desencadena la apoptosis. Aproximadamente se inducen 40 DSBs/Gy, siendo reparadas la mayoría de ellas (Martin y col., 2010).

Durante las dos últimas décadas, una exhaustiva investigación en el área ha permitido proponer nuevos mecanismos que permiten explicar efectos particulares de la exposición a las RI. La citotoxicidad directa, como la primera vía de daño, se ha ido complementando con fenómenos más complejos e integrales como el efecto *bystander* o la inestabilidad genómica.

En condiciones de estrés ambiental, las ROS inducen una injuria celular que produce infiltración de los linfocitos y macrófagos con liberación de citoquinas y estimulación fibroblástica, que a su vez, deriva en la producción cíclica de ROS. De esta manera, a través de una señalización sistémica, el sistema inmune constituye un elemento fundamental para explicar los efectos a nivel del organismo (Güerci y Córdoba, 2015). Este enfoque holístico permite interpretar a los tratamientos radioterapéuticos a través de la patogénesis sostenida en el tejido normal entendida como un proceso de interacción entre diferentes elementos celulares y moleculares (Kim y col., 2014).

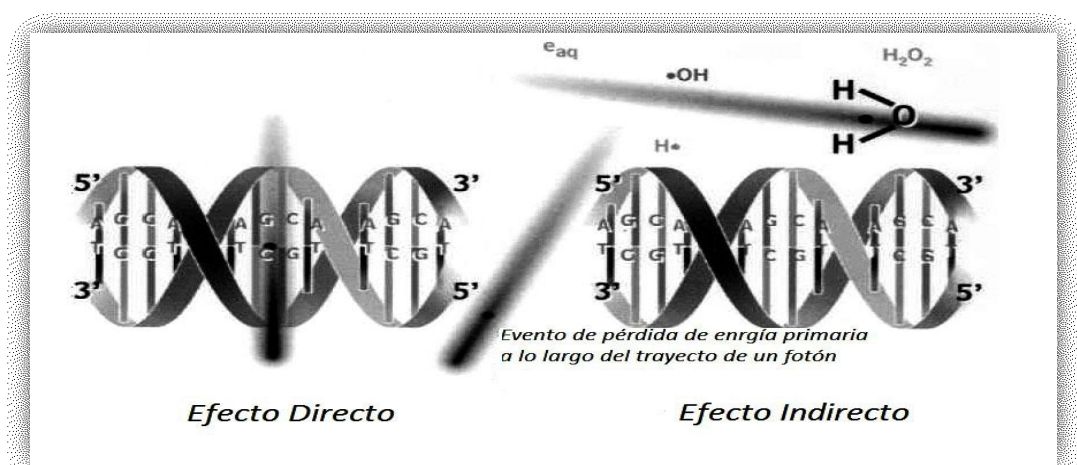


FIGURA 6. Mecanismos de acción de la interacción de la radiación con el ADN. El efecto directo de las RI ocurre cuando un fotón interactúa directamente con la molécula de ADN provocando su ionización. Por otro lado, el efecto indirecto ocurre a través de la interacción de la RI con el agua, generando moléculas intermediarias con gran reactividad química (radicales libres), que dan lugar a mecanismos secundarios de daño. Adaptación de Pérez y col., 2004.

I.2.5. RADIOSENSIBILIDAD CLÍNICA

La radiosensibilidad clínica es definida como la radiosensibilidad individual, medida como el nivel de toxicidad debido a la RT (West y Barnett, 2011; AGIR, 2013). Esta respuesta presenta una gran variabilidad de paciente a paciente, a pesar de la utilización de protocolos uniformes; se manifiesta en un rango de toxicidad que varía de menor a severa y de semanas a toda la vida (Bentzen, 2006). No obstante, no todas las pacientes desarrollan radiotoxicidad (Hopwood y col., 2010).

Los efectos secundarios de estas terapias ocurren típicamente en los sitios irradiados y pueden ser numerosos, variables y sitio-dependientes y se manifiestan especialmente en la piel (Fisher y col., 2000; McQuestion, 2006). La piel está compuesta por una capa externa, la epidermis y una capa subyacente de tejido conjuntivo, la dermis. La capa epidérmica mide de 30 a 300 μm de espesor y deriva de una capa basal de células madre. Estas células proliferan y emigran a la superficie hasta desprenderse, en aproximadamente catorce días. La capa dérmica tiene entre 1 y 3 mm de espesor y está compuesta por una capa papilar y una reticular más profunda. La dermis se compone de fibras de colágeno, fibroblastos y microvasos que nutren la epidermis (Hopewell, 1990; Archanbeau y col., 1995; White y Joiner, 2006).

La secuencia de cambios en la piel puede ocurrir con los esquemas y dosis de tratamientos radiantes antes mencionados. De acuerdo al momento de aparición, estos efectos se clasifican en agudos y tardíos.

Los efectos agudos o tempranos ocurren durante el tratamiento o hasta seis meses después de completado el mismo y por lo general son reversibles. Estos se manifiestan como eritema, dermatitis, descamación, depilación y ulceración (West y Barnett, 2011). Son procesos dinámicos que permiten la conversión de las lesiones con un aumento creciente de complejidad (Porock y col., 2002; Harper y col., 2004). La reacción inflamatoria, libera sustancias que causan edema dérmico y eritema cutáneo por la permeabilidad y dilatación de los capilares. La sequedad y la depilación resultan de la destrucción de las glándulas sebáceas y los folículos pilosos de la capa dérmica. La piel se hiperpigmenta debido a la estimulación de los melanocitos epidérmicos. La descamación seca se desarrolla debido a que las células madre de la capa basal se agotan en el área tratada, se caracteriza clínicamente por descamación y prurito. La descamación húmeda resulta si todas las células madre son erradicadas de la capa basal y se distingue por exposición de la dermis y exudación serosa (Hopewell, 1990; Archanbeau y col., 1995; White y Joiner, 2006). Además de cambios en la piel, algunas pacientes también pueden experimentar fatiga media a severa como producto de la RT (White y Joiner, 2006).

Por otro lado, los efectos tardíos pueden ser permanentes y se producen a partir de seis meses a varios años después de la terapia como consecuencia de un daño permanente en la dermis. Estos cambios incluyen la atrofia, fibrosis, telangiectasias y alteraciones en la pigmentación (Barnett y col., 2009; Terrazzino y col., 2011).

En relación a esta variabilidad inter-paciente, se atribuyen como elementos causales factores tanto extrínsecos, como intrínsecos. Entre los primeros se incluyen: los relacionados a la física (dosis de radiación, tasa de dosis, dosimetría, inhomogeneidad de dosis y volumen de tratamiento); al tratamiento (interacción con otras terapias como cirugía, QT y hormonoterapia) y al paciente (edad, hemoglobina, tabaco, comorbilidades como la diabetes y enfermedades vasculares). Y entre los segundos, los factores genéticos surgen como causa importante.

De acuerdo a lo expuesto el 80% de la variación individual fue inexplicable por factores extrínsecos (Burnet y col., 1998; Barnett y col., 2015), aumentando la posibilidad de una base genética como su causa principal (Andreassen, 2002; Burnet y col., 2013). En adición, un análisis de heredabilidad sugirió que el 58- 78% de la radiosensibilidad puede ser atribuida a factores genéticos (Finnon y col., 2011). De esta manera, en torno al cambio de siglo, hubo un consenso creciente en que este fenotipo debe ser considerado como un rasgo multifactorial y poligénico que depende de la influencia combinada de alelos de riesgo con frecuencias y riesgos relativos diferentes (Andreassen y col., 2002, Burnet y col., 2006).

1.2.6. ENSAYOS DE RADIOSENSIBILIDAD

Desde hace décadas, varios grupos de investigación han invertido tiempo y esfuerzo en desarrollar técnicas para predecir la radiosensibilidad del tejido sano en los pacientes. Inicialmente, estos estudios se realizaron utilizando cultivos celulares, especialmente fibroblastos cultivados a partir de piel o linfocitos de sangre periférica de pacientes (Smith y col., 1980; Woods y col., 1988; West y col., 2001). A partir de estas muestras, la técnica estándar ha sido el Ensayo clonogénico que permite evaluar la capacidad proliferativa celular. Estos estudios mostraron una amplia gama de sensibilidad, en parte, debido a la inclusión de pacientes con síndromes asociados a genes que participan en el reconocimiento y reparación del daño al ADN, causando radiosensibilidad celular y clínica severa (Barnett y col., 2015). Puesto que su desarrollo precisa de mucho tiempo, el interés se trasladó a la investigación de ensayos más rápidos con mayor utilidad clínica. Los principales incluyen: ensayos de daño cromosómico, como el de micronúcleos y ensayos de linfocitos en fase G2 (Barber y col., 2000; Djuzenova y col., 2006); el ensayo cometa (Twardella y col., 2003; Di Giorgio y col., 2004), evaluación de la apoptosis; la capacidad de los fibroblastos de someterse a la diferenciación radio-inducida; y la alteración en la longitud de los telómeros. Las

combinaciones de estos ensayos también se probaron; no obstante, ninguno de estos métodos se ha podido validar en un entorno clínico debido a varias razones. Los ensayos no han sido estandarizados y ha habido poco o ningún intento de garantizar la transferibilidad entre laboratorios. Además, la replicación y la validación de los estudios rara vez se han llevado a cabo (AGIR, 2013).

Hacia el final de los '90s, el interés se centró cada vez más en la investigación de la variación genética, posiblemente por los avances de la genética, la biología molecular y la bioinformática, proponiéndose que los estudios de la radiosensibilidad deberían estar basados en el genotipo de los pacientes, en lugar de los aspectos fenotípicos, tales como la radiosensibilidad celular, dando origen al nuevo enfoque de la radiogenómica (Andreassen y col., 2002).

I.3. RADIOGENÓMICA

Esta disciplina estudia la variación genética asociada con la respuesta a la RT. Tiene como objetivo determinar las vías biológicas y los genes responsables de la toxicidad de la RT, con el fin de identificar marcadores genéticos que puedan ser utilizados en modelos de predicción de riesgo en la clínica (Kerns y col., 2014b).

La evidencia inicial de la base genética de la radiosensibilidad proviene de la observación de que ciertos individuos con trastornos genéticos, tales como ataxia telangiectasia, síndrome de Nijmegen y anemia de Fanconi eran extremadamente sensibles a la radiación (Gatti, 2001). Estos se caracterizan por presentar una herencia mendeliana de genes implicados en la detección y reparación de daño al ADN. Sin embargo, se limitan a familias particulares y son poco relevantes en la evaluación de la radiosensibilidad de la gran mayoría de pacientes con cáncer expuestos a RT (Barnett y col., 2009).

Es evidente que la variación genética heredada es importante en la determinación de la radiosensibilidad del paciente. Sin embargo, la complejidad del modelo genético que subyace a esto es desconocida y varía de una sola mutación rara con un gran efecto (tal como una mutación en ATM) a una combinación de múltiples variantes comunes que juntas confieren un aumento de la sensibilidad. Es probable que participen una gama de alelos de distintas frecuencias y de tamaños de efecto diferentes (Barnett y col., 2009; Kerns y col., 2014a).

I.3.1. RUTAS BIOLÓGICAS ASOCIADAS CON LA RADIOSENSIBILIDAD

Dado que la terapia radiante ejerce sus efectos citotóxicos a través de lesiones en el ADN, las células han desarrollado vías de respuesta (Chang Claude y col., 2009; Guo y col., 2015) (Figura 7).

La DDR (*Damage DNA Response*) es el factor clave de la radiosensibilidad que decide el destino celular. La alternativa varía entre la reparación del ADN y la activación de la apoptosis, a través de múltiples vías de transducción de señales (Zhao y col., 2013; Hoyosa y Miyagawa, 2014). La activación de los puntos de control por el daño al ADN, arresta el ciclo celular, ya sea en G1/S o G2/M, permitiendo la ejecución de los mecanismos de reparación que posibilitan la restauración de la molécula (Smith y col., 2010).

Diferentes mecanismos de reparación del ADN podrían estar implicados en la resolución de los distintos tipos de lesiones radioinducidas; en este sentido, las DSBs se resuelven a través de la recombinación homóloga (HR, del inglés, *Homologous Recombination*) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ del inglés *Non-homologous DNA End Joining*); en tanto, los que intervienen en la reparación de SSBs son los de reparación por escisión de base (BER, del inglés *Base Excision Repair*), reparación por escisión de nucleótido (NER, del inglés *Nucleotide Excision Repair*), entre otros (Jeggio y Löbrich, 2006). En la figura 7 se pueden observar algunos de los genes involucrados en estas vías, cuyas variantes han sido ampliamente investigadas dado su impacto en el establecimiento de la radiosensibilidad individual (Patrono y col., 2014).

Por otro lado, la RT ejerce efectos antitumorales a través del aumento de ROS y RNOS. El estrés oxidativo que resulta de un exceso de ROS/RNOS y/o la disminución de niveles antioxidantes, provoca la muerte celular de manera directa, a través de daño masivo o indirectamente a través de la desregulación del ciclo celular (Mignotte y col., 1998). La sobreexpresión o la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes pueden reforzar la eficacia de la RT (Seibold y col., 2013). Por lo tanto, es plausible que variantes polimórficas en estas enzimas podrían influir en el desarrollo de efectos secundarios que se dan por los tratamientos radioterapéuticos (Popanda y col., 2009) (Figura 7).

Un hallazgo elocuente es el papel desempeñado por ATM también está involucrado en la protección de las células contra la acumulación de ROS mediante la estimulación de la producción de NADPH y la síntesis de nucleótidos para la reparación de DSBs. Esto destaca la compleja interacción entre las múltiples respuestas moleculares inducidas por las RI (West y Barnett, 2011).

Estudios recientes han puesto de relieve el papel de la respuesta inflamatoria y la producción de citoquinas en la patogénesis del daño del tejido normal inducido por radiaciones. Las células intervinientes, especialmente los macrófagos, inducen una reacción

que se asocia con el aumento de la expresión de diversas citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se incluyen, la interleuquina (IL) -1- α , IL-1- β , factor de necrosis tumoral (TNF- α), IL-6 e IL-8. También se observa un aumento en los niveles de TGF- β , que conduce a la expresión de colágeno y fibrosis (Rosen y col., 2000).

De acuerdo a lo expuesto, es tácito que variantes alélicas en los genes que participan en estas vías, pueden ser un elemento clave en el establecimiento de la radiosensibilidad individual.

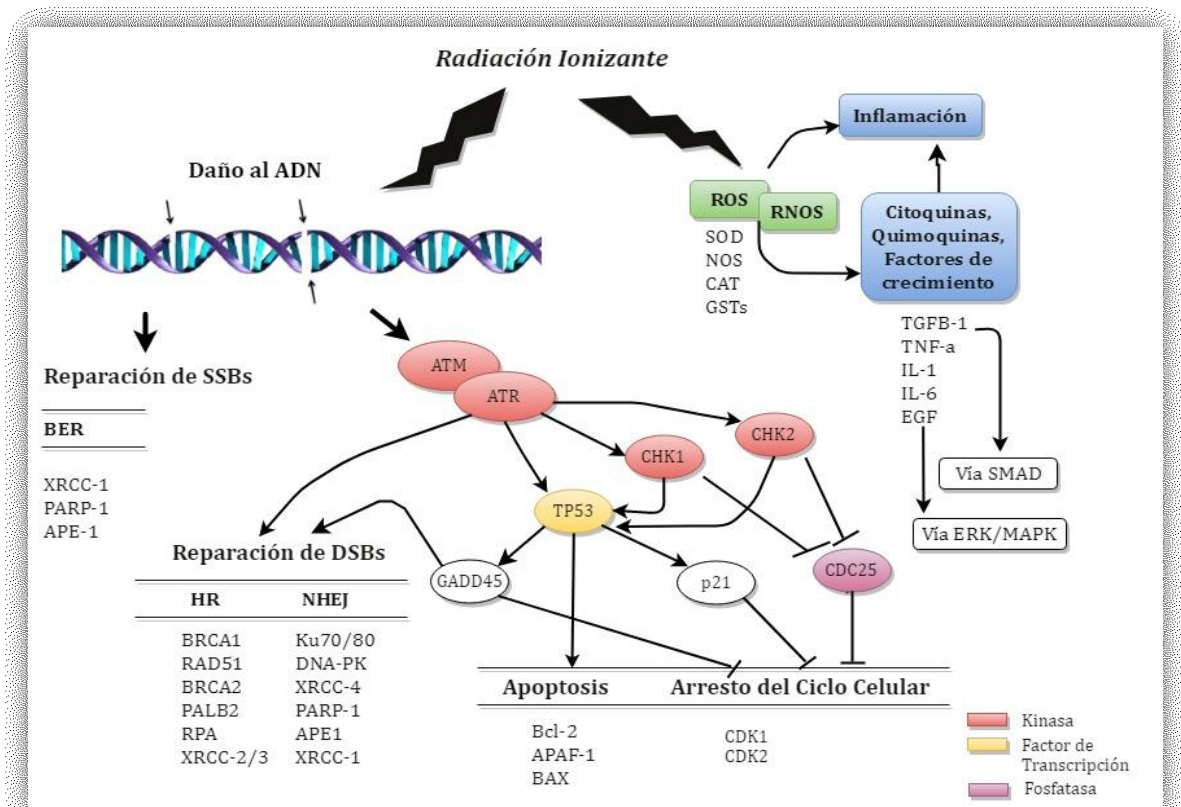


FIGURA 7. Esquema simplificado de los mecanismos y vías involucradas en la respuesta celular y tisular de la RT. La interacción de las RI con el tejido puede llevar a múltiples tipos de daño en el ADN (SSBs, DSBs, entre otros). Las DSBs son las lesiones radioinducidas más importantes y más difíciles de reparar. Entre los mecanismos de reparación de DSBs se encuentran los de Recombinación Homóloga (HR- *Homologous Recombination*) y unión de extremos no homólogos (NHEJ)- *Non-Homologous End Joining*). Las RI también producen ROS y RNOS que estimulan la respuesta de citoquinas, factores de crecimiento y quimoquinas. Existen múltiples redes de señalización interconectadas que responden al daño inducido por la radiación que puede conducir a la muerte celular, senescencia celular, inestabilidad genómica, mutaciones, respuesta inflamatoria y efecto bystander. En la figura se muestran algunos de los genes claves involucrados en estos procesos. Información tomada de West y Barnett, 2011; Guo y col., 2015; www.genecards.org.

I.3.2. GENES CANDIDATOS

Una manera de abordar el estudio de la variabilidad genética involucrada en la determinación de la radiosensibilidad individual, es a través de la identificación de *SNPs* (polimorfismos de base simple) en genes candidatos (Barnett y col., 2015). Este enfoque tiene la ventaja de que utiliza el conocimiento *a priori* de las vías biológicas implicadas en la respuesta a la radiación, limitando así el alcance de los estudios a un número específico de genes (Kerns y col., 2014b).

Estos polimorfismos comienzan como el cambio en una base (mutación puntual) que al alcanzar una frecuencia de al menos el 1% en la población se denomina *SNP*, con alternancias menos prevalentes conocidas como "variantes raras" (West y Rosenstein, 2010). Estas variantes comunes son la mayor fuente de variabilidad genética entre los individuos. En el proyecto de "1000 Genomas", realizado para una variedad de ascendencias, se observó que existen aproximadamente 84,7 millones de *SNPs*, que representan >99% de las variantes totales (88 millones) (1000 *Genomes Project Consortium*, 2015).

De acuerdo a sus posibles efectos funcionales, estos polimorfismos se pueden subdividir en distintas clases. Si está localizado en una región codificante, la variante puede resultar en un cambio de aminoácido y alterar la secuencia de la proteína (*SNP* no sinónimo). La variante también puede ser funcional aunque no haya cambio de aminoácido (*SNP* sinónimo), ya que puede alterar la estabilidad del ARNm. Los *SNPs* en las regiones intergénicas o intrones también pueden ser funcionales si alteran los sitios de empalme (*splicing*), o si interrumpen o crean nuevos sitios de unión a factores de transcripción o sitios que actúan como potenciadores o silenciadores de la transcripción (Conde Lagoa, 2007).

Estos cambios podrían conducir a la expresión de diferentes grados de sensibilidad clínica a la radiación. Si bien se han realizado diversos estudios, informando asociaciones significativas, entre *SNPs* y radiosensibilidad, en un número limitado de pacientes, los resultados han sido inconsistentes a nivel mundial (Alsbeith, 2013).

I.3.3. GENES DE ESTRÉS OXIDATIVO

I.3.3.1. Genes GSTP1 y GSTA1 (Glutación S-transferasa p1 y a1)

Las proteínas Glutación S-transferasas (GSTs), son una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, eliminando xenobióticos o sustancias nocivas para las células. Catalizan la conjugación de muchos compuestos hidrofóbicos y electrófilos con glutatión reducido (GSH). Sobre la base de sus propiedades bioquímicas, inmunológicas y estructurales, las GSTs solubles se clasifican en 4 clases principales: alfa, mu, pi, y theta (NCBI, 2008).

El gen *Glutación S- transferasa P1* (GSTP1) se localiza en el cromosoma 11q13 y está comprendido por 7 exones y 9 intrones. Codifica funcionalmente diferentes proteínas activas, que participan en la susceptibilidad al cáncer y otras patologías. La sustitución de una isoleucina por una valina en la posición 105 de la proteína conduce a una actividad enzimática disminuida o suprimida (Cotton y col., 2000).

Por otro lado la *glutación S- transferasa A1* (GSTA1) tiene un papel particular en la protección celular de las ROS y de los productos de la peroxidación. Los polimorfismos en este gen influyen en la capacidad de los individuos para metabolizar diferentes fármacos. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (6p12.2) y está compuesto por 7 exones. Ambas proteínas participan en la detoxificación por la neutralización de ROS.

I.3.3.2. Gen SOD2 (Superóxido dismutasa 2)

La superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), es un miembro de la familia de las superóxido dismutasa de hierro/manganeso. Juega un papel crucial en los mecanismos de defensa endógena contra las ROS, convierte los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. No obstante, si el peróxido de hidrógeno no se elimina posteriormente por otras enzimas de defensa antioxidante, puede contribuir a la generación de ROS catalizada por la mieloperoxidasa (MPO) (Fridovich, 1995).

El gen de SOD2 (Gene ID: 6648) se localiza en el cromosoma 6 (6q25.3) y se compone de 11 exones. El alelo alanina del polimorfismo Val16Ala de este gen ha sido asociado con la sobreexpresión de esta proteína, dando como resultado un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, lo cual provoca niveles más altos de ROS si no se neutralizan posteriormente (Ambrosone y col., 2005).

I.3.3.3. Gen NOS3 (Óxido nítrico sintasa)

El gen NOS3 (Gene ID: 4846) mapea en el brazo largo del cromosoma 7, en el *locus* 7q36.1; está compuesto de 30 exones. La proteína codificada por este gen participa en la generación de especies reactivas de óxido nítrico (ON) y de ROS. El óxido nítrico es un radical libre que actúa como mediador biológico en varios procesos, incluyendo neurotransmisión y actividades antimicrobianas y antitumorales. Se sintetiza a partir de L-arginina y está implicado en la relajación del músculo liso vascular. También interviene en la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en vasos coronarios y promueve la coagulación sanguínea a través de la activación de plaquetas. El ON tiene efectos celulares complejos, ya sea citoprotectores o citotóxicos de acuerdo a su concentración (Lancaster y Xie, 2006). El alelo asparagina del polimorfismo Glu298Asp ha sido asociado con niveles reducidos de ON y ROS (Veldman y col., 2002).

I.3.4. GENES DE VIAS DE RESPUESTA DE DAÑO AL ADN

I.3.4.1. Gen ATM (Ataxia Telangectasia Mutada)

El gen ATM se localiza en la región cromosómica 11q22-q23 y codifica para una proteína de 3056 aa que desempeña un papel crucial en la respuesta biológica a las RI. Está involucrado en la detección de DSBs y la iniciación de vías que conducen a la detención del ciclo celular seguido de reparación del ADN o apoptosis (Canman y col., 1998; van Gent y col., 2001). Su conformación normal es la de un homodímero inactivo, que se autofosforila y se disocia en monómeros activos a raíz de la inducción de las DSBs (Kastan y Bartek, 2004; Derheimer y Kastan, 2010). Estas unidades son reclutadas hacia las lesiones mencionadas mediante el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) y fosforila múltiples sustratos, tales como p53, NBS1, BRCA1 and Chk2 (Kurz y Lees-Miller, 2004).

Los pacientes homocigotas para la mutación del gen sufren del síndrome autosómico recesivo raro de Ataxia Telangiectasia caracterizado por una sensibilidad exacerbada a las RI (Andreassen y col., 2016). Las líneas celulares derivadas de estos individuos demuestran su rol como quinasa apical, exhibiendo defectos en puntos de control del ciclo celular, como la disminución del arresto en G1 debido a una menor cantidad de p53 (Canman y col., 1998). En cuanto a variantes particulares, Asp1853Asn (rs1801516) es una mutación *missense* localizada en el exón 39, que conduce a la transición G>A sustituyendo la asparagina por ácido aspártico en la posición 1853. Este polimorfismo ampliamente estudiado se presume con un rol destacado en la respuesta al tratamiento radiante.

I.3.4.2. Gen TP53 (Proteína tumoral 53)

TP53 se encuentra localizado en la región 17p13.1 del cromosoma 17; codifica una proteína supresora de tumores que contiene dominios de activación transcripcional, de unión al ADN y de oligomerización. Esta proteína regula la expresión de genes diana, induciendo así el arresto del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia, la reparación del ADN o cambios en el metabolismo. Las mutaciones en este gen están asociadas a una variedad de tumores humanos, incluyendo cánceres hereditarios tales como el síndrome de Li-Fraumeni, cuyos pacientes presentan una alta radiosensibilidad (NCBI, Gene ID: 7157; 2016).

La proteína codificada por este gen es activada por quinasas, incluyendo ATM y la quinasa dependiente de ADN, inducidas por el daño causado por RI (Banin y col., 1998; Schwartz, 2007). p53 activada tiene varios blancos aguas abajo, como genes de regulación del ciclo celular, la apoptosis y la reparación del ADN. Cuando el ADN es dañado por la radiación,

p53 induce la transcripción del gen p21, que impide que las células entren en la fase S del ciclo celular (Dotto, 2000; Robles y col., 2002).

Estudios publicados anteriormente han reportado que la variante Arg72Pro (rs1042522) codifica una arginina o una prolina en el codón 72 en el exón 4 (Su y col., 2014). Este SNP podría influir en la radiosensibilidad de los portadores de alelos polimórficos y en el desarrollo de respuestas adversas a la RT de cáncer de mama, próstata y pulmón (Cesaretti y col., 2005; Andreassen y col., 2006; Yang y col., 2011).

I.3.4.3. Gen XRCC1

El gen humano XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing group 1*) se localiza en el cromosoma 19, en el *locus* 19q13.2 y codifica una proteína *scaffold* de 633 aa. Esta proteína es necesaria para la reparación de SSBs (Brem y Hall, 2005), con un rol destacado en la vía BER. La proteína codificada coordina la restauración del sitio abásico a través de múltiples interacciones proteicas (Vidal y col., 2001). Las SSBs sin reparar son una amenaza importante para la estabilidad genética y la supervivencia celular, acelerando las tasas de mutación y aumentando los niveles de aberraciones cromosómicas (Carrano y col., 1986). Además, XRCC1 parece participar también en la reparación de DSBs. La proteína quinasa ADN-dependiente (ADN-PK), factor clave en NHEJ, es capaz de fosforilar a XRCC1 (Ser 371) después de la RI causando la disociación de los dímeros XRCC1. Esta modificación post-traducciona parece ser importante para reunir DSBs en respuesta al daño del ADN causado por RI (Levy y col., 2006). La deficiencia de XRCC1 en ratones produce letalidad embrionaria y en células de ovario de hámster chino o en ratón con pérdida funcional de XRCC1 o en células humanas en las que los niveles de XRCC1 han sido reducidos por ARNi, son hipersensibles a una amplia gama de daño al ADN inducido por agentes alquilantes, especies reactivas de oxígeno o RI (Luo y col., 2004; Brem y Hall, 2005).

Entre los SNPs encontrados en este gen, se han identificado tres polimorfismos que resultan en la sustitución de aa con costo fenotípico: Arg194Trp (rs1799782) en el exón 6, Arg280His (rs25489) en el exón 9 y Arg399Gln (rs25487) en el exón 10 (Sterpone y col., 2010). Estos polimorfismos podrían alterar la función de XRCC1 y alterar la eficiencia de reparación del ADN o su precisión. Setlow (1983) afirma que los individuos sanos difieren en su capacidad intrínseca en la reparación del daño del ADN y esta variación podría ser el resultado de variantes en los genes de reparación del ADN que, en consecuencia, podría modificar la susceptibilidad individual a la exposición a la radiación.

I.3.5. GENES DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS Y PRO-FIBRÓTICAS

I.3.5.1. Gen TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa)

En los seres humanos, el gen TNF- α se localiza en la banda citogenética 6p21.3 y está compuesto por 2,77 Kpb distribuidos en la región promotora, 4 exones, 3 intrones y regiones 5'UTR y 3'UTR (NCBI, Gene ID: 7124). Codifica una citoquina multifuncional implicada en la apoptosis, la supervivencia celular, la inflamación y la inmunidad (Locksley y col., 2001). Esta proteína regula diversos eventos biológicos fundamentales de las células, tales como la activación de los leucocitos, la liberación de diversas citoquinas y quimiocinas, y la producción de ROS e intermediarios de nitrógeno (McKellar y col., 2009).

El TNF- α es producido por macrófagos, linfocitos, células endoteliales y otras células, en dos formas: una precursora unida a la membrana y otra soluble (sTNF- α). TNF- α se sintetiza como pro-TNF (26 kDa), que está unido a la membrana y se libera tras la escisión de su dominio pro por la enzima convertidora de TNF (TACE) (Bemelmans y col., 1996). Cuando es escindida por la TACE queda como sTNF- α (17 kDa). Las funciones TNF- α están mediadas por el homotrímero de sTNF- α (51 KDa); sin embargo, su actividad biológica se puede interrumpir debido a una disociación proteica causada por bajas concentraciones de esta proteína (Thomas, 2001). Diversas evidencias experimentales sugieren que ambas formas participan en la respuesta inflamatoria (Horiuchi y col., 2010). En células, incluyendo fibroblastos, de músculo liso y tumoral presenta una expresión más baja.

Este gen contiene diversos polimorfismos de un solo nucleótido distribuidos a través de su estructura, descritos especialmente en la región promotora (-1031T/C, -863C/A, -857C/T, -376G/A, -308G/A y -238G/A) (Lona y col., 2013). Varios trabajos han demostrado que el nivel de transcripción de esta citoquina está sumamente afectado por estos SNPs. Dado que se sabe que TNF- α se libera en respuesta a dosis altas de radiación, se presume que está fuertemente involucrada en la radiosensibilidad clínica.

I.3.5.2. Gen IL6 (Interleuquina 6)

El gen de la IL 6 en humanos, se localiza en el brazo corto del cromosoma 7, en el *locus* 7p15.3 y está compuesto de 6 exones con una longitud de 6,11Kpb (Gene ID: 3569). Codifica una citoquina con una masa molecular aproximada de 26 kDa, secretada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Participa en la regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria (Kaplanski y col., 2003). La proteína se produce principalmente en los sitios de inflamación aguda y crónica que se secreta en el suero e induce una respuesta

inflamatoria a través de la transcripción del receptor de interleuquina 6, alpha. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF- α .

La irradiación induce la regulación positiva de los niveles de una variedad de citoquinas incluyendo a IL-6 (Wu y col., 2013). Algunos informes clínicos han observado cambios en la concentración plasmática de IL-6 durante la RT y sugieren que estas variaciones podrían identificar a los pacientes en riesgo de manifestar radiotoxicidad (Chen y col., 2001-2002).

En los últimos años, se han descrito distintos polimorfismos de la región promotora del gen de la IL-6, como son el -572G>C, el -373A(n)T(n), el -597G>A y el -174G>C, siendo este último el de mayor prevalencia e importancia biológica (Goyenechea y col., 2005), ya que parece afectar a la transcripción de la citoquina (Wernstedt y col., 2004).

I.3.5.3. Gen TGF β - 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1)

El gen TGF β -1 (*NCBI*, Gene ID: 7040) está localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.2). Codifica una proteína ligando que pertenece a la superfamilia de TGF β ; este mediador celular se une a receptores de TGF β y modula la activación de SMAD 2/3 mediante su fosforilación y subsecuente translocación al núcleo donde participa en la regulación de la expresión génica. Está fuertemente implicada en la ruta de respuesta fibrogénica- atrófica que es un componente principal de la lesión del tejido normal después de la RT. La fase temprana de la fibrogénesis, después de la irradiación, se puede considerar como una respuesta de curación de heridas con la regulación de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TGF β -1 (Bentzen, 2006).

TGF β -1 presenta efecto pro-fibrótico y juega un papel importante en la promoción de los cambios tisulares post- irradiación, especialmente en la generación de fibrosis (Arroyo y Nazar, 2011). En pieles irradiadas se ubica preferentemente en células inflamatorias de la región dérmica papilar. Además, juega un rol crítico en la señalización extracelular, la inducción de la apoptosis y la inhibición de la proliferación en respuesta al daño del ADN (Bentzen y col., 2006).

Los *SNPs* más frecuentemente estudiados en TGF β -1 son C-509T (rs1800469) y P10L (rs1800470). El primero se encuentra en la región promotora de TGF β -1, pero no está dentro de ningún elemento regulador; y el segundo está localizado en el péptido señal. Se ha reportado que ambos actúan alterando la velocidad de secreción de TGF β -1 y, por lo tanto, en los niveles circulantes de la proteína madura. Sin embargo, no todos los estudios han demostrado tal relación, la presencia de las formas, latente y activada, puede complicar la interpretación de los estudios de los niveles circulantes (Barnett y col., 2012).

I.3.6. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA RADIOGENÓMICA

El objetivo final de la radiogenómica es desarrollar un modelo de riesgo incluyendo factores genéticos y clínicos co-variantes capaces de predecir la probabilidad de desarrollar efectos secundarios de la RT (Guo y col., 2014). Por lo tanto, un set de biomarcadores validados podría ayudar en la toma de decisiones dirigidas hacia una RT individualizada o a la implementación de terapias alternativas.

Tal perfil podría clasificar a los pacientes en subgrupos con diferentes probabilidades de desarrollar toxicidad, de modo que permita la irradiación hasta la tolerancia del tejido normal para cada subgrupo (Barnett y col., 2009). De este modo, la identificación de pacientes con un bajo riesgo de radiosensibilidad podría permitir la escalada de dosis y mejorar el control tumoral. Por el contrario, pacientes con alto riesgo podrían realizar tratamientos sin radiación (si estuviese disponible) o un protocolo de RT modificado que se traduzca en una menor dosis a los tejidos normales que podrían mejorar el resultado terapéutico. Además, el advenimiento de las tecnologías modernas de la RT guiada por imagen (IGRT) y RT de intensidad modulada (IMRT) permiten que las dosis a las estructuras del tejido normal se reduzcan aún más, logrando la individualización física (Burnet y col., 2013). Otra consideración es que el tipo de tumor también sea radiosensible, por lo tanto, podría ser erradicado mediante el uso de una dosis más baja de RT (Kerns y col., 2014a) (Figura 8).

Por otra parte, cuando existen opciones para la terapia, la comprensión del paciente de los posibles daños y beneficios de las opciones de tratamiento alienta a una participación más activa en la toma de decisiones, lo que resulta en una disminución de la ansiedad y el arrepentimiento en la decisión (Rosenstein y col., 2014).

En este contexto, es importante tener en cuenta que a pesar de los avances tecnológicos que se han realizado para conformar la dosis de radiación al tumor, una cierta cantidad del tejido normal siempre es irradiado durante el curso de la RT y ésta exposición puede conducir al desarrollo de efectos adversos. Por lo tanto, la disponibilidad de un ensayo predictivo de esta radiotoxicidad puede ser de gran ayuda para los proveedores de atención médica, los pacientes y sus familias si permitiera lograr un tratamiento mejorado para cada individuo. Además, la información de un ensayo de este tipo, incorporada en un modelo predictivo, podría servir como una herramienta de toma de decisiones para los pacientes ofreciendo un enfoque genéticamente adaptado para la prevención de la radiotoxicidad en el campo de la medicina de precisión (Kerns y col., 2015).

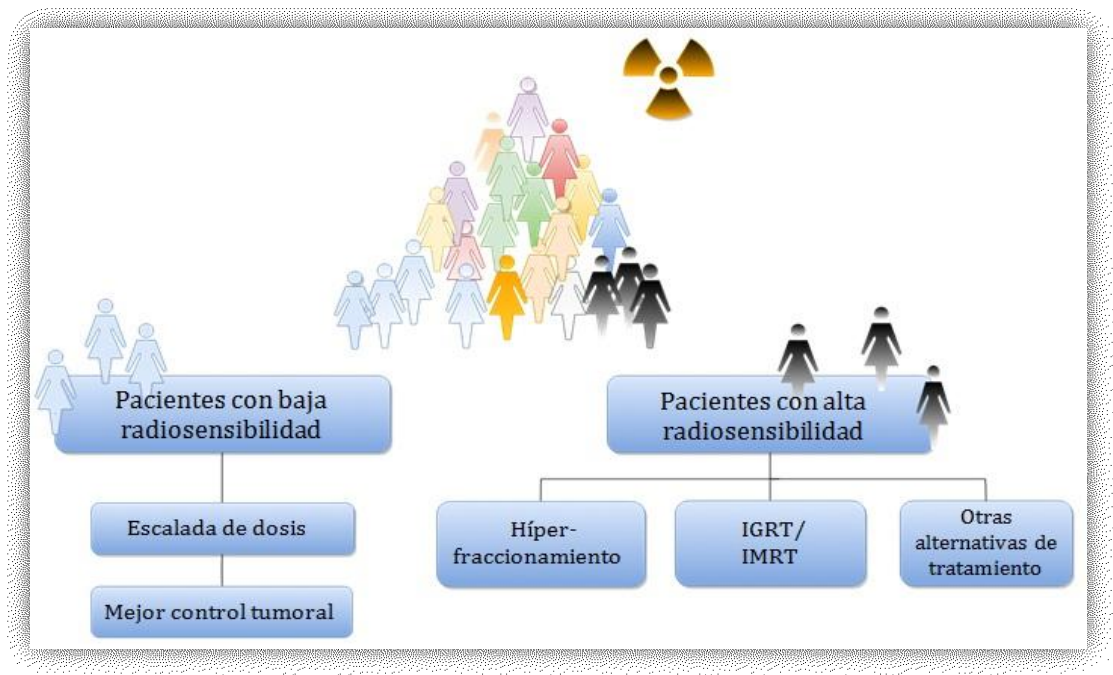
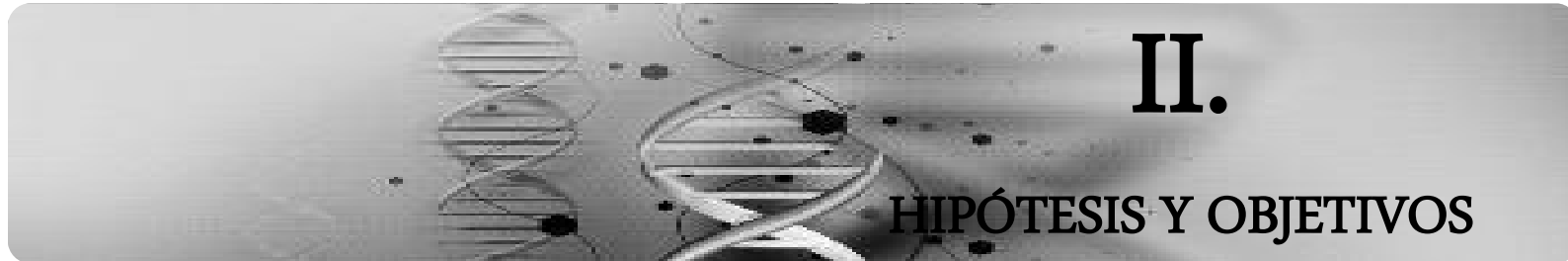


FIGURA 8. Enfoque general de la potencial aplicación clínica de un test de radiosensibilidad (screening de SNPs específicos) para un tratamiento radioterápico individualizado. A través del ensayo se podrían identificar dos grupos de pacientes: de bajo/alto riesgo de presentar efectos adversos. Pacientes con un bajo riesgo, podrían recibir dosis más altas para aumentar la tasa de curación. Y por otro lado, pacientes con un alto riesgo, podrían ser candidatos a tratamientos sin irradiación (cirugía, QT u hormonoterapia) o tratadas con IGRT/IMRT o con una dosis total más baja.



II.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS

La radiosensibilidad individual es un rasgo complejo, multifactorial y poligénico en el cual participan diversas vías de transducción, como la reparación del ADN, el proceso inflamatorio y de estrés oxidativo, polimorfismos en genes incluidos en estas repuestas estarían asociados a este fenotipo.

II.2. OBJETIVOS GENERALES

- ✓ Identificar marcadores genéticos que puedan ser utilizados como una herramienta predictiva en la respuesta al tratamiento con radioterapia.
- ✓ Establecer un modelo predictivo para la evaluación de radiosensibilidad individual.

II.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Epidemiología clínica de las pacientes con cáncer de mama que realizaron el tratamiento radiante.
- ✓ Identificar variantes alélicas de genes candidatos implicados en vías de estrés oxidativo: GSTP1, GSTA1, NOS3, SOD2 en pacientes con cáncer de mama sometidos a radioterapia.
- ✓ Identificar variantes alélicas de genes candidatos que participan en vías DDR: TP53, XRCC1, ATM en pacientes con cáncer de mama sometidos a radioterapia.
- ✓ Identificar variantes alélicas de genes de citoquinas pro-inflamatorias y pro-fibrótica: TGF β -1, TNF- α e IL6 en pacientes con cáncer de mama sometidos a radioterapia.
- ✓ Evaluar la potencial relación de la variabilidad genética detectada, con la manifestación de efectos adversos agudos provocados por el tratamiento radioterapéutico.
- ✓ Realizar un análisis multifactorial incluyendo posibles factores intrínsecos relacionados al desarrollo de la radiosensibilidad.



III.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

En el presente trabajo se incluyeron 122 pacientes con diagnóstico positivo para CaM, provenientes de la ciudad de La Plata y alrededores, con un rango etario de 26 a 85 años de edad. Las mismas asistieron al Centro Integrado de Oncología (CIO) Terapia Radiante- La Plata, por derivación de sus respectivos médicos oncólogos, para ser tratadas con RT adyuvante.

Se realizó la extracción de 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA 5% mediante punción endovenosa recolectadas en tubos falcon de 15 mL y se mantuvieron en freezer a -70°C hasta su procesamiento. En los casos en los que no fue posible la extracción sanguínea se realizó un hisopado de mucosa bucal, que luego fue resguardado en sobre cerrado, en lugar seco y a temperatura ambiente. La obtención de las muestras biológicas fue realizada antes de que las pacientes dieran inicio al tratamiento. En adición, 13/122 muestras corresponden a un muestreo previo, las cuales se encontraban resguardadas en el laboratorio de genética molecular del IGEVET. Estas consistieron en sangre colectadas en tarjetas *Whatman FTA Elute*, preservadas según instrucciones del fabricante en sobre cerrado y a temperatura ambiente. Todas las muestras fueron encriptadas con un código intra-laboratorio para preservar el anonimato del paciente, el cual se utilizó durante todo su procesamiento.

III.2. ENTREVISTA DE ANAMNESIS E HISTORIA CLÍNICA

Luego de la extracción de la muestra, se realizó una entrevista de anamnesis a cada una de las pacientes. Se obtuvo información de los datos personales, demográficos y referidos a su estilo de vida: edad, lugar de nacimiento, origen étnico, hábito de fumar (Si/No), consumo de alcohol (Si/No), peso, altura, tamaño de la mama (grande, mediana, pequeña), comorbilidades (diabetes, hipertensión, anemia, etc) (Si/No), antecedentes familiares de CaM u otro tipo de neoplasia.

Asimismo, a través de la revisión de las historias clínicas, se registró información referente al diagnóstico histopatológico de la enfermedad, grado histológico, tamaño tumoral, estatus de los ganglios linfáticos, presencia de metástasis distales. También tratamientos terapéuticos: cirugía (mastectomía/ conservada) quimioterapia (Si/No) (neo-adyuvante/concomitante), tamoxifeno (Si/No), terapia hormonal. Además, se tomaron datos referidos a las características del tratamiento radiante: volumen irradiado, dosis total y esquema de fraccionamiento, tipo de tratamiento (braquiterapia, teleterapia), planificación

del tratamiento (convencional 2D, conformado 3D), modalidad (pre o post-operatoria), localización del tumor (mama derecha/izquierda), entre otros (Ver Anexo 1).

III.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El trabajo se realizó de manera exclusiva con las pacientes que otorgaron su consentimiento informado. En conformidad con la Declaración de Helsinki, promulgada por la Asociación Médica Mundial (AMM¹), a cada paciente se le informó sobre el protocolo del estudio, tanto verbalmente como por escrito antes de realizar la toma de la muestra. El proyecto que enmarca el presente estudio fue aprobado por el Comité *ad hoc* de Ética de la Asociación de Genética Humana (AGHU) de la ciudad de Mar del Plata- Buenos Aires (Ver Anexo 2).

III.4. TRATAMIENTO RADIANTE DE PACIENTES

La planificación 3D del tratamiento radiante se realizó utilizando TC, ya que permite conocer la distribución de la dosis a nivel de toda la glándula mamaria y a nivel de los tejidos normales, con la posibilidad de mejorar los resultados cosméticos, especialmente en pacientes con mamas voluminosas y disminuir la toxicidad al reducir la dosis al tejido pulmonar y cardíaco (Haffty y col., 2009).

La mayoría de las pacientes (98/122) fueron sometidas a un tratamiento conservador. Este radicó en una RT convencional 3D (en algunos casos 2D), cuya planificación consistió en 2- 4 campos tangenciales opuestos, con o sin cuña con tiempo parcial a fin de homogeneizar la dosis (Figura 9). A las mismas, se le aplicó RT en mama total con una dosis convencional de 50-50,4 Gy, fraccionada en dosis diarias de 1,8-2 Gy, con un acelerador lineal de fotones de 4 o 6 MV (Varian Clinac, CA, USA) (Figuras 10). El tratamiento fue seguido por un *boost* sobre lecho tumoral, con una dosis total de 12-18 Gy fraccionada en 2 Gy/día en 85,7% de los casos (84/98).

Además, 9 pacientes que cumplieron con requisitos específicos (>60 años, estadio tumoral precoz) recibieron tratamiento Hipofraccionado, que consistió en la aplicación de una dosis total de 42,56 Gy, fraccionado en 2,66 Gy/día. En estos casos, ninguna de las pacientes realizó *boost*.

Por otro lado, para tratar a las pacientes pos-mastectomía (12) se utilizó un tratamiento estándar de RT en pared costal, utilizando campos tangenciales. Se administró una dosis de 1,8-2Gy diaria, hasta una dosis total de 50Gy. Además, a la mayoría también se

¹ <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>

aplicó una dosis total de 50Gy en la cavidad axilo-supraclavicular, fraccionada en dosis diarias de 2Gy.

Por último, dos pacientes sin intervención quirúrgica fueron la excepción: una tratada de manera paliativa con un tratamiento convencional (60Gy más 50,4Gy en cavidad axilo-supraclavicular) y otra como tratamiento pre-quirúrgico (50Gy).

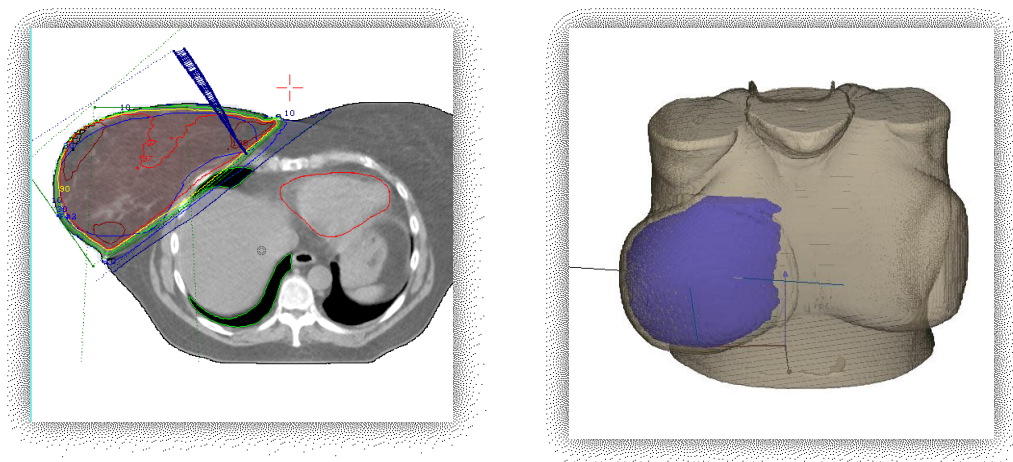


FIGURA 9. Planificación en volumen total de una mama de tamaño grande. Se observa en ambas figuras un tratamiento con dos campos opuestos y las curvas de isodosis representadas por distintos colores.



FIGURA 10. Acelerador lineal de fotones de 6MV de energía. Equipo utilizado para la irradiación de las pacientes bajo tratamiento.

III.5. EVALUACIÓN DE LA RADIOTOXICIDAD

El análisis de la radiotoxicidad aguda fue realizado por el equipo de médicos radio-oncólogos del CIO- La Plata, quienes semanalmente registraron la evolución clínica del tratamiento de las pacientes.

Para evaluar la severidad de las reacciones agudas en piel se utilizó el sistema de clasificación del *RTOG* (Grupo de Oncología Radioterápica, del inglés *Radiation Therapy Oncology Group*), que ha sido aceptado y reconocido por la comunidad médica desde hace varios años (Cox y col., 1995) (Ver Tabla 2). El desarrollo de los efectos secundarios agudos de Grado ≥ 2 fue considerado para indicar a las pacientes con una mayor sensibilidad, mientras que los individuos con mínimas o nulas reacciones cutáneas (Grados 0 y 1) fueron considerados parte del grupo control. La ocurrencia y severidad de las reacciones agudas en la piel se determinaron durante y luego de finalizado el tratamiento de RT, teniendo en cuenta para el análisis estadístico el grado más alto de radiotoxicidad.

TABLA 2. Criterios de radiotoxicidad aguda en piel EORTC/RTOG. Adaptado de Cox y col., 1995.

RADIODERMITIS AGUDA:				
0	1	2	3	4
No se observan cambios	Eritema folicular, leve, difuso. Depilación. Prurito. Descamación seca. Hiposudoración	Eritema marcado Descamación húmeda en focos circunscriptos. Edema moderado	Descamación húmeda confluyente Edema severo	Hemorragias Ulceración Necrosis

RTOG, Radiation Therapy Group; EORTC, European Organization for Research and Treatment of cancer

III.6. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

III.6.1. A partir de muestras de sangre periférica

Las muestras de sangre obtenidas se centrifugaron a 12.000 rpm durante 4 min. Se descartó el sobrenadante y luego se hicieron lavados sucesivos con buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM) hasta eliminar todo rastro de eritrocitos. El sedimento celular obtenido fue incubado durante 24 hs a 56°C en 300 μ L de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100 y 0,5% Tween 20) y 10 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) (Promega, Madison, Wisconsin, USA). La proteinasa K fue inactivada por hervor durante 12 min. Las muestras de ADN fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

III.6.2. A partir de hisopado de mucosa bucal

Los hisopados de mucosa bucal fueron colocados en tubos eppendorf de 1,5 mL y se agregó 1mL de PBS 1x (tampón Fosfato Salino), se mantuvo durante unos segundos hasta liberar las células epiteliales adheridas y se descartó el hisopo. Luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 4 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular obtenido fue incubado durante 24 hs a 56°C en 100 µL de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100 y 0,5% Tween 20) y 5 µL de proteinasa K (10 mg/mL) (Promega, Madison, Wisconsin, USA). La proteinasa K fue inactivada como se describió previamente. Las muestras de ADN se conservaron a -12°C hasta su utilización.

III.6.3. A partir de muestras de sangre en tarjetas *Whatman FTA Elute*

Las tarjetas *Whatman FTA Elute* (Whatman Inc., Florham Park, NJ, USA) contienen productos químicos que conservan el ADN de una muestra orgánica. Estos productos lisan las células, desnaturalizan las proteínas y protegen los ácidos nucleicos de las nucleasas, del daño oxidativo y del daño por luz UV. Además, inactivan rápidamente los organismos infecciosos de la sangre e impiden el crecimiento de bacterias y otros agentes patógenos. De esta manera, las muestras de ADN pueden permanecer estables a temperatura ambiente durante años.

El ADN se obtiene de la matriz de la tarjeta mediante un proceso de elución simplificado utilizando agua y calor, y los componentes inhibidores como la hemoglobina quedan retenidos en la matriz. De cada muestra se obtuvieron 10 discos de 1,2 mm de diámetro extraídos con un microperforador estéril y se colocaron en un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se lavó cada muestra 3 veces con 500 µL de agua destilada mediante agitación. Se agregó 50 µL de agua estéril y se calentó la muestra a 95°C durante 30 min. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 seg para separar los discos del eluido. Se removieron y descartaron los discos. Las muestras de ADN se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

III.6.4. Cuantificación de la concentración de ADN

Las muestras de ADN extraídas fueron cuantificadas por espectrofotometría con NanoVue (GE, Healthcare, USA) para confirmar que se cuenta con la cantidad suficiente de ADN de calidad adecuada para llevar a cabo los ensayos de PCR. La concentración se mide en ng/µL y la calidad del ADN se calculó en base a la relación de absorbancia A260/A280 (ADN/proteínas), cuyo valor esperado se encuentra entre 1,7 y 2.

Para la amplificación de las secuencias se utilizó una concentración de ADN en el rango de 80-100 ng/µL.

III.7. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs)

III.7.1. Selección de los SNPs

Los genes candidatos analizados en este estudio, se seleccionaron considerando las vías de señalización que participan en la respuesta a la RI. De acuerdo a estas, se han escogido 10 candidatos por su presunta influencia sobre la radiosensibilidad individual.

Asimismo, los SNPs de estos genes se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: que los polimorfismos correspondieran a sustituciones no sinónimas y que tuvieran una frecuencia mayor a 0,05 para el alelo menos frecuente (MAF >0,05), estas frecuencias fueron obtenidas de la base de datos de SNPs del NCBI². En la Tabla 3 se pueden observar algunas características.

- *Genes involucrados en las vías del estrés oxidativo:* GSTP1- Glutación S-Transferasa P 1, SOD2- Superóxido Dismutasa 2, NOS3- Óxido Nítrico Sintetasa 3 y GSTA1- Glutación S-Transferasa A 1.
- *Genes implicados en las vías de detección y reparación del daño al ADN:* TP53- Proteína Tumoral p53, XRCC1- *X-Ray Repair Cross Complementing 1* y ATM- Ataxia Telangiectasia Mutada
- *Genes de citoquinas pro-fibróticas y pro-inflamatorias:* TGFβ-1- Factor de Crecimiento Transformante beta 1, TNF-α- Factor de Necrosis Tumoral alfa e IL6- Interleuquina 6.

² <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

TABLA 3. Características de las variantes polimórficas bajo estudio

GEN	FUNCIÓN	SNP	dbSNP ID	POSICIÓN DEL CODÓN	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	MAF
GSTP1	Vía de Estrés oxidativo	A313G	rs1695	105	Ile>Val	G=0.3526/1766
SOD2	Vía de Estrés oxidativo	T47C	rs4880	16	Val>Ala	G=0.4107/2057
NOS3	Vía de Estrés oxidativo	G894T	rs1799983	298	Glu>Asp	T=0.1763/883
GSTA1	Vía de Estrés oxidativo	C-69T	rs3957356	-	-	T=0.3063/1534
TP53	Vía de DDR	R72P	rs1042522	72	Pro>Arg	G=0.4571/2289
XRCC1	Vía de DDR	R399Q	rs25487	399	Arg>Gln	T=0.2604/1304
	Vía de DDR	R194W	rs1799782	194	Arg>Trp	A=0.1299/283
ATM	Vía de DDR	G1853A	rs1801516	158	Asp/Asn	A=0.0669/335
TGFB1	Citoquina pro-fibrótica	C-509T	rs1800469	-	-	A=0.368/1843
	Citoquinas pro-fibrótica	P10L	rs1800470	10	Leu>Pro	G=0.454/2277
TNF α	Citoquina pro-inflamatorias	G-308A	rs1800629	-	-	A=0.0903/452
IL6	Citoquina pro-inflamatorias	G-174C	rs1800795	-	-	C=0.1412/707

III.7.2. Amplificación de las secuencias y determinación de los SNPs por RFLP

La identificación de la mayoría de los polimorfismos génicos fue realizada mediante PCR-RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción, del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica pone de manifiesto las diferencias entre individuos en sitios concretos del ADN que reconocen diferentes enzimas de restricción (o endonucleasas). Estas enzimas cortan en secuencias específicas del ADN (dianas de restricción), dando lugar a fragmentos de tamaños diferentes que pueden ser analizados mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida (Figura 11).

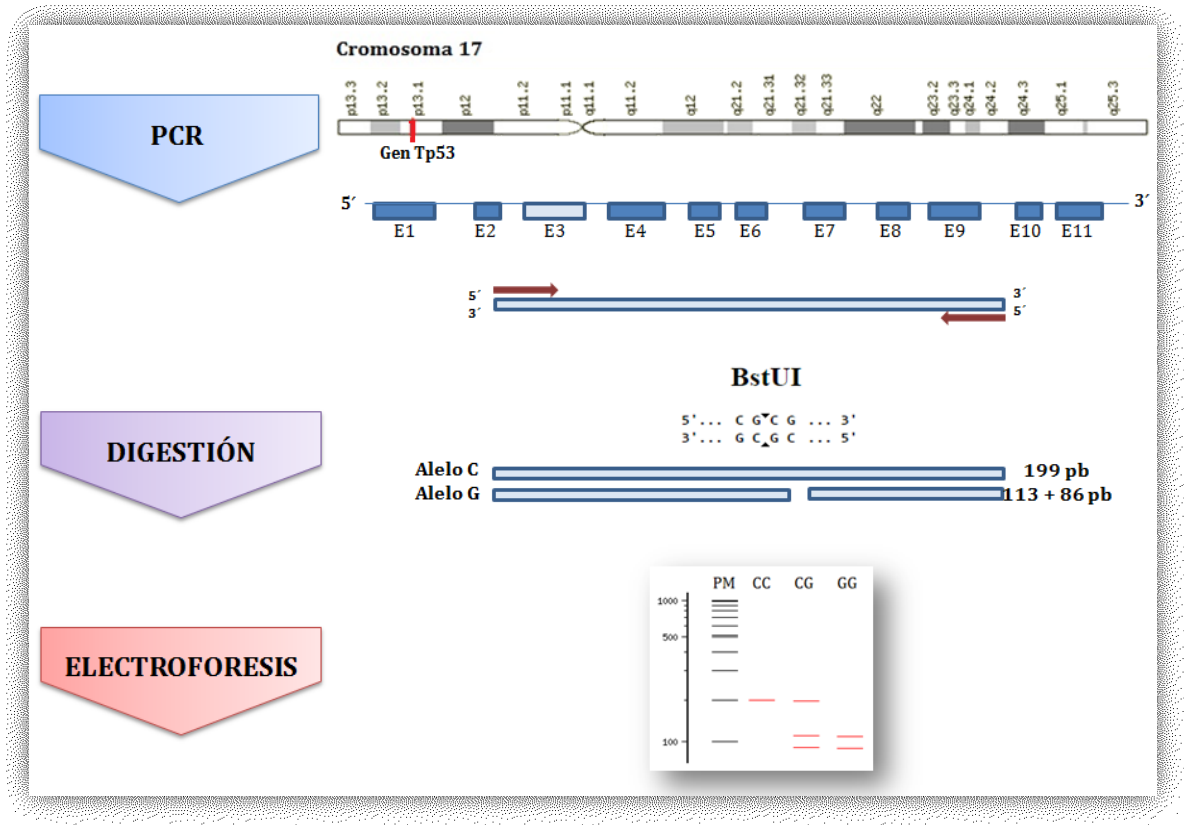


FIGURA 11. Representación esquemática de la técnica PCR-RFLP para la tipificación del polimorfismo R72P de TP53. Luego de obtener múltiples copias por PCR del fragmento deseado (exón 3), se realizó la digestión del mismo con la enzima BstUI que reconoce la secuencia diana, que contiene al alelo G, dando como resultado dos fragmentos de 113 y 86 pb. El patrón de bandas para cada genotipo es observado mediante electroforesis.

III.7.2.1. Diseño de los cebadores

Para la obtención de los fragmentos de interés que contienen los *SNPs* en estudio, primeramente, se diseñaron los cebadores, utilizando el programa DNAMAN v.4.15 (Lynnon Biosof©, Quebec, Canadá) (Tabla 4). Para ello, se extrajeron las secuencias de los genes de la base de datos del *GenBank*³. Luego, para verificar la especificidad de los cebadores obtenidos, de modo que solo amplifiquen el fragmento de interés, se realizó un alineamiento de secuencia con *BLAST*⁴ (*Basic Local Alignment Search Tool*) y una *PCR in silico*⁵.

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁴ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁵ <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

TABLA 4. Secuencias de los cebadores y tamaño de los fragmentos esperados.

Gen	SNP	Primer F y R (5' - 3')	Tamaño del Amplicón
<i>GSTP1</i>	A313G	F- ACCCCAGGGCTCTATGGGAA R- TGAGGGCACAAGAAGCCCCT	176pb
<i>SOD2</i>	T47C	F- CTGCGTAGACGGTCCCG R- TGATGTGAGGTTCCAGGGC	159pb
<i>NOS3</i>	G894T	F- CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC R- AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC	206pb
<i>GSTA1</i>	C-69T	F- GCATCAGCTTGCCCTTCA R- AAACGCTGTCACCGTCCTG	401pb
<i>TP53</i>	R72P	F- TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA R- TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC	199pb
<i>XRCC1</i>	R399Q	F- TTTGCCCTCAGATCACACC R- CAGGCCCCAGTCTGACTCC	251pb
	R194W	F- CCGTGTGAAGGAGGAGGATGA R- CCTCCAGACCTCTCAACCCTC	275pb
<i>TGFB1</i>	C-509T	F- CAGTAAATGTATGGGGTCGCAG R- GGTGTCAGTGGGAGGAGGG	153pb
	T869C	F- CAGCCCTGTTCGCGCTC R- TCCGCTTACCAGCTCCAT	177pb

III.7.2.2. Amplificación de los fragmentos

A los efectos de obtener múltiples copias de los fragmentos de ADN, se llevó a cabo la puesta a punto de las amplificaciones por PCR. Las mismas se realizaron en un volumen final de 25µL, utilizado Taq DNA polimerasa, Cl₂Mg, Buffer con SO₄ (NH₄)₂, dNTPs (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina), cebadores (Invitrogen, CA, USA) y fue iterada 35 veces en un termociclador (BioRAD, MyCycler™ Thermal Cycler 170-9701). En cada ciclado se incorporaron controles positivo y negativo de la reacción. La optimización se realizó modificando diferentes concentraciones de la mix (Tabla 5) y los parámetros de ciclado fueron los siguientes:


∞ Desnaturalización inicial:	94°	por	3min	 35 ciclos
∞ Desnaturalización:	94°	por	30seg	
Hibridación:	55°-57°	por	30seg	
Extensión:	72°	por	30seg	
∞ Extensión final:	72°	por	2min	

TABLA 5. Componentes de la mezcla de reacción utilizadas para la reacción de PCR

Componentes	Concentración
Buffer de reacción	1x
Cl ₂ Mg	1-2mM
dNTPs	0,2mM
Mix de cebadores (F y R)	0,5μM
Taq polimerasa	1,25U
DMSO	5%
Volumen final	25μL

Los productos de PCR fueron chequeados mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida: bisacrilamida, 19:1), acompañados de un marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, cat.15628-019), en solución buffer TBE 1x (0,089M Tris; 0,089M Ácido Bórico; 0,002M EDTA). Se tiñeron con BrEt (0,5 μg/mL) y fueron observados al Transiluminador de UV (Vilber Lourmat).

III.7.2.3. Digestión con enzimas de restricción (ER)

La selección de las ER, para la generación de patrones de RFLP, se realizó mediante NEBcutter V2.0 de *New England Biolabs*⁶. Entre las diferentes ER, que cortan en el sitio de interés, se seleccionó las observadas en la tabla 6.

Para la digestión se utilizó entre 5-10 μL de los productos de PCR, incubados con 5-10U de la correspondiente ER (*New England Biolabs Inc, MA, USA.*; *Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA*) en estufa a 37°C, *overnight*.

Luego para determinar los diferentes genotipos se realizó la separación de los productos por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 8-10% en presencia de un marcador de peso molecular de 100pb y se tiñó con BrEt o nitrato de plata.

⁶ <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

TABLA 6. Se pueden observar las ER utilizadas para la digestión de los amplicones y los productos obtenidos.

Gen	SNP	Enzima de Restricción	Producto de la digestión (pb)
GSTP1	A313G	Alw26I	A: 176 G: 93, 83
SOD2	T47C	BsaWI	T: 159 C: 85, 74
NOS3	G894T	MboI	G: 206 T: 119, 87
GSTA1	C69T	MnII	C: 204,77,70,36,14 T: 204,84,77,36
TP53	R72P	Bsh1236I	P: 199 R: 113, 86
XRCC1	R399Q	MspI	R:164, 87 Q: 251
	R194W	MspI	R: 214, 41, 20 W: 234, 41
TGFβ-1	C-509T	Bsu36I	C: 117, 36 T: 153
	T869C	MspA1I	T: 89, 48, 40 C: 77, 48, 40, 12

III.7.3. Análisis de las variantes polimórficas por pirosecuenciación

El análisis se realizó en una muestra de 28 individuos de la población total en estudio y se realizó la identificación de los polimorfismos génicos G1853A de ATM, G-308A de TNF- α y G-174C de IL6 mediante el empleo de pirosecuenciación. La muestra se seleccionó teniendo en cuenta únicamente los individuos que se encuentran en los extremos de la curva de distribución normal de Gauss: 14 individuos que desarrollaron efectos severos de toxicidad (radiodermatitis de grado 3 y 4) (casos) y 14 individuos asintomáticos (controles).

La tecnología de pirosecuenciación se basa en la detección de la formación de pirofosfato durante la reacción de polimerización del ADN. El pirofosfato producido durante dicha reacción es convertido en ATP, el cual es utilizado por una luciferasa para convertir la luciferina en oxiluciferina. Por cada adición de un nucleótido en el proceso de extensión de la polimerización de ADN, se genera emisión de luz (Nordström y col., 2000). La intensidad de luz generada es proporcional a la cantidad de nucleótidos incorporados (Figura 12).

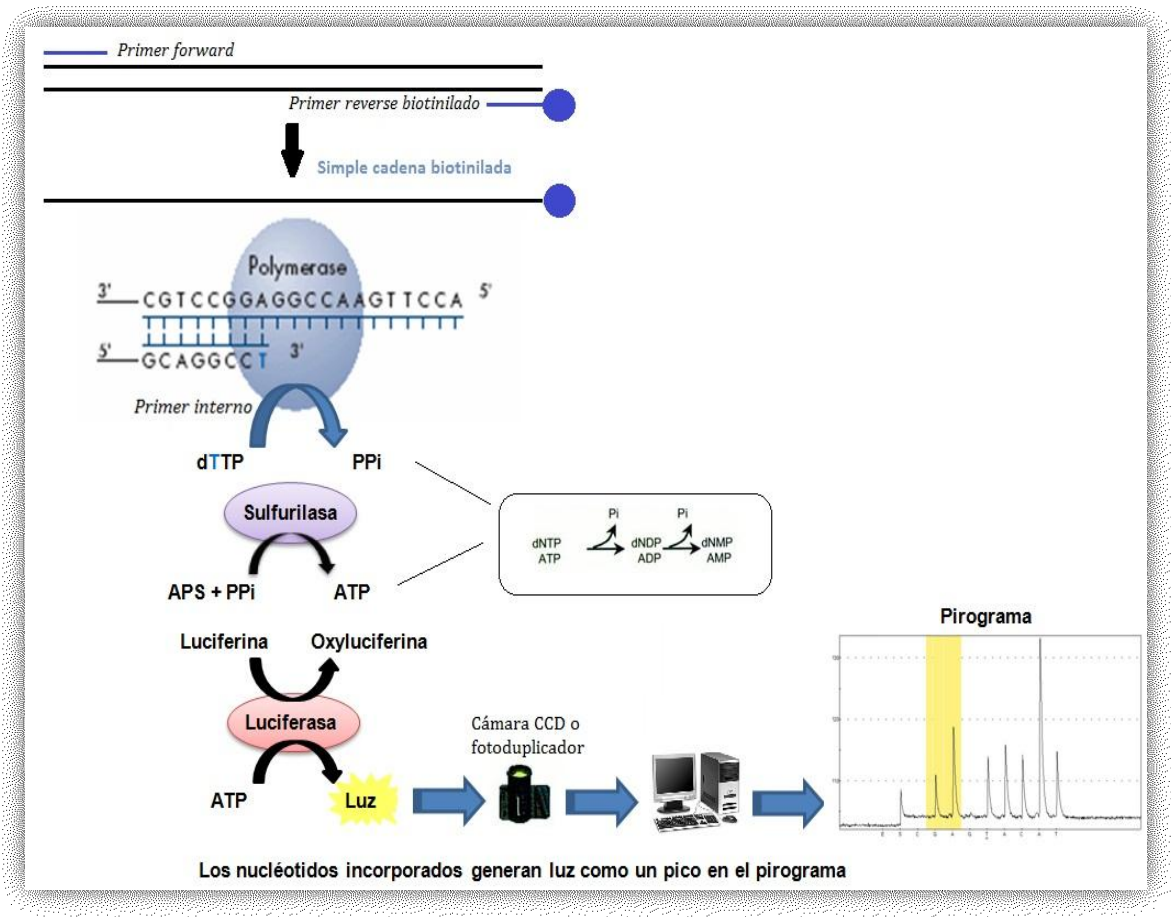


FIGURA 12. Representación esquemática del proceso de la pirosecuenciación. Luego de la amplificación del fragmento deseado por PCR utilizando uno de los *primers* biotinilado, se procede a la separación de las cadenas por medio de un dispositivo de trampa de vacío que atrapa los complejos estreptavidina- biotina- ADN. Luego se hibrida el primer interno a la cadena de ADN y comienza la elongación. Los nucleótidos se van añadiendo de a uno por vez, y si el nucleótido añadido al medio de reacción corresponde al de la cadena complementaria, se incorpora a la cadena que se está sintetizando y se libera un pirofosfato. A continuación, una ATP sulfurilasa transforma este pirofosfato (PPi), que se acoplará a la luciferina, formando un complejo que será utilizado por una luciferasa. Como resultado se produce oxiluciferina y una señal luminosa. Finalmente, una apirasa se encarga de degradar aquellos nucleótidos que no han sido incorporados. Luego, el sensor CCD captura esta señal lumínica y lo reproduce como un pico en un pirograma. La altura del pico variará en función de la intensidad de la señal lumínica, la cual es proporcional al número de nucleótidos incorporados. De este modo es posible deducir la secuencia de acuerdo al tamaño de los picos y si hay un polimorfismo el tamaño del pico variará en función de la adición de uno u otro nucleótido.

III.7.3.1. Diseño de los cebadores

Los cebadores de extensión biotinilados fueron diseñados mediante el empleo del programa *PyroMark Assay Design SW.2.0* (QIAGEN, Cat No/ID: 9019077) de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia) (Tabla 7).

TABLA 7. Secuencias de los cebadores forward, reverse e interno para pirosecuenciación.
Cebador biotinilado. —●

Gen	SNP	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón
ATM	G1853A	F- PCR → R- PCR ←● Sequencing →	F- GTCAGACTGTACTTCCATACTT R- TGAAAAATCCCTGAACAT S- TTCATGATATTTTACTCCAA	99pb
TNF-α	G-308A	F- PCR ●→ R- PCR ← Sequencing ←	F- GGAGGCAATAGGTTTTGA R- GCCACTGACTGATTTGTG S- GGCTGAACCCCGTCC	74pb
IL6	G-174C	F- PCR → R- PCR ←● Sequencing →	F- TTCCCCTAGTTGTGTCT R- GGAAAATCCCACATTTGA S- CCCTAGTTGTGTCTTGC	132pb

III.7.3.2. Protocolo de pirosecuenciación

III.7.3.2.1. Unión de los productos de PCR biotinilados a las perlas de sefarosa

Luego de realizada la amplificación por PCR de las secuencias, 20µL de los amplicones biotinilados se mezclaron con 17µL de agua destilada, 3µL de perlas Dynabeads™ cubiertas con estreptavidina (Dyna, Oslo, Noruega) y 40µL de buffer de *binding* (10 mmol/L Trizma base, 2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, y 0.1% Tween 20, pH 7.6). Se sellaron las placas de PCR y se agitaron con vórtex por 10 min a temperatura ambiente.

III.7.3.2.2. Desnaturalización del ADN y preparación de la cadena biotinilada

Para aislar las cadenas biotiniladas del ADN complementario no marcado se utilizó un dispositivo de trampa de vacío (Workstation, Uppsala, Suecia) que desnaturaliza el ADN dejándolo como cadena simple y atrapa los complejos perla- estreptavidina- biotina- ADN. Para ello, las muestras son transferidas a diferentes soluciones consecutivamente: etanol 10% por 10seg, NaOH 0,2 M por 10seg para desnaturalizar el ADN y buffer de lavado por 10 segundos para lavar los complejos.

Las perlas con estreptavidina acopladas a las cadenas simples de ADN marcadas con biotina son entonces transportadas a una placa con buffer de *annealing* (20 mmol/L Trizma acetato y 5 mmol/L acetato de magnesio, pH 7.6) y el cebador interno de secuenciación.

La reacción de hibridación se realizó a 80°C durante 2min, y la reacción de pirosecuenciación a 28°C, en un volumen final de 50µL, mediante el empleo del sistema de pirosecuenciación automático PSQ® 96 MA (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia).

III.7.3.2.3. Lectura de los genotipos

La lectura automática de los genotipos se realizó utilizando el programa PSQ® 96 SNP. En la tipificación de los SNPs, cada combinación alélica (heterocigoto u homocigoto) confiere un patrón específico comparado con las otras dos variantes. La determinación del SNP comienza con el análisis de nucleótidos precedentes a la posición investigada. Este paso sirve como control del proceso de amplificación así como para la calibración de los picos y las condiciones de reacción (Ahmadian y col., 2006).

III.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

III.8.1. Frecuencias genotípicas y alélicas

Las frecuencias genotípicas se estimaron calculando la proporción de individuos de la población con cada genotipo, para cada uno de los *locus* estudiados. Para estimar las frecuencias alélicas se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$p (A) = \frac{1,0 AA + 0,5 Aa}{N}$$

$$q (a) = \frac{1,0 aa + 0,5 Aa}{N}$$

Donde p es la frecuencia del alelo "A" y q la frecuencia del alelo "a".

Los resultados del análisis de las frecuencias génicas se expresan en proporciones, por lo que la suma de las frecuencias de los alelos estudiados para el locus es igual a uno.

III.8.2. Equilibrio de Hardy- Weinberg

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg determina qué frecuencias deben esperarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no ocurren fenómenos distorsionadores, como la aparición de nuevas mutaciones o la selección de alelos, la probabilidad de observar una combinación de alelos concreta (un genotipo) depende del producto de las probabilidades (frecuencias) de cada alelo. Las frecuencias genotípicas esperadas surgen a partir del desarrollo del cuadrado del binomio:

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p es la frecuencia alélica del alelo "A" y q la frecuencia del alelo "a"; las frecuencias genotípicas serán p² para el genotipo "AA", 2pq para el heterocigoto "Aa" y q² para

"aa".

Estas frecuencias esperadas se pueden comparar con las observadas utilizando el test de la χ^2 de Pearson, con 1 grado de libertad ($p > 0,05$).

$$\chi^2 = \frac{\sum(O-E)^2}{E}$$

III.8.3. Análisis de asociación de los polimorfismos con radiotoxicidad.

Estimación de *Odds ratio*

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia al grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante un test de χ^2 .

Los riesgos relativos asociados con un genotipo en particular o con las frecuencias génicas han sido estimados mediante el cálculo del OR (*Odds ratio*) considerando sus correspondientes intervalos de confianza al 95% y 99%, para cuantificar la magnitud de la asociación. Tabla de contingencia para el cálculo de OR:

Factor de riesgo o protección	Casos	Controles
Expuestos	a	b
No Expuestos	c	d

El OR se calcula como:

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

Si $OR=1$ No hay asociación del factor con la enfermedad

Si $OR > 1$ Hay asociación. El factor confiere riesgo

Si $OR < 1$ Hay asociación. El factor confiere protección.

III.8.4. Interacciones gen-gen por MDR

Las interacciones entre los genes analizados en este trabajo asociadas con el desarrollo de toxicidad en piel radioinducida, se detectaron mediante la reducción de dimensionalidad multifactorial (o MDR, del inglés *Multifactor Dimensionality Reduction*), que

es un software de código abierto (versión 3.0.2)⁷.

MDR es un modelo genético no paramétrico que es alternativo a los métodos estadísticos tradicionales como la regresión logística. MDR es una minería de datos que se utiliza para la detección y caracterización de interacciones no lineales entre atributos genéticos y ambientales discretos. Este método sirve para detectar y caracterizar combinaciones de variables predictoras (atributos) o variables independientes que interactúan para influir en una variable de clase o dependiente. La base del método es la construcción de un algoritmo que convierte dos o más variables (polimorfismos) en una sola. En lugar de comparar todas las combinaciones de genotipos entre casos y controles, la nueva única variable es asociada con la variable de clase (sano-enfermo). El objetivo final es crear un modelo simple que facilite la detección de interacciones no aditivas o no lineales entre los atributos, tal que la predicción de la variable dependiente sea mejorada con respecto a la representación original de los datos. El MDR es directamente aplicable a estudios de caso-control y tiene un valioso poder para identificar asociaciones entre dos o más *loci* en muestras relativamente pequeñas (Ritchie y col., 2001).

III.8.5. Desequilibrio de ligamiento

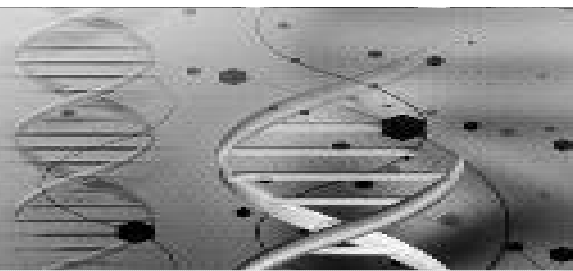
La determinación de los haplotipos de los *SNPs* en genes específicos, se realizó a través de los algoritmos implementados en el programa PHASE v. 2.1.1. Este software implementa un método estadístico bayesiano para reconstruir los haplotipos a partir de datos de genotipos poblacionales. El software se puede aplicar a *SNPs*, microsatélites y otros *loci* multi-alélicos (Stephens y col., 2001; Stephens y Donnelly, 2003).

Entre las ventajas de este programa se puede mencionar que se puede realizar un test de permutación para diferencias estadísticas en las frecuencias de haplotipos en grupos casos/control. PHASE prueba la hipótesis nula de que los haplotipos de casos y controles son una muestra aleatoria de un solo conjunto de frecuencias de haplotipos, frente a la alternativa de que los casos son más similares a otros casos que a los controles. Otra ventaja importante es que este software permite realizar la imputación de alelos perdidos (Stephens y col., 2004).

⁷ disponible en <http://www.epistasis.org/software.html>.

III.8.6. Análisis multivariado mediante Análisis de Componente Principal (ACP)

Se realizó un análisis estadístico multivariado teniendo en cuenta todas las variables intrínsecas relacionadas al paciente incluyendo las genotípicas a través de un análisis de componente principal (ACP) el cual presenta múltiples ventajas (Broschat, 1979): es una técnica que reduce la dimensionalidad de un conjunto de datos multivariados, remueve las interrelaciones existentes entre variables, organiza los datos en forma de vectores ortogonales en donde cada una de las variables dentro del vector se comporta en forma similar en base a sus correlaciones; a cada uno de estos vectores se le llama componente principal. Esta prueba también nos expresa la mayor parte de la varianza de los datos ortogonales y determina que esta prueba es una herramienta útil para simplificar el análisis e interpretación de la gran cantidad de variables consideradas en una evaluación exhaustiva. El análisis estadístico se realizó mediante el empleo del programa SPSS (SPSS Inc., 2013 v22.0).



IV.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA POBLACIÓN

El presente estudio fue realizado con pacientes con CaM provenientes de la ciudad de La Plata y alrededores que fueron tratadas con RT en el *Centro Integrado de Oncología- La Plata, Terapia Radiante*. Se incluyeron 122 pacientes, de las cuales el 88,7% realizó tratamiento conservador y el 9,8% tratamiento pos-mastectomía. Es importante destacar que ninguna de las pacientes que participó en este trabajo fue sometida previamente a otros tratamientos con radiaciones.

A partir de la entrevista de anamnesis realizada a las pacientes y la revisión exhaustiva de sus historias clínicas se realizó una descripción de las características más relevantes de la población bajo estudio (Tabla 8).

TABLA 8. Características clínicas de los pacientes con CaM incluidos en este estudio. S: Si, N: No

Descripción clínica	N ^o de pacientes	Porcentaje
Localización del tumor		
Mama izquierda	74	60,7
Mama derecha	48	39,3
Tipo histológico del tumor		
CDIS	12	10
CDI	85	71
CLI	10	8
Otros	13	11
Quimioterapia neo-adyuvante (S/N)	35/78	31/69
Tamoxifeno (S/N)	68/30	69/31
Diabetes (S/N)	14/103	12/88
Hipertensión (S/N)	42/75	36/64
Fumador (S/N)	32/81	28/72
Consumo de alcohol (S/N)[‡]	10/103	9/91
IMC*		
<25 (normal)	46	41
>25 (sobrepeso y obesidad)	66	59
Tamaño de la mama[#]		
Pequeña	26	24
Mediana	49	46
Grande	32	30

[‡] Consumo de alcohol: corresponde al consumo durante las comidas.
^{*}IMC (Índice de Masa Corporal) = peso (kg)/ estatura (m²)
[#] El tamaño de la mama fue medido por evaluación visual directa.

Con respecto a la edad de las pacientes, se observó una media de 59,6 años (en un rango de 26 a 85 años), una moda de 52 y 62 años y una mediana de 61,5 años, con un desvío estándar de 12,5. En la figura 13 se puede observar un histograma de la distribución de edades.

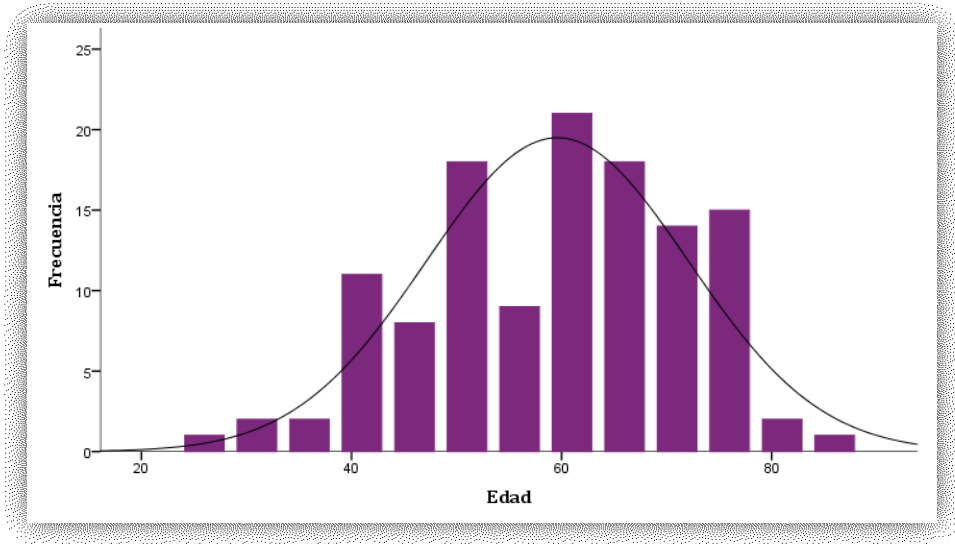


FIGURA 13. Histograma de distribución de frecuencias de edades de pacientes de la población en estudio. La población estuvo constituida por pacientes cuya edad mínima fue de 26 años y máxima de 85 años y una mediana de 61,5 años.

En referencia a los antecedentes familiares de CaM, se observó que el 38% (41/108) de las pacientes presentó antecedentes familiares de primer y segundo grado de parentesco, mientras que el 30% (33/108) manifestó no tener antecedentes de ningún tipo de patología oncológica.

Por otro lado, durante la entrevista de anamnesis, se registraron los datos de ancestría de las pacientes, de las cuales el 60% comentó tener ancestría europea, en su mayoría italiana y española (33% y 18% respectivamente), el 39% ancestría amerindia y el 1% corresponde a otras.

IV.2. MANIFESTACIÓN CLÍNICA DE LA RADIOTOXICIDAD

La evolución de las pacientes durante el tratamiento, fue registrada semanalmente por los médicos radio-oncólogos. Para este análisis se seleccionó el mayor grado de toxicidad manifestado durante el proceso de la RT. De esta manera, se observó que el 75,4% (92/122) de las pacientes presentó efectos de toxicidad aguda cutánea de diferentes grados de severidad. Mientras que el 24,6% (30/122) de las mujeres permaneció sin cambios en la piel (Figura 14). En la figura 15 se pueden observar fotografías de pacientes que mostraron distintos grados de radiodermatitis.

Por otro lado, se observó que la aparición de estos efectos secundarios, surgieron en algunas pacientes (8,7%, 8/92) luego de finalizada la primera semana de tratamiento, con eritema y prurito, a una dosis acumulada de 10 Gy. Sin embargo, en la mayoría de los casos (25%, 23/92), estos efectos surgieron a fines de la cuarta semana a una dosis de 40Gy, observándose una disminución de los casos (9,8%, 9/92) hacia la séptima semana, a una dosis de 70Gy. Estos resultados demuestran que este rasgo cuantitativo responde a una distribución normal (Figura 16). La distribución de los diferentes grados por semana de tratamiento se puede observar en el Anexo 3.

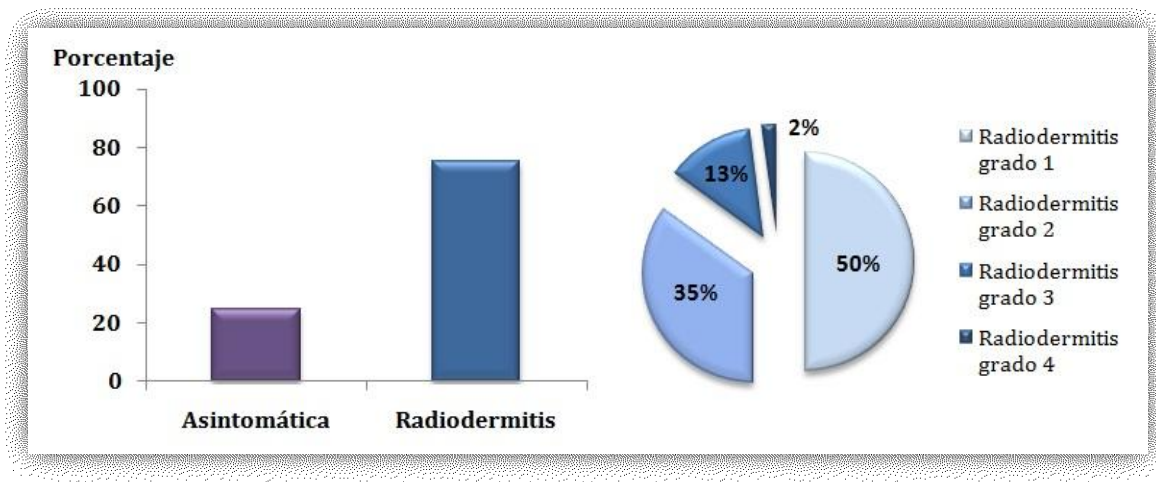


FIGURA 14. Distribución del grado máximo de radiodermitis desarrollado por las pacientes durante el tratamiento. El 75,4% de las pacientes manifestó radiodermis aguda, de ellas, el 50% presentó grado 1, el 35% grado 2, el 13% grado 3 y el 2% grado 4.

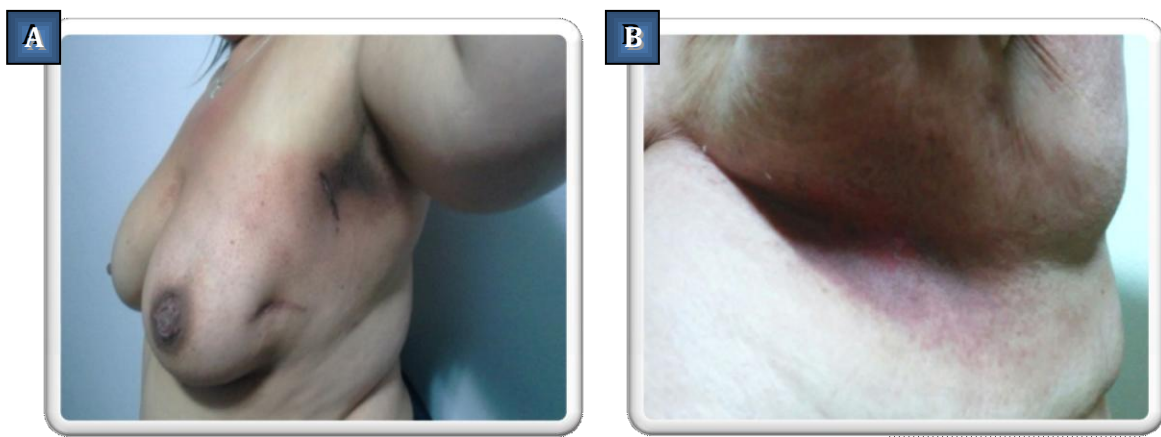


FIGURA 15. Radiodermis aguda en pacientes con CaM sometidas a tratamientos convencionales de RT. A. En la fotografía se observa paciente con descamación seca, eritema y prurito, más notoria en región sub-axilar y en el pliegue sub-mamario. B. Se muestra paciente que presenta una descamación húmeda central, acompañada de descamación seca confluyente y eritema, más marcada en el área de pliegue sub-mamario.

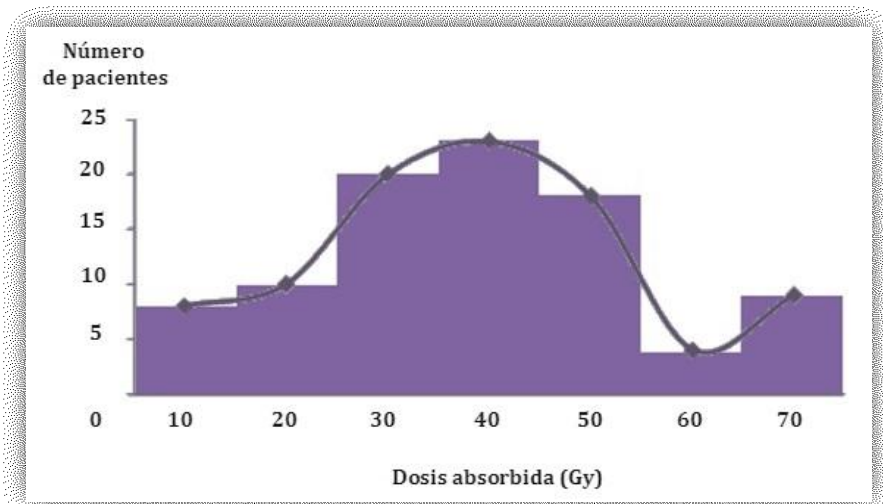


FIGURA 16. Distribución de la radiosensibilidad individual, en relación a la dosis absorbida. Se observa un mayor número de pacientes con radiosensibilidad a una dosis absorbida de radiación de ~ 40 Gy, que corresponde a la cuarta semana de tratamiento.

IV.3. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE

Para realizar el análisis de los *SNPs*, primeramente se procedió a extraer el ADN a partir de las muestras de sangre periférica, hisopado de mucosa bucal y tarjetas *Whatman FTA Elute*. La extracción se llevó a cabo con éxito en todas las muestras obtenidas, tanto en calidad como en cantidad. Además, se realizó la optimización de las amplificaciones por PCR de los fragmentos de interés para los distintos genes en estudio y la genotipificación mediante las técnicas de RFLP y pirosecuenciación.

Luego de obtener los genotipos para cada uno de los marcadores, se calcularon las frecuencias genotípicas y a través del test de HWE se observó que todas se encontraban en equilibrio en comparación a las frecuencias genotípicas teóricas ($p > 0,01$) tanto en la población control como en la de casos.

Además, se calcularon las frecuencias alélicas de los doce polimorfismos bajo estudio y se compararon con las frecuencias alélicas de grandes grupos de poblaciones: americanas (AMR), europeas (EUR), africanas (AFR), asiáticas (EAS y SAS) y el promedio de todas las anteriores (global) obtenidas de la base de datos de *Ensembl*⁸ (Proyecto 1000 Genomas).

⁸ <http://www.ensembl.org/>

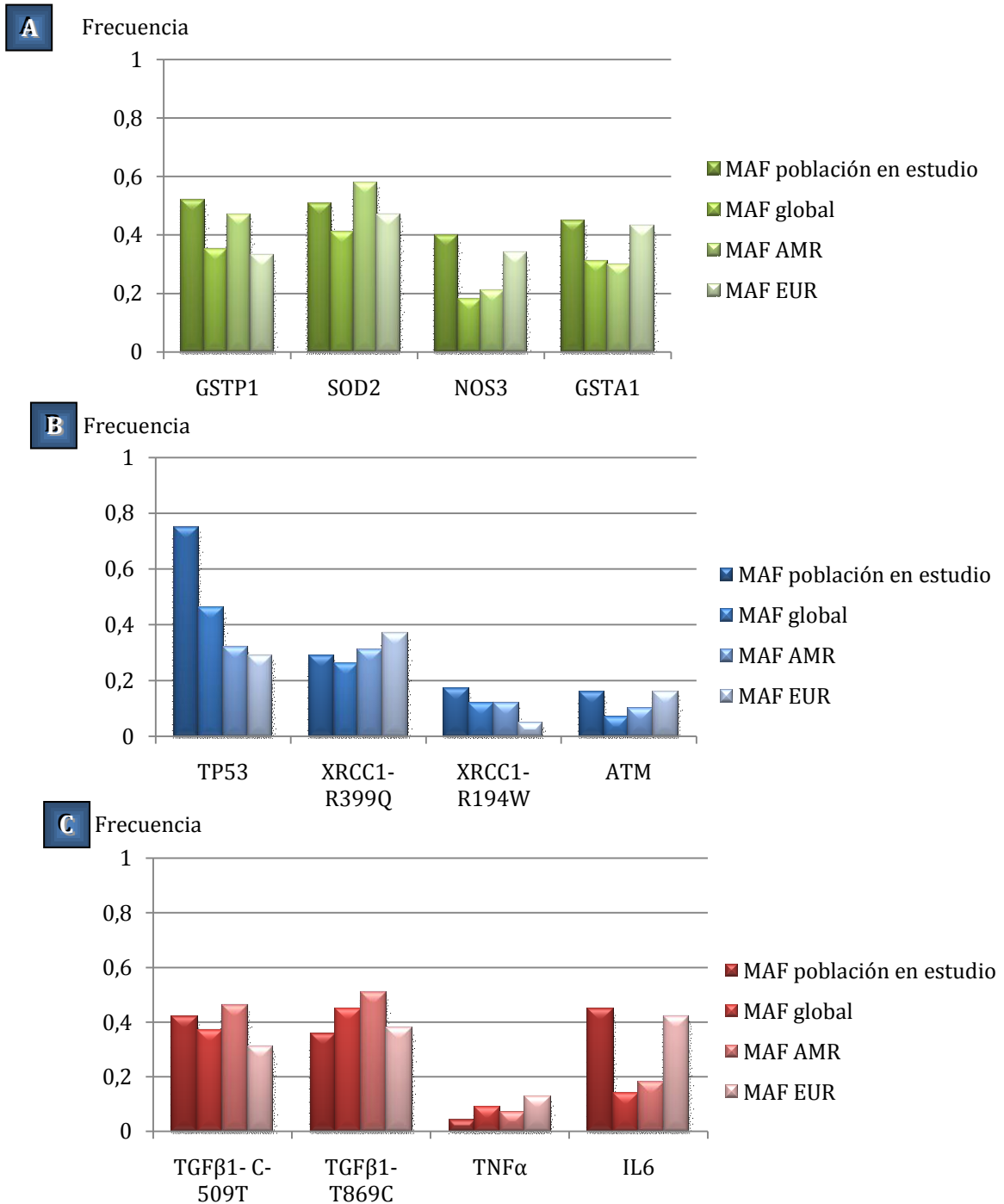


FIGURA 17. Histograma de comparación de Frecuencia del alelo menor (MAF) entre distintas poblaciones. MAF AMR: corresponde a la población americana (CLM, MXL, PEL, PUR). MAF EUR: corresponde a la población europea (CEU, FIN, GBR, IBS, TSI). Se puede observar que hay una mayor similitud entre la MAF de los alelos en estudio y la MAF EUR en los alelos de NOS3, GSTA1, ATM, TGFβ1-T869C e IL6.

CLM: colombianos en Medellín, MXL: mexicanos en California EEUU, PEL: peruanos en Lima, PUR: puertorriqueños en Puerto Rico. CEU: Norte y este de Europa, FIN: finlandeses en Finlandia, GBR: ingleses en Inglaterra y Escocia, IBS: ibéricos en España, TSI: toscanos en Italia.

A través de un análisis de prueba de hipótesis con chi cuadrado se compararon las frecuencias alélicas de la población bajo estudio con todas las antes mencionadas. En relación a la población EUR no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en relación a las frecuencias alélicas de los polimorfismos T47C de SOD2, G894T de NOS3, C-69T de GSTA, G1853A de ATM, P10L de TGF β 1 y G-174C de IL6. Además, más específicamente, se encontró una similitud de frecuencias ($p > 0,05$) con la población de TSI (italiana) para G894T de NOS3. Por otro lado, cuando se analizaron las frecuencias de ésta población con las AMR, se encontraron similitudes entre ambas para A313G de GSTP1, R399Q de XRCC1 y C-509T de TGF β 1. En la figura 17 se pueden observar las frecuencias de los *SNPs* en las poblaciones más relevantes, los genes fueron agrupados de acuerdo a su función para una mejor distinción.

IV.3.1. ASOCIACIÓN DE *SNPs* EN GENES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y RADIOTOXICIDAD AGUDA

A través del empleo de la técnica de PCR-RFLP se realizó la genotipificación de los polimorfismos de genes de estrés oxidativo: A313G de GSTP1, T47C de SOD2, G894T de NOS3 y C-69T de GSTA1. De esta manera, se obtuvo el patrón de corte a partir de la digestión de los amplicones con las ER correspondientes (Figura 18).

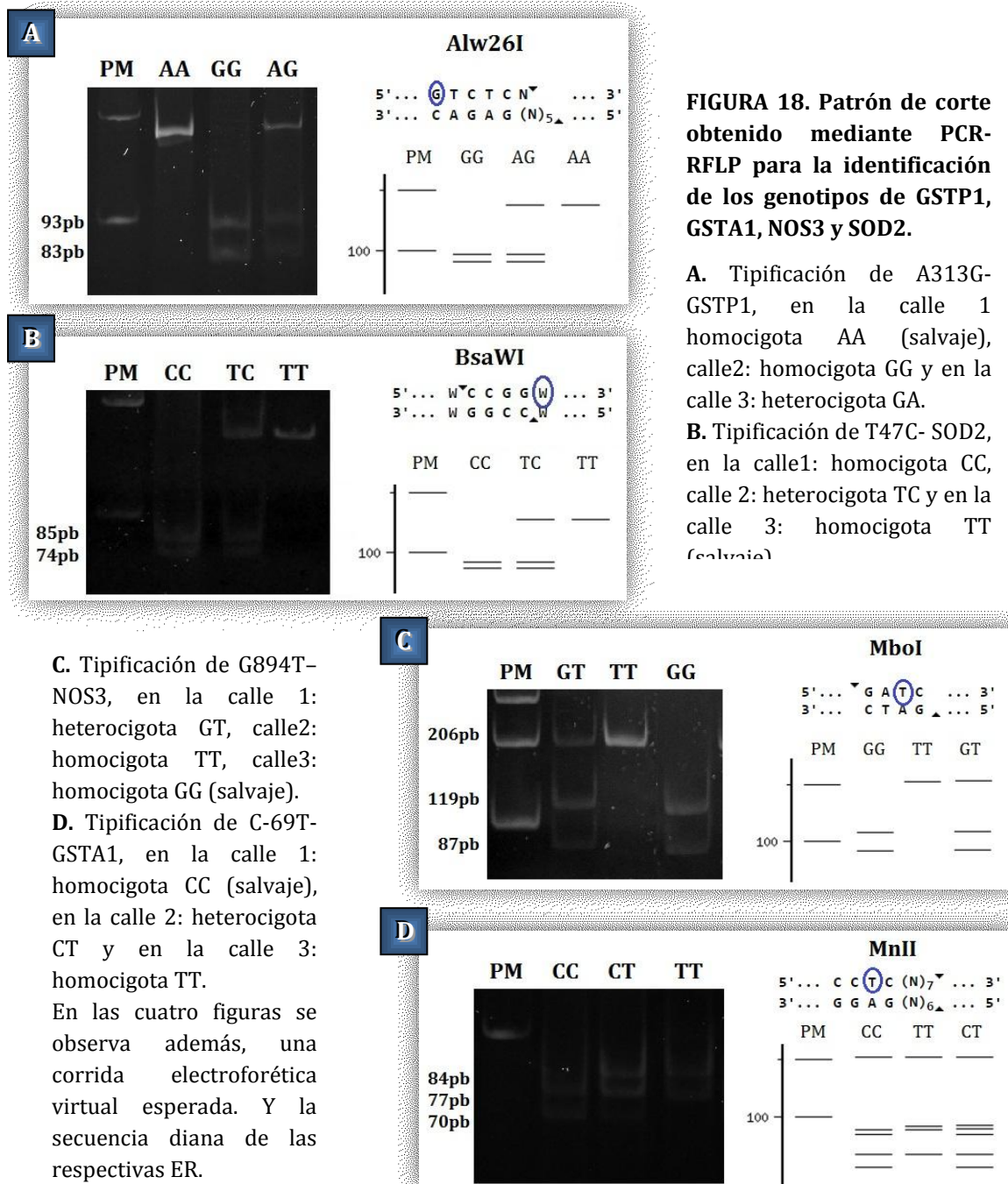


FIGURA 18. Patrón de corte obtenido mediante PCR-RFLP para la identificación de los genotipos de GSTP1, GSTA1, NOS3 y SOD2.

Cuando se realizó el análisis estadístico de asociación entre la frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos A313G de GSTP1, T47C de SOD2, G894T de NOS3 y C-69T de GSTA1 y la manifestación de radiodermatitis aguda de grado ≥ 2 ; no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las variables (Tabla 9). No obstante, cuando el análisis se efectuó exclusivamente en pacientes que realizaron RT y QT neo- adyuvante, se observó una asociación significativa entre el polimorfismo G894T- NOS3 y radiodermatitis aguda de grado ≥ 2 (OR=14,7; IC 95%=11,62-0,65; $p=0,03$), indicando de este modo que el genotipo TT

junto a la acción sinérgica de la QT, aumenta el riesgo de toxicidad en las pacientes que portan este genotipo (Tabla 10).

TABLA 9. Asociación entre los SNPs A313G de GSTP1, T47C de SOD2, G894T de NOS3 y C69T de GSTA1 y efectos adversos de radiotoxicidad aguda en piel.

GEN	GENOTIPO	n (%)	RADIODERMITIS		OR	I.C. 95%	p
			GRADO 0 -1	GRADO ≥2			
GSTP1 A313G	AA	26 (21,49)	16	10			
	AG	64 (52,89)	42	22	0,97	2,38-0,40	0,96
	GG	31 (25,62)	17	14	1,49	3,42-0,61	0,34
	A	58 (48)	37	21			
	G	63 (52)	38	25	1,16	2,42-0,55	0,69
SOD2 T47C	TT	25 (20,66)	15	10			
	TC	69 (57,02)	42	27	0,90	2,21-0,36	0,82
	CC	27 (22,31)	18	9	0,77	1,89-0,31	0,57
	T	59,5 (49)	36	23,5			
	C	61,5 (51)	39	22,5	0,88	1,84-0,42	0,74
NOS3 G894T	GG	52 (43)	32	20			
	GT	51 (42)	33	18	0,94	1,98-0,45	0,88
	TT	19 (15)	11	8	1,24	3,36-0,46	0,66
	G	77,5 (64)	48,5	29			
	T	44,5 (36)	27,5	17	1,03	2,21-0,48	0,93
GSTA1 C69T	CC	33 (27)	22	11			
	CT	68 (56)	41	27	1,26	2,92-0,54	0,59
	TT	20 (17)	13	7	0,89	2,43-0,33	0,82
	C	67 (55)	42,5	24,5			
	T	54 (45)	33,5	20,5	1,06	2,23-0,50	0,87

TABLA 10. Asociación del polimorfismo G894T del gen NOS3 con radiotoxicidad aguda en piel en pacientes con tratamiento radioterapéutico y QT neo-adyuvante.

GEN	GENOTIPO	n (%)	GRADO 0 -1	GRADO ≥2	OR	I.C. 95%	P
NOS3 G894T	GG	15 (43)	11	4			
	GT	16 (46)	10	6	2,75	312,71-0,69	0,16
	TT	4 (11)	0	4	14,7	11,62-0,65	0,03
	G	23 (66)	16	7			
	T	12 (34)	5	7	3,2	13,66-0,75	0,11

IV.3.2. ASOCIACIÓN ENTRE *SNPs* EN GENES DE LA DDR Y RADIOTOXICIDAD AGUDA

Los genes TP53 y XRCC1 participan en diferentes vías de la DDR, los polimorfismos analizados en el presente trabajo: R72P de TP53 y R399Q y R194W de XRCC1, se genotiparon mediante la técnica de PCR- RFLP (Figura 19).

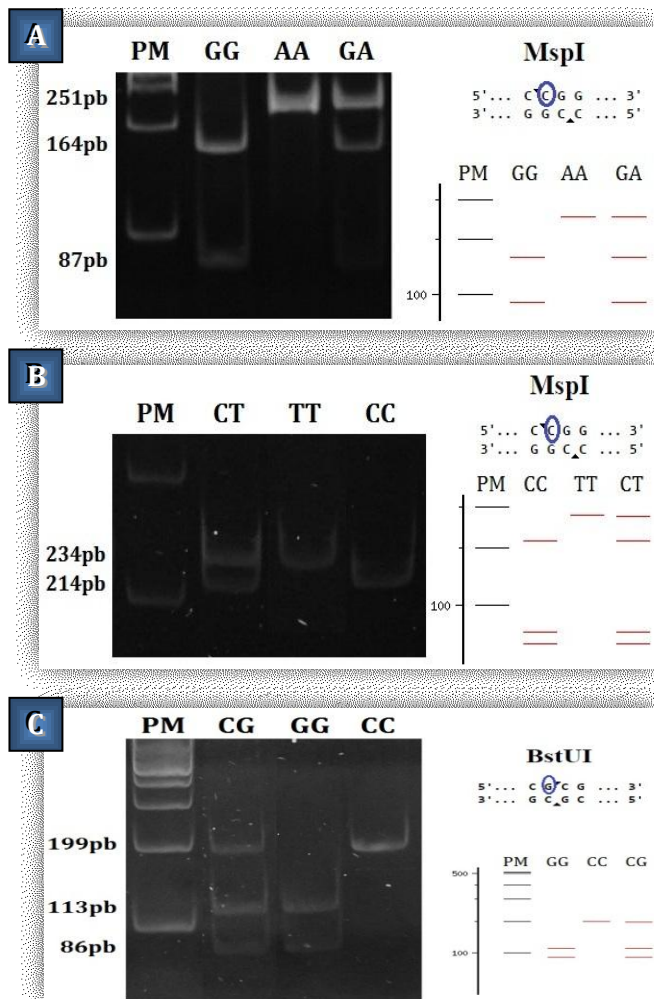


FIGURA 19. Patrón de corte obtenido mediante PCR-RFLP en gels verticales.

A. Tipificación de A399G-XRCC1. En la calle 1: homocigota GG (salvaje), calle2: homocigota AA, calle 3: heterocigota GA.

B. Tipificación de R194W-XRCC1. En la calle1: heterocigota CT, calle 2: homocigota TT, calle 3: homocigota CC (salvaje).

C. Polimorfismo R72P- TP53, calle1: heterocigota CG, calle 2: homocigota GG, calle 3: Homocigota CC (salvaje). Además, en las tres figuras se muestran los patrones de bandas esperados por corrida electroforética virtual; y la secuencia blanco de las

Mediante un análisis estadístico de asociación entre las frecuencias genotípicas y alélicas de los *SNPs* R399Q y R194W de XRCC1 y R72P de TP53 y el desarrollo de radiodermatitis aguda, se observaron diferencias significativas entre la variante R72P del gen TP53 y radiodermatitis aguda de grado ≥ 2 (OR= 0,33; IC 95%= 0,71-0,16; p= 0,004) (Tabla 11), lo cual indica que las pacientes que presentan el genotipo GG estarían asociadas a una menor ocurrencia del efecto.

TABLA 11. Asociación entre los SNPs en genes de reparación del ADN analizados en este estudio y efectos agudos de radiotoxicidad.

GEN	GENOTIPO	n (%)	RADIODERMITIS		OR	IC 95%	p
			GRADO 0-1	≥ GRADO2			
TP53 R72P	CC	11 (9)	6	5			
	CG	38 (31)	17	21	0,7	2,45-0,20	0,57
	GG	73 (60)	53	20	0,33	0,71-0,16	0,004
	C	30 (25)	14,5	15,5			
XRCC1 R194W	G	92 (75)	61,5	30,5	0,46	0,20-1,07	0,07
	CC	79 (69)	51	28			
	CT	33 (29)	18	15	1,3	2,92-0,58	0,52
	TT	3 (2)	3	0	0,32	0,01-6,85	0,44
XRCC1 R399Q	C	95,5 (83)	60	35,5			
	T	19,5 (17)	12	7,5	1,06	0,39-2,87	0,91
	GG	63 (52)	37	26			
	GA	45 (37)	30	15	0,71	0,34-1,50	0,37
	AA	12 (1)	8	4	0,82	0,23-2,88	0,75
	G	85,5 (71)	52	33,5			
	A	34,5 (29)	23	11,5	0,78	0,34-1,78	0,55

IV.3.2.1. Desequilibrio de ligamiento entre las variantes R194W y R399Q del gen XRCC1

Al analizar el desequilibrio de ligamiento entre las variantes R194W y R399Q del gen XRCC1 se encontró que en la presente población se observa un bajo desequilibrio de ligamiento entre estos polimorfismos (LOD=0,17, D'=0,291, r²=0,006). Igualmente, se definieron 4 haplotipos esperados mediante PHASE (GC, GT, AC y AT) y sus frecuencias esperadas (>0,05). Luego, con el objeto de investigar si alguno de ellos se encuentra asociado a un mayor riesgo de manifestar radiodermatitis durante la RT, se realizó un estudio de asociación por el test de chi² (tabla 12). El análisis de asociación general arrojó un valor de p= 0,76, indicando que no existen diferencias significativas entre los haplotipos de los casos y controles.

TABLA 12. Análisis de asociación entre los haplotipos de XRCC1 y radiodermatitis

HAPLOTIPO	R399Q	R194W	Radiodermatitis Grado 0 y 1	Radiodermatitis Grado ≥2	OR	p
1	G	C	84	55	1	--
2	G	T	22	14	0,97	0,94
3	A	C	44	22	0,76	0,38
4	A	T	2	1	0,76	0,83

IV.3.3. ASOCIACIÓN ENTRE SNPs EN EL GEN TGFβ-1 Y RADIOTOXICIDAD AGUDA

La tipificación de los polimorfismos C-509T y T869C de TGFβ1 se llevaron a cabo mediante PCR-RFLP; en la figura 20 se pueden observar los patrones de corte obtenidos.

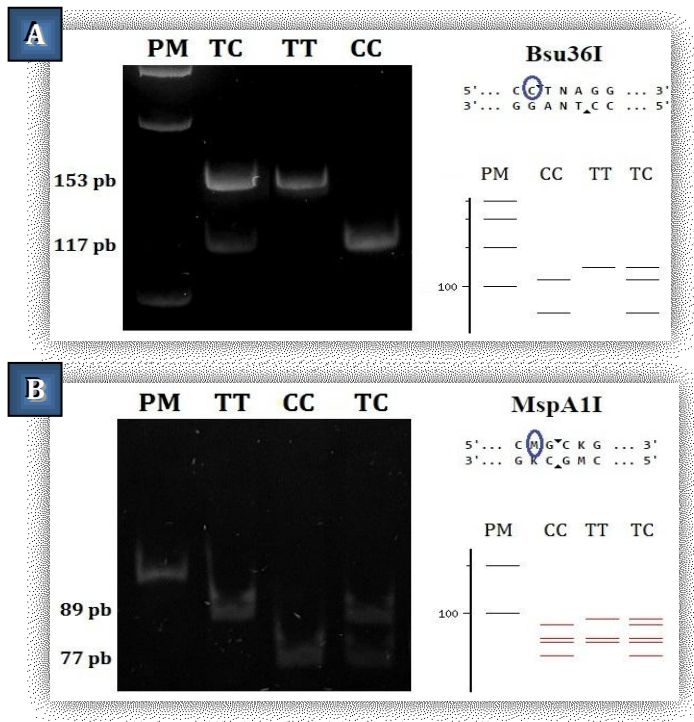


FIGURA 20. Genotipificación por RFLP de TGFβ-1. Electroforesis en gel de poliacrilamida 8-10%.

A. Se observan los productos de la digestión de C-509T. En la calle 1: heterocigota TC, en la calle 2: homocigota TT y en la calle 3: homocigota CC (salvaje).

B. Se muestra el patrón de bandas para T869C. En la calle 1: homocigota TT (salvaje), en la calle 2: homocigota CC y en la calle 3: heterocigota TC. Además, se muestra en ambas figuras una corrida virtual, observándose los genotipos de ambos SNPs y la secuencia diana de ambas ER.

En la tabla 13 se puede visualizar la distribución de los genotipos y alelos de las variantes polimórficas C-509T y P10L de TGFβ-1. Además se observa el análisis de asociación entre los genotipos y alelos y la manifestación de radiodermatitis aguda de grado ≥2, a través del cual se encontró diferencias significativas con el genotipo CC de TGFβ-1 (OR= 0,29; IC 95%= 0,20-1,05; p= 0,027) indicando una disminución del riesgo en los portadores del genotipo comparado con los individuos homocigota GG y heterocigota GC.

TABLA 13. Asociación entre SNPs en TGFβ-1 y efectos agudos de radiotoxicidad.

GEN	GENOTIPO	n (%)	RADIODERMITIS		OR	IC 95%	p
			GRADO 0 y 1	≥ GRADO2			
TGFβ-1 C-509T	GG	38 (31)	20	18			
	GA	64 (53)	41	23	0,56	0,25-1,23	0,15
	AA	19 (16)	14	5	0,53	0,18-1,59	0,25
	G	70 (58)	40,5	29,5			
TGFβ-1 T869C	A	51 (42)	34,5	16,5	1,52	0,72-3,24	0,27
	TT	54 (46)	29	25			
	TC	41 (35)	26	15	0,49	0,22-1,04	0,06
	CC	23 (19)	19	4	0,29	0,09-0,9	0,027
	T	74,5 (63)	42	32,5			
	C	43,5 (37)	32	11,5	0,46	0,20-1,05	0,06

IV.3.3.1. Desequilibrio de ligamiento entre las variantes T869C y C-509T del gen TGFβ-1

Se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento de los SNPs C-509T y T869C mediante el cual se observó que en la presente población se observa un desequilibrio de ligamiento entre estos (LOD=15,65; D'=0,71; r²=0,418). Además se procedió a realizar el análisis de haplotipos con el objeto de evaluar la asociación con alguna combinación alélica y el desarrollo de radiodermatitis. De este análisis se predijeron 4 haplotipos (TG, TA, CG, CA) con una frecuencia mayor a 0,05 mediante PHASE. El análisis de asociación arrojó que las pacientes portadoras del haplotipo 1 (TG) tienen 2,07 veces más riesgo de desarrollar radiodermatitis que aquellas pacientes que presentan el haplotipo CA, sugiriendo que este haplotipo 4 (CA) podría actuar como factor protector (OR=0,48; p= 0,018) (Tabla 14).

TABLA 14. Análisis de asociación entre los haplotipos de TGFβ-1 y el desarrollo de radiodermatitis

HAPLOTIPO	T869C	C-509T	Radiodermatitis Grado 0 y 1	Radiodermatitis Grado ≥2	OR	IC (95%)	p
1	T	G	72	55	1	--	--
2	T	A	13	12	1,2	0,51-2,85	0,66
3	C	G	10	4	0,52	1,75-0,15	0,28
4	C	A	57	21	0,48	0,26-0,88	0,018

IV.3.4. SNPs EN LOS GENES ATM, TNF-α E IL6 POR PIROSECUENCIACIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON RADIODERMITIS SEVERA

Las variantes G1853A de ATM, G-308A de TNF-α y G-174C de IL6 son tratadas en otro apartado puesto que el estudio de estos polimorfismos se realizó en un número reducido de muestras con respecto a los puntos anteriores. Como se mencionó en la sección III de materiales y métodos, se evaluaron exclusivamente 14 pacientes que manifestaron efectos severos de radiotoxicidad (radiodermatitis de grado 3 y 4) y 14 pacientes que demostraron ser asintomáticas durante todo el tratamiento.

La genotipificación de las muestras, para los polimorfismos antes mencionados, se realizó con éxito en su totalidad mediante la tecnología de pirosecuenciación. Se obtuvieron los pirogramas obtenidos para cada genotipo correspondiente a los polimorfismos estudiados (Figuras 21, 22 y 23).

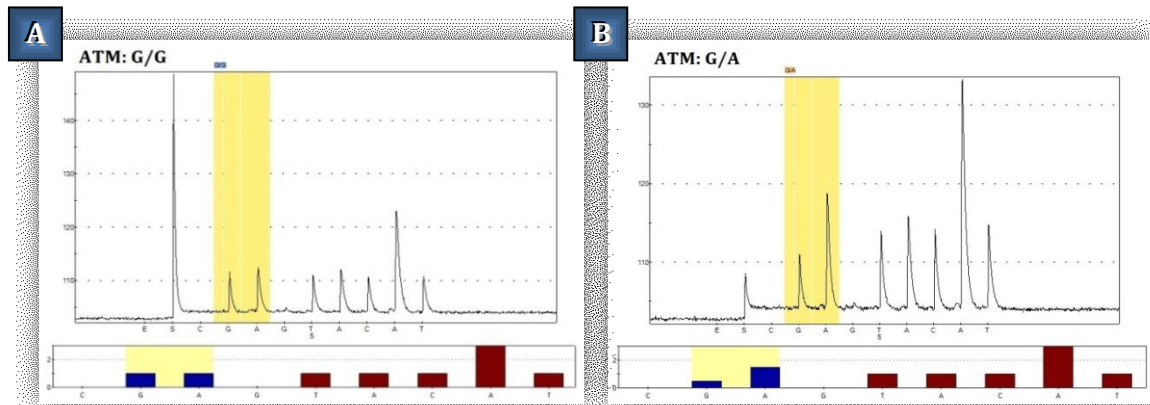


FIGURA 21. Pirograma obtenido de la genotipificación de G1853A de ATM. Abajo se muestra histograma teórico. Los genotipos observados fueron: A. homocigota GG (salvaje), B. heterocigota GA. La secuencia analizada fue: (C) [G/A](G) ATACAAAT

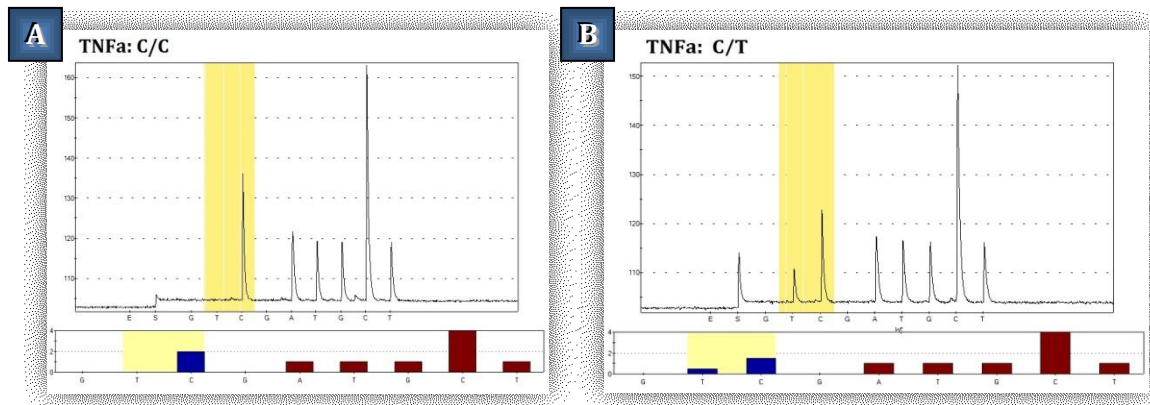
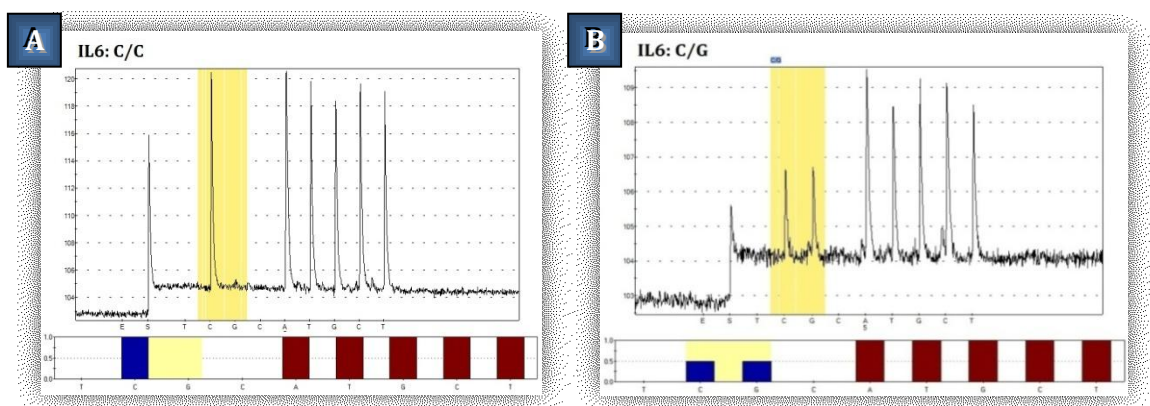


FIGURA 22. Pirograma de la tipificación del SNP G-308A de TNF- α . Abajo se observan los histogramas teóricos. A. Homocigota CC (salvaje), B. Heterocigota CT. La secuencia que se evaluó fue: (G) [T/C] (G) CATGCCCT.



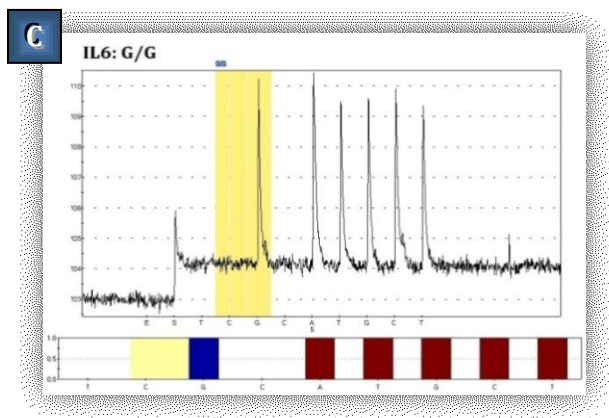


FIGURA 23. Pirograma obtenido de la genotipificación de G-174C de IL6. Abajo histograma teórico. Se muestran los genotipos: **A.** homocigota CC (salvaje), **B.** heterocigota CG y **C.** homocigota GG (mutado). La secuencia que se analizó, adyacente al polimorfismo fue: **(T) [C/G] (C) ATGCT.**

En la tabla 15 se puede observar la distribución genotípica y alélica de G1853A de ATM, G-308A de TNF- α y G-174C de IL6. Se realizó un análisis de asociación entre los polimorfismos y el desarrollo de grados severos de radiodermatitis (3 y 4), no obstante, no arrojó diferencias significativas entre las variables ($p > 0,05$).

TABLA 15. Asociación entre los SNPs G-308A de TNF- α , G-174C de IL6 y G1853A de ATM y manifestación de radiodermatitis a lo largo del tratamiento.

GEN	GENOTIPO	n (%)	RADIODERMITIS		OR	IC 95%	P
			GRADO 0 y 1	\geq GRADO 2			
TNF- α G-308A	CC	26 (93)	14	12	5,83	0,25-133,80	0,22
	CT	2 (7)	0	2			
	TT	0	0	0			
IL6 G-174C	C	27 (96)	14	13	3,23	0,12-85,59	0,46
	T	1 (4)	0	1			
	G	15,5 (55)	7	8,5			
ATM G1853A	GG	6 (21)	2	1	1,54	0,14-2,89	0,57
	GC	19 (68)	10	9			
	CC	3 (11)	2	4			
ATM G1853A	G	23,5 (84)	11,5	10	1,35	0,14-3,54	0,69
	A	4,5 (16)	2,5	4			
	GA	9 (32)	5	4			
	AA	0	0	0			

IV.3.5. INTERACCIÓN ENTRE SNPs POR REDUCCIÓN DE LA DIMENSIONALIDAD MÚLTIPLE (MDR)

Para la evaluación de la interacción entre los polimorfismos analizados en este estudio se utilizó el programa MDR. Este método se introdujo para reducir la dimensionalidad de la información multilocus y mejorar la identificación de combinaciones de polimorfismos asociadas con el riesgo de desarrollar radiodermatitis aguda. Con MDR, los

genotipos multilocus se agrupan en grupos de alto riesgo y bajo riesgo, reduciendo efectivamente los predictores de genotipo de n dimensiones a una dimensión. La nueva variable genotipo multilocus unidimensional se evalúa por su capacidad para clasificar y predecir el estado de la enfermedad mediante validación cruzada y prueba de permutación (Ritchie y col., 2001). Primeramente, se seleccionó un conjunto de n factores genéticos (*SNPs*). Luego, los n factores y sus posibles clases multifactoriales o celdas están representados en un espacio n -dimensional. Por ejemplo, para dos *loci* con tres genotipos cada uno, hay nueve combinaciones de dos genotipos. A continuación, se calcula la proporción del número de casos con el número de controles dentro de cada celda. Después, cada celda multifactorial en el espacio n -dimensional se etiqueta como de “alto o bajo riesgo”.

A través del análisis realizado utilizando la base de datos de todos los *SNPs* estudiados, se obtuvo un diagrama de entropía indicando las interacciones entre los distintos polimorfismos. Luego se realizó el análisis por separado agrupando los *SNPs* de los genes estudiados según su función. Para el conjunto de datos analizado, se seleccionó el modelo con máxima precisión de prueba (TA) y consistencia de validación cruzada (CVC) como el mejor modelo. Para este modelo de tres factores (tres *loci*) conformado por los polimorfismos de tres genes de estrés oxidativo A313G de GSTP1, G894T de NOS3 y C-69T de GSTA1, el análisis estadístico resultó significativo TA=0,6378; $p < 0,05$; y la consistencia del estudio fue óptima (10/10) (Figura 24). Utilizando este método, se pudieron identificar dos grupos de riesgo para radiotoxicidad: de alto de riesgo (celdas gris oscuro) y de bajo riesgo (celdas gris claro). Además, para visualizar la naturaleza y la fuerza de las interacciones entre los polimorfismos se realizó un análisis de entropía (Figura 25). Cada punto de conexión representa un *SNP*, y el valor de entropía, la fuerza del efecto individual de dicho *SNP*. La línea que conecta dos *SNPs* y su valor de entropía representan la interacción entre estos dos polimorfismos y la fuerza de esta interacción. En la figura se puede observar un porcentaje positivo entre A313G de GSTP1 y G894T de NOS3; A313G de GSTP1 y C-69T de GSTA1; C-69T de GSTA1 y G894T de NOS3, indicando de esta manera una relación de sinergia entre cada uno de estos pares de polimorfismos en relación al desarrollo de la radiodermatitis aguda.

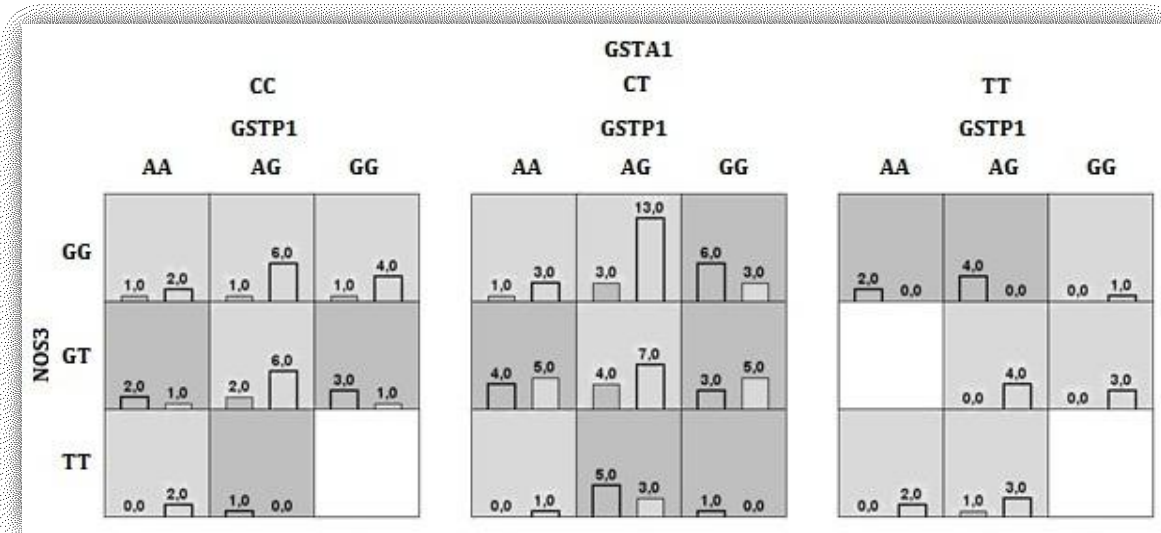


FIGURA 24. Modelo estadístico de asociación multilocus entre los genes GSTP1, NOS3 y GSTA1 y el desarrollo de radiodermatitis. En la combinación de genotipos multilocus se observa la distribución de casos (barra izquierda) y controles (barra derecha). Las celdas oscuras son consideradas de alto riesgo para el fenotipo, mientras que las celdas claras representan un bajo riesgo. Las celdas blancas indican que no existen individuos que presenten combinaciones de esos genotipos.

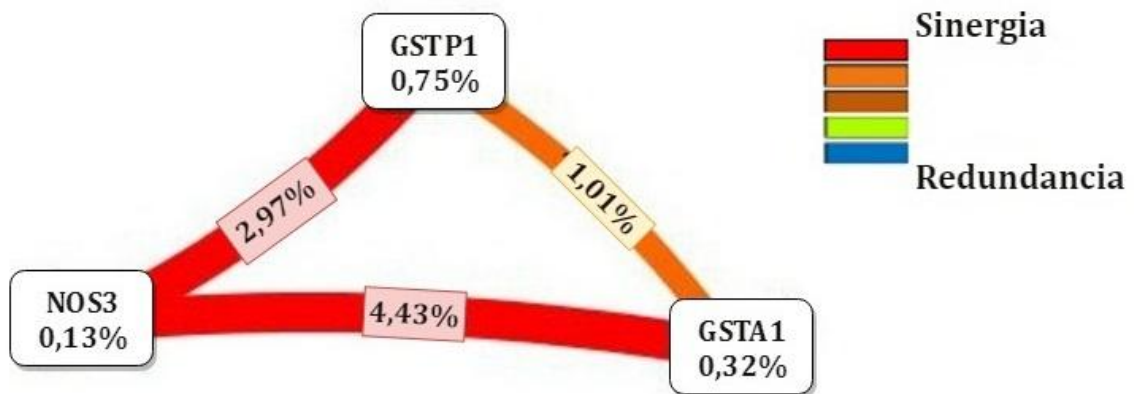


FIGURA 25. Descripción de la entropía y sinergia. Se observa en este modelo el porcentaje de entropía que es explicada por la interacción entre los SNPs de GTP1, GSTA1 y NOS3 y por cada uno de ellos individualmente. Se observa un porcentaje positivo de entropía, lo cual indica ganancia de información o sinergia. La gama de colores representa un continuo desde la sinergia (rojo, representando una interacción no aditiva), a la redundancia (azul, representando pérdida de información).

IV.4. ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y RADIODERMITIS AGUDA

La toxicidad radioinducida es un rasgo multifactorial, además del componente poligénico en el establecimiento del carácter, es preciso considerar algunas características relacionadas al tratamiento y al paciente que podrían estar involucradas.

Los datos demográficos y clínicos de todo el conjunto de pacientes con cáncer de mama se muestran en la Tabla 9. Se realizó un análisis de asociación entre estas variables y la manifestación de radiodermatitis aguda. Con respecto a la edad, se observó que el 46,8% de las pacientes que mostraron radiodermatitis aguda de grado ≥ 2 presentaron una edad en el rango de 56 a 70 años. Además, se encontraron diferencias significativas entre el riesgo de manifestar radiodermatitis severa (grados 3 y 4) y pacientes con edades mayor a la mediana (>59 años) (OR=6,6, $p=0,02$).

En relación al IMC y al tamaño de la mama, se encontró una asociación entre ambas variables (OR=2,87; $p=0,026$; OR=4,62; $p=0,005$, respectivamente) y reacciones agudas en piel de grado ≥ 2 . Las pacientes con un tamaño de mama mediana y grande mostraron 4,62 veces mayor riesgo de desarrollar radiodermatitis que aquellas que presentaron mama pequeña. Además, se observó que el 69% de las pacientes que desarrollaron radiodermatitis con grado ≥ 2 , presentaban un IMC >25 (sobrepeso y obesidad) y las pacientes obesas presentaron 2,87 veces más riesgo de manifestar radiodermatitis que las pacientes con un IMC normal.

En cuanto a la asociación entre hábito de fumar, consumo de alcohol, ingesta de multivitamínicos, anemia, hipertensión, diabetes, color de piel, QT, tamoxifeno, tipo de planificación (2D/3D) y el desarrollo de radiodermatitis aguda, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes ($p<0,05$) (Tabla 16).

Por otro lado, se construyó una tabla de correlaciones entre todas las variables, a partir de la cual se realizó un análisis de componente principal con las variables que presentaron mayor correlación (Figura 26).

TABLA 16. Análisis estadístico de asociación entre factores relacionados al paciente y el tratamiento y radiotoxicidad en piel.

		Total (%)	Radiodermatitis		OR	IC	p
			Grado 0 y 1	Grado ≥ 2			
Diabetes	No	103	64	39	1		
	Si	14	9	5	0,91	0,28-2,91	0,87
	Total	117	73	44			
Hipertensión	No	75	50	25	1		
	Si	42	23	19	1,2	0,76-3,58	0,2
	Total	117	73	44			
Tamaño de la mama	Pequeña	26	22	4	1		
	Mediana	49	28	21	4,1	1,23-13,48	0,016
	Grande	32	16	16	5,5	1,54-19,60	0,005
	Total	107	66	41			
IMC	Normal	46	33	13	1		
	Sobrepeso	35	22	13	1,5	0,58-3,83	0,39
	Obesidad	32	15	17	2,87	1,11-7,40	0,026
	Total	112	70	42			
Color de piel	Morena	74	4	4	1		
	Trigueña	31	21	10	0,68	1,69-2,88	0,42
	Blanca	8	44	30	0,68		0,6
	Mo+Tr/Bl				1,21		0,6
	Total	113	69	44			
Quimioterapia	No	80	53	27	1		
	Si	35	19	16	1,65	0,73-3,71	0,22
	Total	115	72	43			
Tipo de tratamiento	2D	9	6	3	1		
	3D	113	69	44	1,27	0,30-5,36	0,73
	Total	122	75	47			
Alcohol	No	103	65	38	1		
	Si	10	5	5	1,71	0,46-6,29	0,41
	Total	113	70	43			
Tabaco	No	81	50	31	1		
	Si	32	20	12	0,96	0,41-2,25	0,93
	Total	113	70	43			

TABLA 17. Matriz de correlaciones. Se pueden observar las relaciones entre las variables.

		Alcohol	Tabaco	IMC	Tamaño de la mama	Quimio_terapia	Radiodermatitis grado ≥ 2
Correlación	Alcohol	1,000	0,156	0,012	0,029	0,066	0,081
	Tabaco	0,156	1,000	-0,156	-0,012	0,069	-0,026
	IMC	0,012	-0,156	1,000	0,306	-0,066	0,167
	Tamaño de la mama	0,029	-0,012	0,306	1,000	-0,118	0,178
	Quimioterapia	0,066	0,069	-0,066	-0,118	1,000	0,130
	Radiodermatitis grado ≥ 2	0,081	-0,026	0,167	0,178	0,130	1,000
Sig. (unilateral)	Alcohol		0,050	0,450	0,381	0,246	0,198
	Tabaco	0,050		0,050	0,451	0,235	0,394
	IMC	0,450	0,050		0,001	0,245	0,039
	Tamaño de la mama	0,381	0,451	0,001		0,108	0,030
	Quimioterapia	0,246	0,235	0,245	0,108		0,085
	Radiodermatitis grado ≥ 2	0,198	0,394	0,039	0,030	0,085	

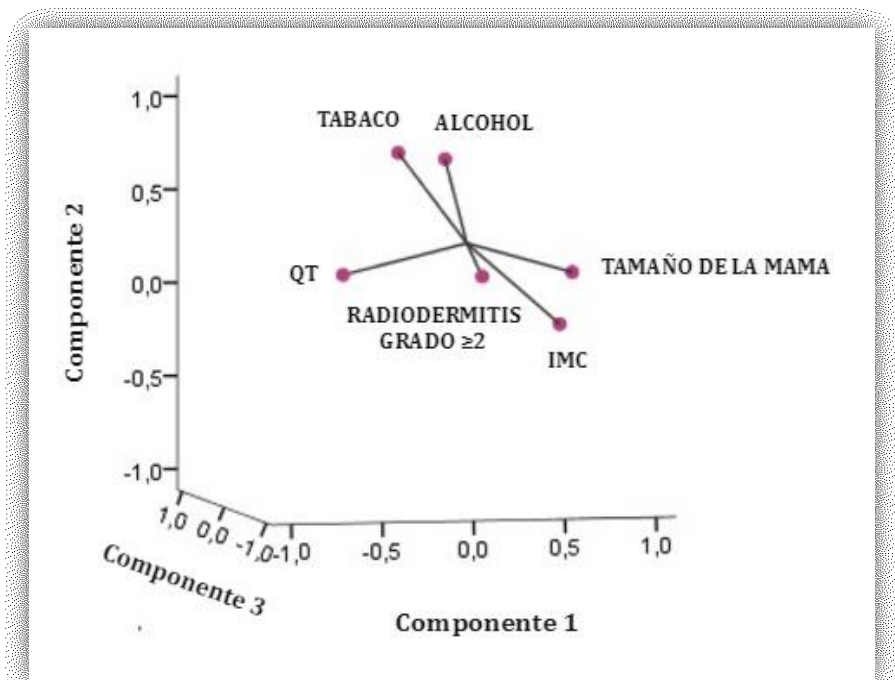


FIGURA 26. Gráfico del análisis de componente principal. Se observa una estrecha relación entre el tamaño de la mama e IMC de las pacientes y la radiodermatitis de grado ≥ 2 desarrollada durante el tratamiento de RT.



V.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La RT es uno de los pilares fundamentales en el tratamiento oncológico. Sin embargo, se continúan observando efectos adversos a pesar de los grandes avances en el área de la Física Médica, razón por la cual numerosas investigaciones se han centrado en desarrollar ensayos que permitan predecirlos. De esta manera, este estudio tuvo como objetivo el análisis de variantes genéticas en genes relacionados con vías radioinducidas y su relación con el riesgo de desarrollar toxicidad cutánea aguda en pacientes con CaM sometidas a regímenes de RT convencionales e hipofraccionados.

Este es el primer trabajo en el cual se aborda el fenotipo desde la radiogenómica en pacientes con CaM de la Argentina. Dada la importancia de esta patología por su frecuencia en la región, se pretende colaborar en la optimización del tratamiento, así como en la comprensión de los mecanismos por los cuales se establece la radiosensibilidad individual.

V.1. RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL. RADIODERMITIS

La radiosensibilidad individual se entiende como el nivel de toxicidad en el tejido sano de los individuos sometidos a RT (West y Barnett, 2011; AGIR, 2013). Pacientes que reciben protocolos similares muestran variabilidad en los efectos adversos, que se manifiestan desde leves a severa y de semanas a toda la vida (Bentzen, 2006). La mayoría de estos efectos podría atribuirse predominantemente al agotamiento de las poblaciones celulares y a la inhibición de su repoblación en los tejidos de renovación rápida, como la piel (Stone y col., 2003 y Brush y col., 2007).

En este estudio, la radiodermatitis fue el efecto secundario más observado durante la RT, en coincidencia con lo reportado por Khanna y col. (2013). Las tres cuartas partes de la población analizada (75,4%) presentó toxicidad en piel, con una mayor incidencia de los grados 1 y 2 (85%) en comparación con los grados más severos, 3 y 4, que representan el 15% (Figura 14). Similarmente, Schnur y col. (2011), argumentan que la mayoría de los pacientes con CaM (74% - 100%) experimentará radiodermatitis durante el curso de la RT a dosis significativas. En tanto, Porock y col. (1999) estiman que de un 10%- 15% de los casos sufren efectos más severos como descamación húmeda o ulceración de la piel. No obstante, Pignol y col. (2008) informan porcentajes más elevados para dermatitis severa (20-25%).

La aparición de los efectos adversos de la RT, hace referencia al tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento y en consecuencia a la dosis acumulada y dependerá de manera significativa de la radiosensibilidad del paciente. Así, los resultados obtenidos en este

trabajo demuestran que en la mayoría de los casos (26%), los eventos de prurito y eritema se presentan hacia el final de la cuarta semana (40Gy) (Figura 16). No obstante, en los individuos con mayor sensibilidad (9%), estos rasgos se adelantan hacia la primera semana con dosis acumulada que alcanza un valor de 10Gy. En tanto, en los individuos más tolerantes (9%), se detectan estos efectos en dosis mayores de 70Gy. De este modo, se observa que la radiosensibilidad individual responde a una distribución normal, y coincide con la descripción teórica expuesta por Burnet y col. (1998) y Barnett y col. (2009).

Aunque se han realizado esfuerzos importantes para evaluar la radiodermatitis en pacientes con CaM, la literatura en esta área es relativamente escasa en comparación con la literatura sobre otros síntomas relacionados con efectos secundarios y calidad de vida (Shnur y col., 2011). Esto puede atribuirse, a que el registro de la toxicidad no suele realizarse de rutina en la mayoría de los centros médicos de RT (AGIR, 2013). Por lo tanto, tal como citan Barnett y col. (2009) es necesario centrar la atención sobre la obtención de una información detallada, precisa y completa sobre los participantes de los estudios durante un período de seguimiento más adecuado, con el fin de maximizar las posibilidades de encontrar una asociación entre la toxicidad inducida por la radiación y el genotipo de los pacientes. Todas las voluntarias incluidas en este trabajo, cumplieron con el seguimiento médico semanal, en el cual, el *staff* de radio-oncólogos de CIO-La Plata registró la evolución del tratamiento (Anexo 2). La comprensión del impacto de la radiodermatitis sobre la calidad de vida, es fundamental no sólo para el manejo correcto de las reacciones cutáneas, sino también para realizar esfuerzos en el desarrollo de ensayos que logren predecirlas.

V.2. POLIMORFISMOS DE BASE SIMPLE Y RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL

La radiosensibilidad individual es un rasgo de herencia poligénica, que implica un fenómeno que excede la mera adición de cada uno de los genes intervinientes, ya que debe considerarse, además, la posición que cada elemento ocupa en las diferentes vías de señalización que se disparan simultáneamente con el tratamiento (Barnett y col., 2009; Kerns y col., 2014a). En los últimos años, el campo de la radiogenómica ha progresado sustancialmente en la identificación y validación de *SNPs* asociados con el desarrollo de la radiotoxicidad del tejido normal (Kerns y col., 2015). Si bien se han abordado numerosas cohortes de pacientes, de diferentes etnias, ninguno de los trabajos ha logrado certificar la asociación entre *SNPs* en genes candidatos y la radiosensibilidad manifestada en tratamientos de mama.

V.2.1. Polimorfismos en genes de estrés oxidativo implicados en la radiodermatitis

La patogénesis del tejido normal es un proceso dinámico iniciado en respuesta a la muerte celular. En los últimos años, se ha evaluado el papel de los radicales libres en el mantenimiento de un estrés sostenido que interfiere con la recuperación tisular e instaura un daño crónico. Este estado se explica por la retroalimentación de ROS, citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, que resultan en lesiones progresivas y finalizan en la lesión tisular (Kim y col., 2014).

En relación a la evaluación de los *SNPs* Ile105Val (rs1695) de GSTP1 y C69T (rs3957356) de GSTA1 se observó en el trabajo de Ambrosone y col (2006) que la variante 105Val de GSTP1 se asoció con un riesgo dos veces mayor para las reacciones cutáneas radioinducidas en pacientes con CaM. Por otra parte, Falvo y col (2011) encontraron que el genotipo salvaje de GSTP1 presentaba un rol protector. En este trabajo al igual que en otros informes (Tan y col., 2006) no se encontró asociación estadísticamente significativa entre Ile105Val de GSTP1 y radiosensibilidad individual. Considerando el polimorfismo C69T de GSTA1 no se pudo corroborar una asociación significativa con efectos adversos en la piel. Frente a esto, Falvo y col. (2011) reportaron una asociación entre el alelo salvaje de GSTA1 y eritema, y antagónicamente, Ambrosone y col. (2006) encontraron a este alelo como un agente protector.

En cuanto al *SNP* T47C (rs4880) del gen SOD2, responsable del cambio no sinónimo de aminoácidos (alanina por valina), se menciona que ninguna de las frecuencias genotípicas y alélicas se asociaron con el riesgo de manifestar radiotoxicidad aguda en coincidencia con los resultados obtenidos por Ahn y col. (2006). No obstante, Andreassen y col. (2003) reportaron una asociación significativa entre el genotipo Val/Ala y el desarrollo de toxicidad tardía (fibrosis subcutánea) en pacientes con CaM.

En relación a NOS3, esta enzima cataliza la producción del radical libre óxido nítrico (ON). Una de las variantes más estudiada en este gen es G894T (rs1799983) que resulta en una sustitución de ácido glutámico por ácido aspártico en el codón 298, el cual altera la susceptibilidad a la escisión y conduce a niveles reducidos de ON (Veldman y col., 2002). En este estudio en el análisis estadístico global no se encontró asociación entre este polimorfismo y el desarrollo de radiodermatitis aguda. No obstante, en un subgrupo de pacientes que recibieron QT neoadyuvante además de RT, se observó que las pacientes homocigotas para el alelo T presentaron mayor riesgo de presentar reacciones adversas en la piel durante el tratamiento (OR=14,7; IC 95%=11,62-0,65; p=0,03). Probablemente, la disminución de ON en estas pacientes, podría estar produciendo un menor efecto

vasodilatador y, en consecuencia, una menor oxigenación e ingesta de nutrientes, necesaria para la reconstrucción tisular. Del mismo modo, se podría exacerbar el daño *in situ* inducido por la quimioterapia. Por otra parte, se sabe que este radical libre activa el sistema inmune, que es fundamental para el establecimiento de los efectos secundarios de la RT (Kim y col., 2014). Dado que este rasgo se ve influenciado por la genética cuantitativa, se realizó un análisis multivariado, sin lograr correlaciones positivas.

Los resultados del presente trabajo no pudieron establecer la asociación entre la toxicidad radioinducida y los polimorfismos específicos de los genes GSTP1, GSTA1, SOD2 y NOS3, esto podría deberse en parte al tamaño de la muestra y a los alelos de baja penetrancia. Además, podrían estar involucradas otras mutaciones en estos genes, en secuencias reguladas por ellas, cambios epigenéticos u otros genes candidatos que participan en esta vía para este rasgo complejo.

V.2.2. Polimorfismo Asp1853Asn en ATM y Arg72Pro en TP53

Los productos proteicos de ATM y TP53 desempeñan un papel clave en la detección y reparación de las DSBs radioinducidas. Existe evidencia epidemiológica que variantes genéticas funcionales en estos genes, pueden tener un impacto en el riesgo de manifestar efectos secundarios inducidos por la RT. Esto ha sido descrito específicamente para cáncer de próstata, mama y pulmón (Cesaretti y col., 2005; Andreassen y col., 2006; Yang y col., 2011).

Considerando que ATM es un elemento crítico que participa como sensor del daño genómico y en la activación de los puntos de control del ciclo celular (Canman y col., 1998). Los polimorfismos de este gen pueden conducir a cambios estructurales y funcionales de la proteína, con el consiguiente costo fenotípico (Su y col., 2014; Dong y col., 2014). De esta manera se consideró oportuno evaluar el *SNP* Asp1853Asn (rs1801516) de ATM. Aunque los resultados de este estudio podrían estar de acuerdo con el metaanálisis de Su y col. (2014), que muestra que Asp1853Asn no contribuye al desarrollo de efectos secundarios inducidos por RT, esta variante estuvo ausente tanto en las pacientes que desarrollaron radiotoxicidad severa (grado 3 y 4) como en las asintomáticas (grado 0) de la población analizada. Por otro lado, es importante mencionar que los resultados con respecto a este *SNP* son controvertidos ya que otros estudios sugieren que el alelo 1853Asn contribuye al riesgo de desarrollar efectos graves en el tejido normal en pacientes con CaM y de próstata sometidos a estas terapias (Dong y col., 2014; Andreassen y col., 2016). Además, ATM es un gen de gran tamaño con muchas variantes documentadas, por lo cual será necesario el estudio de asociación de estos *SNPs* en grandes cohortes para establecer si las variantes individuales o haplotipos contribuyen al desarrollo de radiotoxicidad aguda.

El gen TP53 también posee una función central en la regulación/integración de los puntos de control del ciclo celular, la reparación del ADN y las vías de muerte celular en respuesta al daño radioinducido (Murray y Mirzayans, 2007). La variante Arg72Pro (rs1042522) ha sido una de las más estudiadas a la fecha; se localiza en el codón 72 del exón 4 y codifica ya sea una arginina o una prolina. Se han realizado estudios de asociación entre este *SNP* y radiotoxicidad, aunque los resultados han sido inconsistentes (Tan y col., 2006; Chang-Claude y col., 2009). En este trabajo los datos indicaron que las pacientes portadoras del genotipo homocigota mutado GG está asociado con una disminución en la ocurrencia de radiodermatitis aguda de grado ≥ 2 (OR=0,33; $p=0,004$), a pesar de que inicialmente, en un número menor de muestras evaluadas, la tendencia parecía señalar que este polimorfismo podría aumentar el riesgo de desarrollar radiotoxicidad durante el tratamiento (Córdoba y col., 2014). Resultados similares del trabajo de Tan y col. (2006) realizado con 446 pacientes alemanas con CaM, evidenciaron que no hubo asociación significativa entre Arg72Pro de TP53 y toxicidad cutánea aguda. En línea con los resultados obtenidos en este estudio, Yang y col. (2011) reportaron que pacientes con cáncer de pulmón portadores del alelo 72Pro presentaron un menor riesgo de neumonitis radioinducida.

Es necesario que este *SNP* sea analizado más en profundidad en su posible rol protector. Un análisis funcional de ambas variantes mostró que la forma 72Arg de TP53 indujo la apoptosis de manera más eficiente que la forma 72Pro; en cambio, la forma 72Pro parecía inducir un mayor nivel de arresto G1 que la forma 72Arg (Dumont y col., 2003; Pim y col., 2004). Por lo cual, la reducción en la radiotoxicidad aguda en las pacientes portadoras del genotipo Pro/Pro podría ser explicado por un mayor arresto celular en G1 inducido por la radiación. Es decir, la menor tasa de apoptosis inducida por el alelo 72Pro combinado con el aumento de la actividad de reparación durante la detención en G1 podría disminuir el riesgo de toxicidad cutánea aguda durante la RT en los individuos que llevan el alelo 72Pro

La relación de estos dos *SNPs* con un riesgo aumentado de efectos adversos de la RT aún sigue siendo controvertida, convirtiéndose en el blanco de varios estudios de metaanálisis. Por ejemplo, Su y col. (2014), analizaron el riesgo de radiotoxicidad reportado en 20 artículos sobre 4868 pacientes tratados con RT. A partir de los resultados concluyeron que los polimorfismos ATM Asp1853Asn y TP53 Arg72Pro no contribuyen al desarrollo de efectos secundarios inducidos por radiación en el análisis global.

V.2.3. Polimorfismos R194W y R399Q de XRCC1

Uno de los genes importantes implicados en el proceso de reparación del ADN es el gen XRCC1, que participa en la vía de escisión de base (BER). Está unido a una proteína de

andamiaje que se asocia directamente con otras proteínas, como la ADN polimerasa β , la PARP (ADP-ribose polymerase) y la ADN ligasa III, en un complejo que facilita los procesos de reparación del ADN (Brem y Hall, 2005).

Numerosos estudios han examinado la participación de *SNPs* de este gen en el establecimiento de la radiosensibilidad individual (Andreassen y col., 2003; Chang-Claude y col., 2005). Dos de estos polimorfismos se encuentran presentes en la población general en una frecuencia alélica relativamente alta: la variante alélica del codón 194 (rs1799782, R194W, MAF global 0,12) y la del codón 399 (rs25487, R399Q, MAF global 0,26), que han sido extensivamente estudiadas en estudios epidemiológicos moleculares.

En los primeros abordajes de estudios de asociación de este gen con radiosensibilidad, Andreassen y col. (2003) reportaron que el genotipo Arg399Arg de XRCC1 estaba asociado con efectos tardíos (fibrosis); sin embargo, en una cohorte posterior, no pudieron reproducir estos hallazgos (Andreassen y col., 2006). Giotopoulos y col. (2007) también informaron una asociación positiva de este *SNP*, pero específicamente con telangiectasia tardía. Por otro lado, los grupos de Moullan y col. (2003) y Chang-Claude y col. (2005) quienes investigaron los polimorfismos en XRCC1 (R194W, R280H y R399Q) en torno a efectos secundarios agudos en pacientes con CaM, informaron que ninguno de estos *SNPs* estaba asociado con el fenotipo. En coincidencia, en este estudio se analizó la posible asociación entre las variantes, R194W y R399Q y radiodermatitis. Si bien no se pudo corroborar la asociación entre las frecuencias génicas y genotípicas de estos polimorfismos y el riesgo de desarrollar radiosensibilidad clínica aguda con significancia estadística, se observó una disminución del riesgo de desarrollar dermatitis en aquellas pacientes portadoras del genotipo homocigota TT en el codón 194 (OR=0,32; IC 95% =0,01-6,85; p=0,44). Por el contrario, Falvo y col. (2011) encontraron una relación positiva estadísticamente significativa entre eritema \geq G1 y Arg194Trp. Mientras que observaron una menor tasa de esta lesión en pacientes con mut/het de Arg194Trp o wt de Arg399Gln. Por el contrario, en el estudio de Mangoni y col. (2011) la presencia de la variante de Arg194Trp y el alelo salvaje de Arg399Gln sugirió un riesgo significativo de toxicidad inducida por la radioterapia.

Es sabido que existe un desequilibrio de ligamiento extenso en el *locus* XRCC1, en este trabajo se examinaron ambas variantes en asociación con los efectos agudos de la RT. El análisis de los haplotipos no proporcionó evidencia de la participación de un haplotipo de riesgo, en coincidencia con los resultados obtenidos en el 2005 por Chang-Claude y col. Por otra parte, Brem y col. (2006) en un análisis haplotípico que consideraba un mayor número de *SNPs*, observaron que el haplotipo H3 (alelo salvaje en las 4 posiciones, -77, 194, 280 y 399) estaba asociado inversamente con la radiosensibilidad en comparación con el haplotipo de referencia (OR=0,39; IC 95% =0,16-0,92).

El trabajo realizado por Lunn y col. (1999) sugiere que el polimorfismo del codón 399, situado dentro del dominio BRCT, que interactúa con PARP, puede dar lugar a una reparación deficiente del ADN. Taylor y col. (2002) demostraron que aunque el dominio BRCT1 es crítico para la reparación eficaz de las SSBs y la supervivencia celular, el polimorfismo 399 localizado dentro de este dominio no parece afectar significativamente la función de XRCC1. Por el contrario, Monaco y col. (2007) demostró que el polimorfismo en el exón 10 cambia la estructura secundaria de XRCC1. Estos resultados requieren de más investigaciones para aclarar si la sustitución de Arg/Gln en el codón 399 podría afectar la capacidad de reparación del ADN.

De esta manera, aunque este gen juega un papel importante en diferentes rutas de DDR, su impacto en el establecimiento de la toxicidad radioinducida no ha sido validado todavía.

V.2.4. Polimorfismos en G-308A de TNF- α y G-174C de IL-6

Las consecuencias biológicas de la exposición a la RI se han atribuido exclusivamente al daño del ADN o a la muerte celular. Actualmente, en el establecimiento de la lesión tisular, se considera un efecto holístico que incluye además de estos eventos, al proceso inflamatorio. Los leucocitos reclutados en la zona irradiada liberan ROS, proteasas y otras moléculas que dañan las células normales adyacentes (Mukherjee y col, 2014).

La interleuquina 6 presenta un papel regulador en la proliferación celular, la diferenciación y el equilibrio entre las vías pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. Aunque el promotor de su gen tiene varios *SNPs*, el más estudiado es el G-174C por su influencia en varios tipos de cáncer (Boaventura y col., 2016). Siva y col. (2015) mencionan que la activación de los macrófagos por la radiación, induce la producción de IL-6 que media la respuesta tisular aguda y tardía. Sin embargo, en el presente estudio no se pudo corroborar la participación diferencial de este polimorfismo en el establecimiento de reacciones severas en piel entre las pacientes radiosensibles y las asintomáticas.

En cuanto al polimorfismo G-308A (rs1800629) de TNF- α , está localizado en el promotor, a 308pb aguas arriba del sitio de inicio del transcritto. Mientras que Talbot y col. (2012) reportaron su asociación con radiotoxicidad en mama, mediante un estudio de 340 individuos, los resultados de este trabajo no pudieron corroborar esta tendencia. Esto podría explicarse por el hecho de que los alelos G y A no alteran significativamente la expresión de TNF- α , según lo informado por Mekinian y col. (2011).

En un marco integral, la interacción alélica observada entre los polimorfismos G-174C de IL-6 y G-308A de TNF- α , cobra mayor significancia que el análisis individual de estas variantes. Según lo informado por Schindler y col., (1990) la expresión de TNF- α es influida por IL-6. Las variantes salvajes de esta interleuquina suprimirían la transcripción de TNF- α , y por lo tanto una menor contribución a la radiotoxicidad, mientras que el polimorfismo detectado en la IL-6 no podría ejercer este efecto y liberar la transcripción del Factor de necrosis tumoral agravante del riesgo de presentar efectos agudos.

V.2.5. Polimorfismos C-509T y P10L de TGF β -1

TGF β -1 es una citoquina versátil. Participa en la curación de heridas, la inflamación, la proliferación celular, la angiogénesis y la fibrosis (Andreassen, 2003; Prud'Homme, 2007). La expresión de la isoforma predominante se incrementa por irradiación, superando los niveles normales durante tiempo prolongado, probablemente como respuesta al estrés oxidativo y a la inflamación (Popanda y col., 2008). Los primeros estudios de asociación entre TGF β -1 y radiotoxicidad se realizaron en pacientes que desarrollaron fibrosis tardía. Los dos *SNPs* que han sido más descriptos a la fecha son C-509T (rs1800469) situado en la región promotora y el P10L (rs1800470) que ocasiona una sustitución de una prolina por una leucina en el codón10.

Aunque un gran número de estudios exploratorios, pero pocos confirmatorios, han respaldado la asociación entre *SNPs* de TGF β -1 y el desarrollo de efectos tardíos de la RT. Los pocos estudios con tamaño muestral grande realizados, no pudieron demostrar ninguna asociación clínicamente relevante (Barnett y col., 2010; Barnett y col., 2012; Burnet y col., 2013; Guo y col., 2015).

Por el contrario a lo expuesto en el párrafo anterior, el papel de TGF β -1 en el establecimiento de efectos agudos, ha sido escasamente investigado. En este estudio se analizaron los polimorfismos C-509T (rs1800469) y P10L (rs1800470) y los resultados observados demuestran que el *SNP* rs18000470 se encuentra inversamente asociado al desarrollo de radiodermatitis durante el tratamiento (OR=0,29; p=0,027). Los pacientes portadores del genotipo CC podrían presentar menor riesgo de radiotoxicidad en relación a los homocigotas GG y heterocigotas GC. En línea con estos resultados, Raabe y col. (2012) reportaron que ninguno de estos *SNPs* estaría asociado al desarrollo de eritema en pacientes con CaM. No obstante, el análisis en pacientes con mama pequeña, reveló que el polimorfismo C-509T aumenta el riesgo de desarrollar este efecto (OR = 3.10, 95% CI: 1.11–10.21, p = 0.028).

Asimismo, en este estudio se analizó la presencia de haplotipos asociados al riesgo de desarrollar radiotoxicidad, demostrando que las pacientes portadoras del haplotipo 4 (CA)

están más protegidas. Este resultado podría estar influenciado, en parte, por la asociación de un menor riesgo del *SNP* P10L.

Si bien se muestra que el *SNP* P10L en TGF β -1 podría estar involucrado en la variación de la toxicidad del tejido normal, se necesitan más estudios para corroborar su participación, aumentando el número de muestras y realizando un estudio exploratorio de todo el gen. Por otro lado, es posible que los genes que regulan o modulan su expresión o actividad también podrían estar vinculados con la respuesta del tejido sano (Barnett y col., 2009).

V.2.6. Estudios de asociación basados en *SNPs*

En este estudio se utilizó el enfoque de gen candidato, que permite indagar los efectos de variantes génicas potencialmente involucradas en rasgos cuantitativos, como la radiosensibilidad individual. Este enfoque presenta ventajas como la rapidez y bajo costo y también la identificación de genes con efectos pequeños (Kwon y Goate, 2000). En cuanto al muestreo, no requiere de muchos familiares del individuo afectado, dado que puede realizarse con casos y controles, como en este estudio. La desventaja más importante es que la biología del rasgo debe ser suficientemente entendida (Kwon y Goate, 2000); en alusión a la compleja patogénesis del tejido normal, aun queda mucho por dilucidar. Otro punto objetable es la limitación para incluir todos los genes y polimorfismos posibles y la validación de los resultados (Tabor y col., 2002).

Si bien la mayoría de los estudios de asociación de *SNPs* y radiotoxicidad, publicados hasta la fecha, han utilizado este tipo de enfoque, el avance de la biología molecular y la bioinformática, ha impulsado nuevos métodos de análisis. En el caso de *GWAS* (*Genome Wide Association Study*) se evitaría el conocimiento limitado del rasgo y se podrían identificar nuevos *loci* en las regiones no codificantes del genoma o no exploradas (Barnett y col., 2009). No obstante, hay pocos estudios de este tipo, principalmente en cáncer de próstata (Kerns y col., 2010; Kerns y col., 2013; Fachal y col., 2014) y se precisa potencia estadística para lograr resultados robustos.

Desde otro punto de vista, ha crecido el interés en la secuenciación exómica o de todo el genoma, utilizando técnicas como la secuenciación masiva. Estas permiten la obtención de una mayor cantidad de datos, pero es extremadamente exigente en términos de manejo bioinformático.

De acuerdo a lo expuesto, a medida que se van identificando nuevos genes candidatos mediante estudios en animales o de regiones genómicas implicadas en otros análisis, el enfoque de gen candidato se continuará utilizando (Kwon y col., 2000). No obstante, es poco

probable que a través de un solo enfoque se logre el conocimiento acabado de la susceptibilidad a las radiaciones.

V.3. OTROS FACTORES RELACIONADOS A LA RADIOTOXICIDAD AGUDA

La radiosensibilidad individual es un carácter multifactorial y por lo tanto la influencia ambiental en la expresión fenotípica es fundamental. Sus principales determinantes hacen referencia a los factores físicos, tratamientos concomitantes y a características del paciente. Entre las últimas, las de mayor significancia son la edad, tamaño de mama, IMC, hábitos de fumar, consumo de alcohol y comorbilidades (Turesson y col., 1996; AGIR, 2013). Se destacan a continuación hallazgos particulares de este estudio:

La **edad** se cita frecuentemente como un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones radioinducidas (Bentzen y Overgaard, 1994). Sin embargo, existen evidencias contradictorias de su influencia en la prevalencia y gravedad de este rasgo (Bentzen y Overgaard, 1994; Turesson y col., 1996; Pires y col., 2008). En este trabajo, la evaluación de las medianas de edad no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con efectos adversos de grado ≥ 2 y las asintomáticas y de grado 1. Estos resultados argumentan en favor de otros estudios que sugieren que la RT es bien tolerada en pacientes mayores (Turesson y col., 1996; Pires y col., 2008). No obstante, cuando el análisis se realizó entre pacientes con grado 3 y 4 y asintomáticas, se observó que mujeres mayores de 59 años tienen una tendencia más elevada a presentar radiotoxicidad severa (OR=6,6, p=0.02). Generalmente se considera que la edad avanzada está asociada con un aumento de toxicidad debido a la disminución de la tolerancia del tejido sano. La reducción progresiva de la reserva funcional debido al agotamiento de las células madre de los tejidos podría aumentar el daño tisular y el riesgo de complicaciones. De forma similar, se ha planteado la hipótesis que la reducción en el flujo sanguíneo y la disminución de la reparación del ADN con la edad (Lilla y col., 2007), puedan influir en la tolerancia del tejido normal. Por otro lado, existe evidencia del desarrollo de radiotoxicidad tardía en pacientes longevas con CaM, como pneumonitis, telangiectasia y fibrosis (Gagliardi y col., 2000; Barnett y col., 2011).

El **tamaño de la mama** fue una de las primeras características del paciente que se identificó como influyente en la toxicidad aguda en piel. Varios estudios consideran que interfiere en la incidencia y la gravedad de estos efectos. También se ha demostrado que el **IMC** se asocia independientemente al desarrollo de la radiosensibilidad individual (Kole y col., 2017). Desde la perspectiva del tratamiento, el IMC puede ser visto como un indicador del volumen mamario (Porock, 1998; Barnett y col., 2011). Volúmenes mayores requieren la aplicación de dosis más altas en piel para alcanzar la dosis deseada en las estructuras más

profundas (Pires y col., 2008; Terrazzino y col., 2012). En este estudio, el análisis estadístico demostró que el tamaño de la mama y el IMC estuvieron asociados a un mayor riesgo de manifestar radiodermatitis (OR=4,62, p=0,005; OR= 2,87, p=0,026; respectivamente). En coincidencia con algunos trabajos (Back y col., 2004; Barnett y col., 2011) los resultados expuestos corroboran que las pacientes con senos medianos y grandes muestran una reacción cutánea más severa. Con respecto al IMC, Twardella y col., (2003) han reportado que el sobrepeso/obesidad (IMC >25) aumenta la probabilidad de radiotoxicidad aguda. Esto fue comprobado en este trabajo, donde las mujeres obesas presentan un riesgo aumentado en 2,87 veces con respecto a las normo-nutridas. Posiblemente, esto sea atribuido a la menor eficiencia de la curación por la mala vascularización del tejido adiposo que compromete la cicatrización (Carville, 1995; Oealey, 1994). La obesidad también puede ocasionar un desgaste excesivo de la piel a través de una mayor fricción en el movimiento, lo que provocaría abrasión. Incluso pacientes con mamas grandes pero no obesas pueden presentar un riesgo aumentado de la fricción particularmente si un sujetador es siempre necesario para su sostén. También áreas con pliegues o axilares donde hay piel de oposición son más propensas a reacciones severas debido al aumento de la humedad, calor y fricción, además de la mala ventilación (Porock, 1998).

En cuanto al **hábito de fumar**, no se encontró una asociación significativa, probablemente debido a la baja incidencia de fumadores en este estudio (28%, 32/81). No obstante, existe evidencia de que fumar aumenta la radiosensibilidad clínica en cánceres no solo de mama, sino también pélvicos y de cabeza y cuello (Lilla y col., 2007; Barnett y col., 2011). El tabaquismo podría exacerbar la radiodermatitis por alterar la cicatrización de las heridas (Hymes y col., 2006). Aunque por otro lado, la hipoxia ocasionada crónicamente por el menor índice de oxihemoglobina podría disminuir las probabilidades de causar estos efectos (Henke, 2001).

Un estudio de 348 pacientes que se sometieron a RT para CaM mostró una disminución de toxicidad cutánea aguda en individuos que informaron un consumo regular de vino antes de iniciar el tratamiento (Morganti y col., 2009). En este estudio no ha sido posible corroborar estos resultados, debido a que solo el 9% (10/103) de las pacientes encuestadas consumió **alcohol** durante las comidas.

Entre las enfermedades sistémicas, la **diabetes mellitus** y la **hipertensión** podrían asociarse con una baja tolerancia a la RT (AGIR, 2013). En el presente trabajo el 36% (42/117) de las mujeres eran hipertensas, sin embargo no se observó significancia estadística en relación a la gravedad de las reacciones en piel. Con respecto a la diabetes, sólo el 12%

(14/117) de las pacientes presentaron esta condición y al igual que otros trabajos, no se ha demostrado que sea un factor predisponente para las reacciones cutáneas adversas (Porock y col., 1998; Pires y col., 2008). En coincidencia con estos resultados, Terrazzino y col. (2012) indicaron que no hay pruebas firmes que la diabetes mellitus y la hipertensión represente factores de predisposición para la radiosensibilidad aguda (Turesson y col., 1996; Porock y col., 1998).

En relación a otros elementos multifactoriales, entre los inherentes al tratamiento, los agentes quimioterápicos se consideran que potencian el efecto de la radiación y pueden aumentar el riesgo de manifestar efectos secundarios como la radiodermatitis (Giro y col., 2009). Si bien el uso de la RT en combinación con *quimioterapia* da como resultado una supervivencia global mejorada, con frecuencia, se observa un aumento de toxicidad tanto aguda como tardía. Se han realizado muchos ensayos controlados y aleatorizados de quimioradioterapia versus RT sola, los cuales han mostrado un aumento de la toxicidad aguda, pero no tardía, con la adición de QT (Bentzen y col., 2007). Algunos fármacos además de su propio espectro característico de efectos secundarios (por ejemplo, doxorubicina, actinomicina D, cisplatino, fluorouracilo) pueden sensibilizar a los tejidos normales frente a los daños por radiación. Dicha radiosensibilización puede ocurrir incluso cuando la quimioterapia se administra antes o después de un curso de radioterapia fraccionada. Estudios anteriores han mostrado un peor resultado cosmético y mayor toxicidad tardía cuando se administra quimioterapia, y esto parece ser más pronunciada cuando la QT se administra simultáneamente con RT (Bowden et al, 2006; Collette et al, 2008). En este trabajo algunas pacientes (31% 35/113) realizaron QT neo-adyuvante además del tratamiento radiante. Sin embargo, no se observó que tuvieran una radiosensibilidad aumentada con respecto a las que solo realizaron RT.

Dado que la variación genética difiere entre las diferentes etnias, es probable que algunos rasgos de toxicidad sean más severos en algunas poblaciones debido a la presencia de mutaciones específicas o más frecuentes (AGIR, 2013). No obstante, existen datos limitados sobre el efecto de la *etnicidad* en la radiosensibilidad clínica (Taylor y col., 1995).

Si bien en este trabajo se han encontrado asociaciones significativas entre la radiosensibilidad individual y la edad, el tamaño de mama y el IMC de las pacientes, es necesario realizar más estudios que permitan confirmar estos resultados.

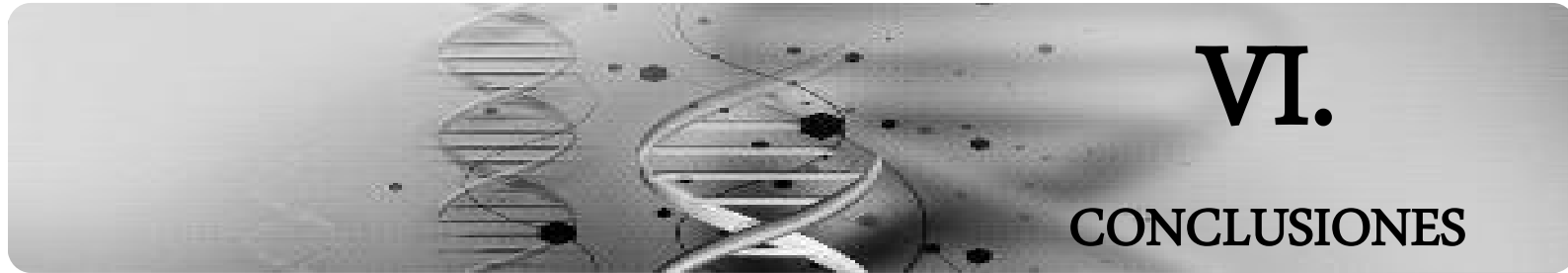
V.4. PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS EN LA RADIOGENÓMICA

El desarrollo de un conjunto de biomarcadores genéticos y su aplicación en el campo de la RT, es el epítome de la atención centrada al paciente oncológico (West y Barnett, 2011).

El interés de la radiogenómica radica en utilizar la información genética para desarrollar modelos que permitan predecir la probabilidad de que el paciente sufra efectos secundarios. Además, se considera la incorporación de parámetros dosimétricos, factores de riesgo clínicos, comorbilidades y otros factores del paciente para mejorar significativamente la precisión predictiva de tales modelos (Kerns y col., 2014a; Barnett y col., 2015). El desarrollo de un perfil de riesgo genético, podría por lo tanto, estratificar a los pacientes en subgrupos con diferentes probabilidades de desarrollar toxicidad. Esto permitiría la prescripción de dosis individualizada, aumentar la supervivencia y disminuir la morbilidad asociada con el cáncer (AGIR, 2013). Los individuos con alto riesgo de desarrollar toxicidad en el tejido normal, podrán experimentar mejores resultados si se aplican tratamientos específicos de RT, aunque el uso de cirugía o quimioterapia, podrían ser más apropiados para estos pacientes. Para la mayoría de las personas que tengan un bajo riesgo de toxicidad, se podrán aplicar protocolos de escalada de dosis con el objetivo de mejorar las tasas de curación sin incrementar la toxicidad (Kerns y col., 2014a).

Se espera que en los próximos años se obtenga una prueba de radiosensibilidad adecuada para el uso clínico de rutina. En términos de genética, existe la necesidad de identificar variantes genéticas que estén inequívocamente asociadas con diferencias en la radiotoxicidad, incluso si su tamaño de efecto individual es pequeño. Por consiguiente, la implementación de un enfoque más amplio como el de GWAS o la secuenciación exómica, permitirá el hallazgo de nuevos genes y vías, que no solo podrán ser incluidos en estos modelos, sino que conducirán a nuevas hipótesis con respecto a la biología de la respuesta a la radiación (Kerns y col., 2014b).

Finalmente, la radiogenómica es un área de investigación emergente y en desarrollo, y enfrenta muchos desafíos que rodean la recopilación de cohortes suficientemente grandes con un registro detallado de toxicidad e información sobre factores de riesgo no genéticos que no se registran de manera rutinaria (West y Barnett, 2011). Así, el establecimiento de consorcios internacionales cumple un papel fundamental en el área, puesto que podría proporcionar una vía para el abordaje de tales necesidades, normalizando la recopilación de datos y realizando estudios de replicación.



VI.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Este trabajo ha sido uno de los primeros realizados en el marco de la radiogenómica en pacientes con cáncer de mama de la Argentina. A partir de los hallazgos obtenidos, se resumen las siguientes conclusiones:

∞ La radiosensibilidad individual es un rasgo complejo, de herencia multifactorial y poligénica, en el cual intervienen tanto factores genéticos como ambientales. Esta aseveración ha sido confirmada empíricamente en este trabajo.

∞ En la población de pacientes analizada, un alto porcentaje de mujeres manifestó radiodermatitis durante el tratamiento de RT (75,4%). Se observó una mayor incidencia de pacientes con radiodermatitis moderada de grados 1 y 2 (64,1%), mientras que el porcentaje de pacientes con radiodermatitis severa de grados 3 y 4, fue menor (11,3%).

∞ La evaluación de los *SNPs* de los genes de estrés oxidativo *GSTP1*, *SOD2*, *NOS3* y *GSTA1* en esta población, no se han podido corroborar como marcadores del desarrollo de efectos agudos consecuentes a la RT. No obstante, un hallazgo significativo, permite sugerir la implicancia del *SNP* G894T del gen *NOS3* en los mecanismos de toxicidad aguda inducida por tratamientos radiantes, bajo la influencia de la quimioterapia.

∞ Por otra parte, considerando las vías de respuesta al daño del ADN, el polimorfismo T72P del gen *TP53* podría estar involucrado en una disminución del riesgo de desarrollar dermatitis radioinducida durante la RT, aunque se necesitan mayores estudios clínicos para confirmar dicha asociación.

∞ Con respecto a los polimorfismos R194W y R399Q de *XRCC1* no se pudo corroborar su relación con el rasgo estudiado. Asimismo, el *SNP* G1853A de *ATM* a pesar de ser una quinasa apical en los mecanismos de detección y reparación del daño genómico, no demostró una asociación significativa con el desarrollo de radiodermatitis severa.

∞ El análisis de las variantes alélicas C-509T y T869C del gen *TGFβ-1*, mostró que las frecuencias genotípicas del polimorfismo T869C se encuentran inversamente asociadas a la radiotoxicidad aguda en piel, presentándose como factor protector del desarrollo de radiodermatitis aguda. Las pacientes portadoras del haplotipo TG presentarían más riesgo de desarrollar radiodermatitis que aquellas pacientes que presentan el haplotipo CA.

∞ En lo que respecta a los polimorfismos de *TNF-α* e *IL6*, que intervienen en el proceso de inflamación, no se observó asociación entre estos y radiodermatitis severa.

∞ El análisis de los polimorfismos con MDR, reveló que existe interacción sinérgica entre Ile105Val de GSTP1 y G894T de NOS3; y C69T de GSTA1 y G894T de NOS3 en relación al riesgo de desarrollar radiodermatitis aguda.

∞ Con respecto a los factores no genéticos, relacionados al paciente, se sugiere que la edad, el Índice de masa corporal y el tamaño de la mama, juegan un rol importante en la contribución al desarrollo de la radiotoxicidad aguda en piel durante el tratamiento de RT. Pacientes con una edad mayor a 59 años presentan mayor riesgo de radiotoxicidad severa. De manera similar, pacientes con sobrepeso y obesidad y mujeres con mamas medianas y grandes tendrían más riesgo que aquellas con senos pequeños e IMC normal.

∞ Finalmente, debido a que la radiosensibilidad individual es un rasgo poligénico, no se puede descartar que existan otras mutaciones en los genes estudiados hasta el momento, en las secuencias que los regulan, o en otros genes candidatos que estén afectando la manifestación de este carácter.



VII.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1000 Genomes Project Consortium** (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68-74.
- Ahmadian A, Ehn M, Hober S** (2006). Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta*, 363(1), 83-94.
- Ambrosone CB, Ahn J, Singh KK, Rezaishiraz H, Furberg H, Sweeney C, et al** (2005). Polymorphisms in genes related to oxidative stress (MPO, MnSOD, CAT) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Research*, 65: 1105-11.
- Ambrosone CB, Tian C, Ahn J, Kropp S, Helmbold I, Fournier D, et al** (2006). Genetic predictors of acute toxicities related to radiation therapy following lumpectomy for breast cancer: a case-series study. *Breast Cancer Research*, 8:40.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J** (2002). Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis—where and how to look for it?. *Radiotherapy and Oncology*, 64(2), 131-140.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J** (2003). Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiotherapy and Oncology*, 69(2):121-5- 127-35.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J, Herskind C, Haviland J, Owen R, et al** (2005). TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 75(1): 18-21.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Sorensen FB, Overgaard J** (2006). Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1; SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM. A study based on DNA from formalin paraffin embedded tissue samples. *International Journal Radiation Biology*, 82(8): 577-86.
- Andreassen CN, Alsner J** (2009). Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review. *Radiotherapy and Oncology*, 92:299-309.
- Andreassen CN, Rosenstein BS, Kerns SL, Ostrer H, De Ruyscher D, Cesaretti JA, et al** (2016). Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. *Radiotherapy and Oncology*, 121(3), 431-439.

- Angele S**, Romestaing P, Moullan N, Vuillaume M, Chapot B, Friesen M, et al (2003). ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Research*, 63(24):8717-25.
- Ahn J**, Ambrosone CB, Kanetsky PA, Tian C, Lehman TA, Kropp S, et al (2006). Polymorphisms in genes related to oxidative stress (CAT, MnSOD, MPO, and eNOS) and acute toxicities from radiation therapy following lumpectomy for breast cancer. *Clinical cancer research*, 12(23), 7063-7070.
- Archanbeau JR**, Pezner R, Wasserman T (1995). Pathophysiology of irradiated skin and breast. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 31(5):1171-1185.
- Attix FH** (1986). Introduction on radiological physics and radiological dosimetry.
- Back M**, Guerrieri M, Wratten C, Teigler A (2004). Impact of radiation therapy on acute toxicity in breast conservation therapy for early breast cancer. *Clinical Oncology*, 16:12-6.
- Banin S**, Moyal L, Shieh SY, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, et al (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281(5383), 1674-1677.
- Barber JB**, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, et al (2000). Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiotherapy and Oncology*, 55(2), 179-186.
- Barnett GC**, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PDP, et al (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nature Reviews Cancer*, 9, 134-142.
- Barnett GC**, Elliott RM, Alsner J, Andreassen CN, Abdelhay O, Burnet NG, et al (2012). Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. *Radiotherapy and Oncology*, 105(3), 289-295.
- Barnett GC**, Kerns SL, Noble DJ, Dunning AM, West CM, Burnet NG (2015). Incorporating genetic biomarkers into predictive models of normal tissue toxicity. *Clinical oncology*, 27(10), 579-587.
- Bartelink H** (2000). Post-mastectomy radiotherapy: recommended standards. *Annals of oncology*, 11, 7-12.

- Bemelmans** MH, van Tits LJ, Buurman WA (1996). Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Critical Reviews in Immunology*, 16: 1-11.
- Bentzen** SM, Overgaard J (1994). Patient-to-patient variability in the expression of radiation induced normal tissue injury. *Seminars Radiation Oncology*, 4, 68-80.
- Bentzen** SM (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nature Reviews Cancer*, 6, 702-713.
- Brem** R, Hall J (2005). XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Research*, 33, 2512-2520.
- Brem** R, Cox DG, Chapot B, Moullan N, Romestaing P, Gerard JP, et al. (2006). The XRCC1-77T→C variant: haplotypes, breast cancer risk, response to radiotherapy and the cellular response to DNA damage. *Carcinogenesis*, 27(12), 2469-2474.
- Broschat** TK (1979). Principal component analysis in horticultural research. *HortScience*, 14:114- 117.
- Brosed** A (2011). Vol.3 Radioterapia externa I. Bases físicas, equipos, determinación de la dosis absorbida y programa de garantía de calidad. En Fundamentos de la física médica (pp 25). Valencia: España: editorial Sociedad española de física médica.
- Burnet** NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH (1998). Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radio-sensitivity. Steering Committee of the BioMed2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy. *International Journal of Cancer*, 79:606-613.
- Burnet** NG, Elliott RM, Dunning A, West CM (2006). Radiosensitivity, radiogenomics and RAPPER. *Clinical Oncology*, 18(7), 525-528.
- Burnet** NG, Barnett GC, Elliott RM, Dearnaley DP, Pharoah PD, Dunning AM, et al (2013). RAPPER: the radiogenomics of radiation toxicity. *Clinical Oncology*, 25(7):431-434.
- Canman** CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, et al (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281(5383), 1677-1679.
- Carrano** AV, Minkler JL, Dillehay LE, Thompson LH (1986). Incorporated bromodeoxyuridine enhances the sister-chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in an EMS-sensitive Chinese hamster cell line. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 162(2), 233-239.

- Chang-Claude** J, Popanda O, Tan XL, Kropp S, Helmbold I, Von Fournier D, et al (2005). Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 11(13):4802-9.
- Chang-Claude** J, Ambrosone CB, Lilla C (2009). Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *British Journal of Cancer*, 100:1680-1686.
- Cheang** MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101: 736-50.
- Chen** Y, Rubin P, Williams J, et al (2001). Circulating IL-6 as a predictor of radiation pneumonitis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 49:641-646,
- Chen** Y, Williams J, Ding I, et al (2002). Radiation pneumonitis and early circulatory cytokines markers. *Semin Radiat Oncol* 12:26-33,
- Cho** N (2016). Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer. *Ultrasonography*, <http://dx.doi.org/10.14366/usg.16030>.
- Committee for Radiation Oncology Studies. Criteria for Radiation Oncology in Multidisciplinary Cancer Management: Report to the Director of the National Cancer Institute, National Institutes of Health. Philadelphia: American College of Radiology, 1986.
- Conde Lagoa** L (2007). *Desarrollo y aplicación de métodos bioinformáticos para el análisis de polimorfismos genéticos* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).
- Córdoba** EE, Abba MC, Fernández E, Lacunza E, Finkelstein SE, Güerci AM (2014). Polymorphic Variant TP53 (R72P) May Suggest Acute Radiotoxicity in Breast Cancer Patients Undergoing Conventional Radiation Treatments. ASTRO's 56th Annual Meeting. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 90: 233-234. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 90:5:1264-1265.
- Cotton** SC, Sharp L, Little J, Brockton N (2000). Glutathione S -transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 151, 1, 7-32.
- Cox** JD, Stetz J, Pajak TF (1995). Toxicity criteria of the radiation therapy oncology group (RTOG) and the European organization for research and treatment of cancer (EORTC). *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 31(5), 1341-1346.

- Damaraju S**, Murray D, Dufour J, Carandang D, Myrehaug S, Fallone G, et al (2006). Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 12 (8): 2545-54.
- Dávila JE y Romero JA** (2009). Cap. 8 Radioterapia conformada com sistemas de planificación en 3D (RTC-3D). En Urdaneta N, Vera A, Peschel RE, Wilson LD. *Radioterapia Oncológica* (pp 252-253). Caracas: Venezuela: Editorial DISINLIMED, CA.
- DeNardo DG**, Andreu P, Coussens LM (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 309-316.
- Derheimer FA & Kastan MB** (2010). Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS letters*, 584(17), 3675-3681.
- De Ruyck K**, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, et al (2005). Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 62(4):1140-1149.
- Di Giorgio M**, Sardi M, Busto E, Vallerga MB, Taja MR, Mairal L (2004). Assessment of individual radiosensitivity in human lymphocytes using micronucleus and microgel electrophoresis "Comet" assays. In Proceedings of the 11th international congress of the International Radiation Protection Association (IRPA-11) (pp. 23-28).
- Djuzenova CS**, Mühl B, Fehn M, Oppitz U, Müller B, Flentje M (2006). Radiosensitivity in breast cancer assessed by the Comet and micronucleus assays. *British journal of cancer*, 94(8), 1194-1203.
- Dong L**, Cui J, Tang F, Cong X, Han F (2015). Ataxia Telangiectasia–Mutated Gene Polymorphisms and Acute Normal Tissue Injuries in Cancer Patients After Radiation Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 91(5), 1090-1098.
- Dotto GP** (2000). p21 WAF1/Cip1: more than a break to the cell cycle?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1471(1), M43-M56.
- Dumont P**, Leu JI, Della PA III, George DL, Murphy M (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics*, 33: 357–365.

- Falvo E**, Strigari L, Citro G, Giordano C, Arcangeli S, Soriani A, et al (2011). Dose and polymorphic genes *xrcc1*, *xrcc3*, *gst* play a role in the risk of article developing erythema in breast cancer patients following single shot partial breast irradiation after conservative surgery. *BMC Cancer*, 11:291.
- Falvo E**, Strigari L, Citro G, Giordano C, Boboc G, Fabretti F, et al (2012). *SNPs* in DNA repair or oxidative stress genes and late subcutaneous fibrosis in patients following single shot partial breast irradiation. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 31:7.
- Ferlay J**, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12):2893-917.
- Filippi AR**, Franco P, Ricardl U (2006). Is clinical radiosensitivity a complex genetically controlled event? *Tumori*, 92 (2): 87-91.
- Finnon P**, Robertson N, Dziwura S, Raffy S, Zhang W, Ainsbury L, et al (2008). Evidence for significant heritability of apoptotic and cell cycle responses to ionising radiation. *Human genetics*, 123(5), 485-493.
- Fisher B**, Costantino J, Redmond C, Fisher E, Margolese R, Dimitrov N, et al (1993). Lumpectomy compared with lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 328(22), 1581-1586.
- Fisher B**, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al (2002). Twenty year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 347(16), 1233-1241.
- Fridovich I**. "Superoxide radical and superoxide dismutases," Annual Review of Biochemistry, vol. 64, pp. 97-112, 1995.
- Gatti RA** (2001). The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncology*, 40, 702-711.
- Giotopoulos G**, Symonds RP, Foweraker K (2007). The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *British Journal of Cancer*, 96:1001-1007.
- Goldhirsch A**, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of oncology*, 24(9), 2206-2223.

- Goyenechea E**, Parra MD, Martínez Hernández JA. (2005). Implicación de la IL-6 y su polimorfismo-174G> C en el control del peso corporal y en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 28, No. 3, pp. 357-366).
- Grivennikov SI**, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Guo Z**, Shu Y, Zhou H, Zhang W, Wang H (2015). Radiogenomics helps to achieve personalized therapy by evaluating patient responses to radiation treatment. *Carcinogenesis*, 36, 3, 307-317
- Güerci AM**, Córdoba EE (2015). Nuevo enfoque de los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. *Revista argentina de radiología*, 79(4), 224-225.
- Haffty BG**, Sucre CV, Vera A (2009). Cap. 28 Cáncer de mama. En Urdaneta N, Vera A, Peschel RE, Wilson LD. *Radioterapia Oncológica* (pp 668-729). Caracas: Venezuela: Editorial DISINLIMED, CA.
- Halsted WS** (1894). I. The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Annals of surgery*, 20(5), 497.
- Hanahan D**, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan D**, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harper JL**, Franklin LE, Jenrette JM, Aguero EG (2004). Skin toxicity during breast irradiation: pathophysiology and management. *Southern Medical Journal*, 97(10), 989-994.
- Hopewell JW** (1990). The skin: its structure and response to ionizing radiation. *International Journal of Radiation and Biology*, 57(4):751-773.
- Horiuchi T**, Mitoma H, Harashima SI, Tsukamoto H, Shimoda T (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 49(7), 1215-1228.
- Hosoya N**, Miyagawa K (2014). Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer science*, 105(4), 370-388.
- Jatoi I**, Proschan MA (2005). Randomized trials of breast-conserving therapy versus mastectomy for primary breast cancer: a pooled analysis of updated results. *American journal of clinical oncology*, 28(3), 289-294.

- Jeggo P, Löbrich M (2006).** Radiation induced DNA damage responses. *Radiation Protection Dosimetry*, 122: 124–127.
- Khan FM (Ed.) (2010).** The physics of radiation therapy. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. (2003).** IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology*, 24(1), 25-29.
- Kastan MB and Bartek J (2004).** Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316.
- Kerns SL, Ostrer H, Rosenstein BS (2014a).** Radiogenomics: using genetics to identify cancer patients at risk for development of adverse effects following radiotherapy. *Cancer discovery*, 4(2), 155-165.
- Kerns SL, West CM, Andreassen CN, Barnett GC, Bentzen SM, Burnet NG, et al (2014b).** Radiogenomics: the search for genetic predictors of radiotherapy response. *Future Oncology*, 10(15), 2391-2406.
- Kerns SL, Kundu S, Oh JH, Singhal SK, Janelins M, Travis LB, et al (2015).** The Prediction of Radiotherapy Toxicity Using Single Nucleotide Polymorphism– Based Models: A Step Toward Prevention. *Seminars in radiation oncology*, 25 (4), 281-291.
- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E (2001).** Epidemiology of breast cancer. *The lancet oncology*, 2(3), 133-140.
- Khanna NR, Kumar DP, Laskar SG, Laskar S (2013).** Radiation dermatitis: An overview. *Indian Journal of Burns*, 21(1), 24.
- Kim JH, Jenrow KA, Brown S (2014).** Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiation Oncology Journal*, 32(3):103-115.
- Ko EC, Forsythe K, Buckstein M, Kao J, Rosenstein BS (2011).** Radiobiological rationale and clinical implications of hypofractionated radiation therapy. *Cancer/Radiotherapie*, 15(3), 221-229.
- Koulis TA, Phan T, Olivotto IA (2015).** Hypofractionated whole breast radiotherapy: current perspectives. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 7, 363.
- Kurz EU and Lees-Miller SP (2004).** DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA repair*, 3(8), 889-900.
- Lancaster JB Jr, Xie K (2006).** Tumors face NO problems?. *Cancer Research*, 66, 6459–6462.
- Lavebratt C, Sengul S, Jansson M, Schalling M (2004).** Pyrosequencing-based SNP allele frequency estimation in DNA pools. *Human Mutation*, 23(1): 92-7.

- Lester** SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. (2009). Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 133(10), 1515-1538.
- Lévy** N, Martz A, Bresson A, Spenlehauer C, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J (2006). XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 34(1), 32-41.
- Listgarten** J, Damaraju S, Poulin B, Cook L, Dufour J, Driga A, et al (2004). Predictive models for breast cancer susceptibility from multiple single nucleotide polymorphisms. *Clinical Cancer Research*, 10(8):2725-37.
- Locksley** RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**:487-501. R. M.
- Lona** JMF, Martínez MS, Alarcón GV, Rodas AB, Bello JR (2013). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México*, 149(5), 521-530.
- Lunn** RG, Langlois LL, Hsieh CL (1999). Thompson, and D. A. Bell, "XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency," *Cancer Research*, vol. 59, no. 11, pp. 2557-2561.
- Luo** H, Chan DW, Yang T, et al (2004). A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of thyl methanesulfonate treatment. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 8356-8365.
- Malhotra** GK, Zhao X, Band H, Band V (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer biology & therapy*, 10(10), 955-960.
- Mangoni** M, Bisanzi S, Carozzi F, Sani C, Biti G, Livi L, Gorini G (2011). Association between genetic polymorphisms in the XRCC1, XRCC3, XPD, GSTM1, GSTT1, MSH2, MLH1, MSH3, and MGMT genes and radiosensitivity in breast cancer patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 81(1), 52-58.
- Martin** LM, Marples B, Coffey M, Lawler M, Lynch TH, Hollywood D, et al (2010). DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treatment Reviews*, 36:518-527.
- Matsuoka** Y, Nakayama H, Yoshida R, Hirose A, Nagata M, Tanaka T, et al. (2016). IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*, 115 (10), 1234-1244.

- McKellar** GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB (2009). Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nature Reviews Cardiology*, 6(6), 410-417.
- McPherson** K, Steel C, Dixon JM (2000). Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*, 321(7261), 624-628.
- Mignotte** B, Vayssiere JL (1998). Mitochondria and apoptosis. *European Journal Biochemistry*; 252, 1215.
- Monaco** R, Rosal R, Dolan MA, Pincus MR, Brandt-Rauf PW (2007). Conformational effects of a common codon 399 polymorphism on the BRCT1 domain of the XRCC1 protein *Protein Journal*, 26, 8, 541-546.
- Moullan** N, Cox DG, Angele S, Romestaing P, Gerard JP, Hall J (2003). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 12:1168-74.
- Murray** D, Mirzayans R (2007). Role of p53 in the repair of ionizing radiation-induced DNA damage, in Landseer BR (ed): *New Research on DNA Repair*. Hauppauge, NY, Nova Science Publishers.
- Njeh** CF, Saunders MW, Langton CM (2010). Accelerated Partial Breast Irradiation (APBI): A review of available techniques. *Radiation Oncology*, 5(1), 1.
- Nordström** T, Nourizad K, Ronaghi M, Nyrén P (2000). Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA. *Analytical biochemistry*, 282(2), 186-193.
- O'Driscoll** M, Jeggo PA (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nature Reviews Cancer*, 7:45-54.
- Okunieff** P, Chen Y, Maguire DJ, Huser AK (2008). Molecular Markers of Radiation-related Normal Tissue Toxicity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(3): 363-374.
- Overgaard** M, Nielsen HM, Overgaard J (2007). Is the benefit of postmastectomy irradiation limited to patients with four or more positive nodes, as recommended in international consensus reports? A subgroup analysis of the DBCG 82 b&c randomized trials. *Radiotherapy and Oncology*, 82(3), 247-253.
- Parliament** MB and Murray D (2010). Single Nucleotide Polymorphisms of DNA Repair Genes as Predictors of Radioresponse. *Seminars in Radiation Oncology*, 20(4):232-40.
- Patrono** C, Sterpone S, Testa A, Cozzi R (2014). Polymorphisms in base excision repair genes: Breast cancer risk and individual radiosensitivity. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(5): 874-882.

- Pierce LJ** (1999). Postmastectomy radiotherapy: Future directions. In *Seminars in radiation oncology* (Vol. 9, No. 3, pp. 300-304). WB Saunders.
- Pignol JP, Olivotto I, Rakovitch E, Gardner S, Sixel K, Beckham W, et al** (2008). A multicenter randomized trial of breast intensity-modulated radiation therapy to reduce acute radiation dermatitis. *Journal of Clinical Oncology*, 26:2085-92.
- Pim D, Banks L** (2004). p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *International Journal of Cancer*, 108: 196–199.
- Pires AMT, Segreto RA, Segreto HRC** (2008). RTOG criteria to evaluate acute skin reaction and its risk factors in patients with breast cancer submitted to radiotherapy. *Rev Latino-am Enfermagem*, 16(5):844-849.
- Poggi MM, Danforth DN, Sciuto LC, Smith SL, Steinberg SM, Liewehr DJ, et al** (2003). Eighteen-year results in the treatment of early breast carcinoma with mastectomy versus breast conservation therapy. *Cancer*, 98(4), 697-702.
- Popanda O, Marquardt JU, Chang-Claude J, Schmezer P** (2009). Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. *Mutation Research*, 667, 58–69.
- Porock D, Kristjanson L, Nikoletti S, Cameron F, Pedler P** (1998). Predicting the severity of radiation skin reactions in women with breast cancer. *Oncol Nurs Forum*, 25:1019-29.
- Porock D, Kristjanson L** (1999). Skin reactions during radiotherapy for breast cancer: The use and impact of topical agents and dressings. *European journal of cancer care*, 8:143-53.
- Prud'Homme GJ** (2007). Pathobiology of transforming growth factor [beta] in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Laboratory investigation*, 87(11), 1077.
- Qian BZ, Pollard JW** (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.
- Recht A, Edge SB** (2003). Evidence-based indications for postmastectomy irradiation. *Surgical Clinics of North America*, 83(4), 995-1013.
- Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, et al** (2001). Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 69(1), 138-147.

- Robles** AI, Linke, SP, Harris CC (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*, 21(45), 6898.
- Rosen** EM, Fan S, Goldberg ID, Rockwell S (2000). Biological Basis of Radiation Sensitivity. Part 1: Factors governing radiation tolerance. *Oncology*, 14(4), 543-550.
- Rosenstein** BS, West CM, Bentzen SM, Alsner J, Andreassen CN, Azria D, et al (2014). Radiogenomics: Radiobiology Enters the Era of Big Data and Team Science. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 89, 4, 709- 713.
- Sakano** S, Wada T, Matsumoto H, Sugiyama S, Inoue R, Eguchi S, et al (2006). Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes might be prognostic factors in muscle invasive bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy. *British Journal of Cancer* 95 (5):561-70.
- Schnur** J, Love B, Scheckner BL, Green S, Wernicke G, Montgomery GH (2011). A systematic review of patient-rated measures of radiodermatitis in breast cancer radiotherapy. *American Journal of Clinical Oncology*, 34(5): 529–536.
- Schwartz** JL (2007). Variability: the common factor linking low dose-induced genomic instability, adaptation and bystander effects. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1), 196-200.
- Seibold** P, Hall P, Schoof N, Nevanlinna H, Heikkinen T, Benner A, et al (2013). Polymorphisms in oxidative stress-related genes and mortality in breast cancer patients-Potential differential effects by radiotherapy?. *Breast*, 22: 817- 823.
- Setlow** RB. Variations in DNA repair among humans. In: Harris CC, Autrup HN, editors. *Human Carcinogenesis*. New York, NY, USA: Academic Press; 1983. pp. 231–254.
- Siva** S, MacManus MP, Martin RF, Martin OA (2015). Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist. *Cancer letters*, 356(1), 82-90.
- Smith** BD, Arthur DW, Buchholz TA, Haffty BG, Hahn CA, Hardenbergh PH, et al (2009). Accelerated partial breast irradiation consensus statement from the American Society for Radiation Oncology (ASTRO). *International Journal of Radiation, Oncology, Biology and Physics*, 74(4), 987-1001.
- Smith** J, Mun Tho L, Xu N, Gillespie DA (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research*, 108 (C), 73-112.
- Smith** KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD (1980). Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 6(11), 1573-1575.

- Sola A** (2006). Radioterapia en el cáncer de mama diseminado. *Rev. Méd. Clín. Condes*, 17(4), 234-236.
- Stephens M**, Smith NJ, Donnelly P (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68(4), 978-989.
- Stephens M** y Donnelly P (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics*, 73(5), 1162-1169.
- Sterpone S**, Cozzi R (2010). Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids*, DOI: 10.4061/2010/780369.
- Su M**, Yin ZH, Wu W, Li XL, Zhou BS (2014). Meta-analysis of associations between ATM Asp1853Asn and TP53 Arg72Pro polymorphisms and adverse effects of cancer radiotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 10675-10681.
- Tan XL**, Popanda O, Ambrosone CB, Kropp S, Helmbold I, Fournier D, et al (2006). Association between TP53 and p21 genetic polymorphisms and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 97:255-62. R. M.
- Taylor A**, Thistlethwaite A, Caldecott KW (2002). Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 8, 2556-2563, 2002.
- Terrazzino S**, La Mattina P, Gambaro G, Masini L, Franco P, Canonico PL, et al (2011). Common Variants of GSTP1, GSTA1, and TGF β 1 are Associated with the Risk of Radiation- Induced Fibrosis in Breast Cancer Patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 83(2):504-11.
- Terrazzino S**, La Mattina P, Masini L, Caltavuturo T, Gambaro G, Canonico PL, et al (2012). Common variants of eNOS and XRCC1 genes may predict acute skin toxicity in breast cancer patients receiving radiotherapy after breast conserving surgery. *Radiotherapy and Oncology*, 103(2):199-205.
- Thomas PS** (2001). Tumour necrosis factor-[alpha]: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunology and cell biology*, 79(2), 132.
- Turesson I**, Nyman J, Holmberg E, Odén A (1996). Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *International Journal of Radiation, Oncology, Biology and Physics*, 36:1065.

- Twardella** D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, et al (2003). Personal characteristics, therapy modalities, and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 69:145-53.
- Vallejos** CS, Gomez HL, Cruz WR, Pinto JA, Dyer RR, Velarde R, et al (2010). Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a Peruvian hospital database. *Clinical breast cancer*, 10(4), 294-300.
- Vander Heiden** MG, Cantley LC, Thompson CB (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029-1033.
- van Gent** DC, Hoeijmakers JH, Kanaar, R (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews. Genetics*, 2(3), 196.
- Veldman** BA, Spiering W, Doevendans PA, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, et al (2002). The Glu298Asp polymorphism of the NOS3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide. *Journal of Hypertension*, 20:2023-7.
- Vidal** AE, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP (2001). XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *The EMBO Journal*, 20: 6530-6539.
- Viniegra** M, Paolino M, Arrossi S. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. 2010.
- Wernstedt** I, Eriksson AL, Berndtsson A, Hoffstedt J, Skrtic S, Hedner T et al (2004). A common polymorphism in the interleukin-6 gene promoter is associated with overweight. *International journal of obesity*, 28: 1272-1279.
- West** CM, Davidson SE, Elyan SAG, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, et al (2001). Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 51(1), 10-15.
- West** CM, Rosenstein BS (2010). Establishment of a radiogenomics consortium. *Radiotherapy and Oncology*, 94(1), 117-118.
- West** CM, Barnett GC (2011). Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: towards prediction. *Genome Medicine*, 3:52.

- Whelan** TJ, Pignol JP, Levine MN, Julian JA, MacKenzie R, Parpia S, Perera F (2010). Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 362(6), 513-520.
- White** J, Joiner MC (2008). Toxicity from radiation in breast cancer. In *Radiation toxicity: a practical guide* (pp. 65-109). Springer US.
- Woods** WG, Byrne TD, Kim TH (1988). Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer*, 62(11), 2341-2345.
- Wu** CT, Chen MF, Chen WC, Hsieh CC, (2013). The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiation oncology*, 8(1), 159.
- Yang** M, Zhang L, Bi N, Ji W, Tan W, Zhao L, et al. (2011). Association of P53 and ATM polymorphisms with risk of radiation-induced pneumonitis in lung cancer patients treated with radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 79(5), 1402-1407.
- Zhao** L, Lu X, Cao Y (2013). MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response. *Cellular signalling*, 25(7), 1625-1634.

RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS on line

AGIR (2013). Human Radiosensitivity. Report of the Independent Advisory Group on Ionising Radiation. Doc. HPA, RCE-21. Health Protection Agency, Chilton. Disponible en <https://www.gov.uk/>

GLOBOCAN (2012). Breast Cancer in the Americas. Disponible en <http://www.paho.org/>.
<http://globocan.iarc.fr>

Instituto Nacional del Cáncer. Disponible en <http://www.cancer.gov/>

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2004). Documentation for PHASE, versión 2.1. Disponible en <http://stephenslab.uchicago.edu/>



VIII.
ANEXO

VIII. ANEXO

ANEXO1: Entrevista de anamnesis



ONCOLOGÍA RADIOTERÁPICA: EVALUACIÓN DE RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL



Historia Clínica N°	Fecha:
PACIENTE	
NOMBRE:	EDAD:
SEXO: F M	LUGAR DE NAC:
Ocupación:	DIRECCIÓN:
CIUDAD:	TEL:
O. ÉTNICO:	

1. ENFERMEDAD ACTUAL

MAMA: TNM:

CIRUGÍA (tipo): FECHA: / /

DHP:

UBICACIÓN DEL TUMOR: ESTATUS GANGLIONAR:

RECEPTORES PROGESTERONA: ESTRADIOL: HER-2/NEU: k67:

QUIMIOTERAPIA: SI NO

ESQUEMA: FECHA: / /

2. ANTECEDENTES

HISTORIA FAMILIAR (vínculo y tipo de cáncer):

MENARCA: ESTATUS MENOPÁUSICO:

CONSUMO DE: ALCOHOL: TABACO: TERAPIAS HORMONALES: OTROS (vitaminas, etc.):

RADIACIÓN PREVIA (causa):

ENFERMEDADES ASOCIADAS: ANEMIA: DIABETES: ENF. DE PIEL: ENF. DE COLÁGENO:

OTRAS (incluidas las oncológicas):

3. EXAMEN FÍSICO

TAMAÑO DE MAMA: G M P PLIEGUES: COLOR DE PIEL:

IMC: ESTADO NUTRICIONAL:

VARIACIONES EN EL PESO:

OBSERVACIONES:

4. TRATAMIENTO RADIANTE

VOLUMEN A IRRADIAR: MAMA: 3D 2D

SCV: 3D 2D

EQUIPO:

ONCOLOGÍA RADIOTERÁPICA: EVALUACIÓN DE RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL

DOSIS TOTAL:

DOSIS DÍA:

ESQUEMA DE FRACCIONAMIENTO:

PROTECCIÓN:

CUÑA:

BOOST: SI NO

ELECTRONES:

FOTONES:

BQT: PEROP POSTOR

DOSIS TOTAL:

DOSIS DÍA:

TRATAMIENTO COMPLETO: SI NO

TRATAMIENTO INCOMPLETO (CAUSAS):

5. EVOLUCIÓN CLÍNICA Y TRATAMIENTO

PRIMERA SEMANA

FECHA:

I. TOXICIDAD EN PIEL: Radiodermatitis de grado:

I:

II:

III:

IV:

II. TOXICIDAD PULMONAR (neumonitis)

III. TOXICIDAD CARDIACA (pericarditis, enfermedad isquémica del miocardio)

IV. ASTENIA

V. LINFIDEMA

VI. TOXICIDAD DE LA MAMA (mastitis, fibrosis, mala cosmética)

VII. OTROS (tumores radioinducidos, demora en la reconstrucción, variaciones en el peso)

SEGUNDA SEMANA

FECHA:

I. TOXICIDAD EN PIEL: Radiodermatitis de grado:

I:

II:

III:

IV:

II. TOXICIDAD PULMONAR (neumonitis)

III. TOXICIDAD CARDIACA (pericarditis, enfermedad isquémica del miocardio)

IV. ASTENIA

V. LINFIDEMA

VI. TOXICIDAD DE LA MAMA (mastitis, fibrosis, mala cosmética)

VII. OTROS (tumores radioinducidos, demora en la reconstrucción, variaciones en el peso)

ONCOLOGÍA RADIOTERÁPICA: EVALUACIÓN DE RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL

TERCERA SEMANA

FECHA:

I. TOXICIDAD EN PIEL: Radiodermatitis de grado:

I:

II:

III:

IV:

II. TOXICIDAD PULMONAR (neumonitis)

III. TOXICIDAD CARDIACA (pericarditis, enfermedad isquémica del miocardio)

IV. ASTENIA

V. LINFIDEMA

VI. TOXICIDAD DE LA MAMA (mastitis, fibrosis, mala cosmética)

VII. OTROS (tumores radiolinducidos, demora en la reconstrucción, variaciones en el peso)

CUARTA SEMANA

FECHA:

I. TOXICIDAD EN PIEL: Radiodermatitis de grado:

I:

II:

III:

IV:

II. TOXICIDAD PULMONAR (neumonitis)

III. TOXICIDAD CARDIACA (pericarditis, enfermedad isquémica del miocardio)

IV. ASTENIA

V. LINFIDEMA

VI. TOXICIDAD DE LA MAMA (mastitis, fibrosis, mala cosmética)

VII. OTROS (tumores radiolinducidos, demora en la reconstrucción, variaciones en el peso)

QUINTA SEMANA

FECHA:

I. TOXICIDAD EN PIEL: Radiodermatitis de grado:

I:

II:

III:

IV:

II. TOXICIDAD PULMONAR (neumonitis)

III. TOXICIDAD CARDIACA (pericarditis, enfermedad isquémica del miocardio)

ONCOLOGÍA RADIOTERÁPICA: EVALUACIÓN DE RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL

- IV. ASTENIA
- V. LINFIDEMA
- VI. TOXICIDAD DE LA MAMA (mastitis, fibrosis, mala cosmética)
- VII. OTROS (tumores radioinducidos, demora en la reconstrucción, variaciones en el peso)

SEXTA SEMANA

FECHA:

- I. TOXICIDAD EN PIEL: Radiodermatitis de grado:
 - I:
 - II:
 - III:
 - IV:
- II. TOXICIDAD PULMONAR (neumonitis)
- III. TOXICIDAD CARDIACA (pericarditis, enfermedad isquémica del miocardio)
- IV. ASTENIA
- V. LINFIDEMA
- VI. TOXICIDAD DE LA MAMA (mastitis, fibrosis, mala cosmética)
- VII. OTROS (tumores radioinducidos, demora en la reconstrucción, variaciones en el peso)

SEPTIMA SEMANA

FECHA:

- I. TOXICIDAD EN PIEL: Radiodermatitis de grado:
 - I:
 - II:
 - III:
 - IV:
- II. TOXICIDAD PULMONAR (neumonitis)
- III. TOXICIDAD CARDIACA (pericarditis, enfermedad isquémica del miocardio)
- IV. ASTENIA
- V. LINFIDEMA
- VI. TOXICIDAD DE LA MAMA (mastitis, fibrosis, mala cosmética)
- VII. OTROS (tumores radioinducidos, demora en la reconstrucción, variaciones en el peso).

ANEXO 2: Consentimiento Informado



Red CIO
TERAPIA RADIANTE
Centros Integrados de Oncología



CONSENTIMIENTO INFORMADO

EVALUACIÓN GENÉTICA DE LA RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL. SU POSIBLE APLICACIÓN EN LA OPTIMIZACIÓN DE TRATAMIENTOS RADIOTERAPÉUTICOS.

Todas las personas tienen una reacción propia ante la radioterapia denominada RADIOSENSIBILIDAD INDIVIDUAL. Esta investigación intenta evaluar si es posible predecir esta respuesta y de esta manera contribuir a un mejor manejo del tratamiento radiante. Se sabe que hay factores genéticos que nos hacen más sensibles a unos que a otros a la radiación. Para el desarrollo de este proyecto, a través de ensayos simples, se solicita solamente, ser voluntario para una extracción de 5ml de sangre, que podría ser de gran utilidad para evaluar este tipo de respuesta. Cabe destacar que estos estudios se realizarán de manera independiente a la terapia que el paciente recibirá, sin influir de manera alguna con la misma.

Por otra parte, se resalta, que para la realización del presente trabajo, es necesario un número elevado de pacientes oncológicos y que los datos serán analizados de manera conjunta.

Informo ser mayor de edad y presentar las características que permitirían incluirme en el estudio. Así, acepto que se me extraigan 5ml de sangre periférica mediante una punción endovenosa, asegurándome el uso del material descartable, y realizada por un profesional idóneo. No tendré otras molestias que la del acto de extracción. La responsabilidad de los integrantes de la investigación se reduce a concretar este acto en las condiciones higiénicas y de experiencia profesional adecuada, no recibiendo pago alguno por mi colaboración. Me aseguran también mi anonimato, tal como lo exige Ley Nacional argentina 25326. Se siguen las normas de los documentos de la Colección de Muestras del Estudio Clínico y los Protocolos se rigen por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, sigla en inglés) y del Ministerio de Salud de la República Argentina. Las jeringas, como todo el material utilizado tendrán un número y nunca nombre y apellido.

Los resultados de este trabajo están en el marco del Programa de Cooperación Interuniversitaria Iberoamericana Intercampus de la Agencia Española de Cooperación Internacional, conjuntamente con la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata y la Universidad Autónoma de Barcelona, siendo ellos los responsables finales de los datos que se pueden encontrar.

Ante cualquier duda me puedo dirigir a cualquiera de los investigadores del Proyecto. Ellos contestarán las dudas de los fines, objetivos, el proceso de la investigación, la forma, el modo y el alcance de la colaboración en cuanto a mi extracción de sangre.

En base a todo esto doy mi consentimiento para ser voluntario de esta investigación.

Dejo expresa constancia que he leído con atención y he comprendido la información precedente acerca de los fines de la investigación y de los alcances de mi colaboración como voluntario.

Nombre y Apellido del voluntario:

Documento de Identidad:

Nombre y Apellido de la persona que acompaña al voluntario:

Documento de Identidad:

Nombre y Apellido del profesional presente que informa:

ANEXO 3: Distribución de los diferentes grados de radiodermitis por semana de tratamiento

GRADO MAXIMO				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	30	24,6	24,6	24,6
1	46	37,7	37,7	62,3
2	32	26,2	26,2	88,5
3	12	9,8	9,8	98,4
4	2	1,6	1,6	100,0
Total	122	100,0	100,0	

SEMANA1				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	114	93,4	93,4	93,4
1	7	5,7	5,7	99,2
4	1	,8	,8	100,0
Total	122	100,0	100,0	

SEMANA2				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	106	86,9	86,9	86,9
1	15	12,3	12,3	99,2
2	1	,8	,8	100,0
Total	122	100,0	100,0	

SEMANA3				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	91	74,6	74,6	74,6
1	28	23,0	23,0	97,5
2	2	1,6	1,6	99,2
4	1	,8	,8	100,0
Total	122	100,0	100,0	

SEMANA4				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	77	63,1	63,1	63,1
1	37	30,3	30,3	93,4
2	4	3,3	3,3	96,7
3	3	2,5	2,5	99,2
4	1	,8	,8	100,0
Total	122	100,0	100,0	

SEMANA5				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	68	55,7	55,7	55,7
1	28	23,0	23,0	78,7
2	21	17,2	17,2	95,9
3	5	4,1	4,1	100,0
Total	122	100,0	100,0	

SEMANA6				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	100	82,0	82,0	82,0
1	7	5,7	5,7	87,7
2	12	9,8	9,8	97,5
3	3	2,5	2,5	100,0
Total	122	100,0	100,0	

SEMANA7				
	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
0	101	82	83	83
1	12	10	10	93
2	7	6	6	98
3	2	2	2	100
Total	122	100	100	