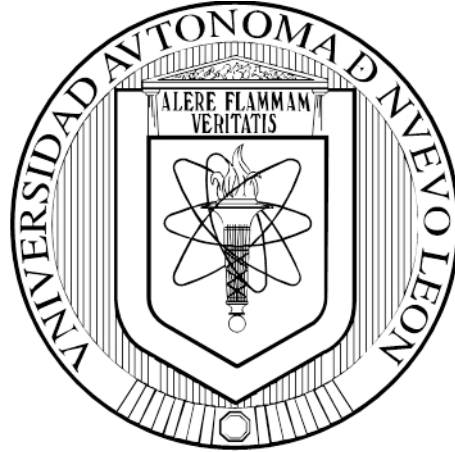


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DE ALTERACIONES GENÓMICAS FOCALES Y AMPLIAS EN
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DUCTAL INFILTRANTE**

PRESENTA

Q.F.B. PAÚL MENDOZA PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

AGOSTO, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DE ALTERACIONES GENÓMICAS FOCALES Y AMPLIAS EN
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DUCTAL INFILTRANTE**

PRESENTA

Q.F.B. PAÚL MENDOZA PÉREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

ASESOR

DR. En C. CARLOS CÓRDOVA FLETES

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO AGOSTO, 2016

**"ANÁLISIS DE ALTERACIONES GENÓMICAS FOCALES Y AMPLIAS EN
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DUCTAL INFILTRANTE"**

Aprobación de la tesis:



Dr. en C. Carlos Córdoba Fletes

Director de Tesis



Dr. en C. Hugo Alberto Barrera Saldaña

Co-Director de Tesis



Dra. en C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla

Miembro de la Comisión



Dra. med. Raquel Garza Guajardo

Subdirectora de Estudios de Posgrado



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dr. Carlos Córdova Fletes.

**Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León,
Monterrey, Nuevo León, 2016.**

DEDICATORIAS

Este logro es dedicado principalmente a mis abuelos, los viejitos de mi vida, ellos que ahora ya tienen cabellos de plata pero aún con corazones de oro. Todo esfuerzo que ellos emplearon en mí, el día de hoy se consume en un logro más.

A mi mamá y hermanita, porque siempre estuvieron ahí, a pesar de las circunstancias, obstáculos y otras adversidades; ellas siempre apoyándome en todo.

A mis tíos que no pueden ser la excepción, principalmente a mi tía Lulú, mi tío Carlos y Omar. Sé que les he dado mucha lata, pero por fin se logró el objetivo. También este esfuerzo es dedicado a Chema, ya que el apoyo hacia mí y a mi familia, en su momento fue importante.

A mis amigos de toda la vida, Mario, Alexis, Diego, Manuel, Eleasín y Francisco. A mis amigos de la tierra huacalera, Kañas, Cesarino, Joo, Raquel, Indira, Andrea y Josué. Otros amigos que no me pueden faltar son, Cristian Esmeralda, Marijó Fuster y Claudia Champo.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos del laboratorio de Citogenómica y Microarreglos, Alex, Ana, Montse, Tony, Priscila, Valeria y Juan, por hacer muy amena mi estancia durante mi periodo de la maestría. Gracias por tantas risas, anécdotas y correcciones durante mi proceso de formación.

A Elda, quien ha sido como una hermana para mí, agradezco haberla conocido y compartir con ella la experiencia de la maestría, “gracias compa”.

Al personal del Departamento de Bioquímica, Juany, Ariadna, Normita, Angie y a don Lalo.

También es importante mencionar a mi colega y “roomie” Ana Karen, gracias por tu compañía, apoyo y todas las actividades que hicimos juntos.

A los miembros de la comisión de mi tesis, el Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y la Dra. Ana María Rivas Estilla, por todos sus comentarios y observaciones con el propósito de mejorar mi formación académica y profesional.

Es menester un agradecimiento especial para el Doctor Carlos Córdova Fletes, por todas sus enseñanzas, por pulirme como estudiante, por aguantarme y también por la confianza brindada para aceptarme como su alumno. Mi estimación total.

No me puede faltar don Francisco Ibarra, mi “abuelo regio”, ya que sus palabras de ánimo y lucha, escucharlas de él todos los días, tuvieron mucho valor para mí.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico brindado, a las autoridades de Posgrado y del Departamento de Bioquímica.

Agradezco las dificultades, pues sin ellas, nunca hubiese descubierto mis fortalezas.

Colaboraciones

Med. Manuel de Jesús García Solís

Clínica de mama

Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”

Med. Gabriela Sepúlveda Castañeda

Clínica de mama

Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”

Med. Cristina García Padilla

Departamento de Cirugía general

Hospital HU “Dr. José E. González”

Dra. med. Raquel Garza Guajardo

Departamento de Citopatología

Hospital HU “Dr. José E. González”

Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado

Jefe del departamento de Cirugía general

Hospital HU “Dr. José E. González”

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
RESUMEN	5
Capítulo I. Introducción	6
1.1 Epidemiología del cáncer de mama.	6
1.2 Síntomas	7
1.3 Abordaje diagnóstico	8
1.3.1 Estudios de imagen	8
1.3.2 Biopsia	9
1.4 Estadificación	10
1.5 Evaluación patológica.	11
1.6 Tratamiento.	11
1.6.1 Tratamiento adyuvante	13
1.7 Factores de riesgo y protectores.	17
1.8 Clasificación del CaMa.	19
1.8.1 Perfiles de expresión génica	19
1.8.2 Bases moleculares del diagnóstico	21
1.9 Variación en el número de copias	22
1.9.1 Posibles mecanismos de formación de CNVs	26
1.9.2 CNAs y la susceptibilidad a cáncer de mama	32
1.9.3 La formación de CNAs como parte integral en la biología del cáncer de mama	33
Capítulo II. Antecedentes	35
Capítulo III. Justificación	38
Capítulo IV. Hipótesis	38
Capítulo V. Objetivos	39
5.1. Objetivo General	39
5.2 Objetivos Específicos	39
Capítulo VI. Material y Métodos	40
6.1 Material de consumo	40

6.2 Equipos de uso general	41
Capítulo VII. Metodología	42
7.1 Tipo de Estudio	42
7.2 Estrategia General	44
Capítulo VIII. Resultados	49
8.1 Estratificación de los pacientes de acuerdo al subtipo molecular de cáncer de mama.	49
8.2 Inmunohistoquímica.	51
8.3 Diferencial cromosómica por subtipo de cáncer de mama.	59
8.4 Genes alterados por subtipo de cáncer de mama.	66
8.5 Principales vías de señalización alteradas en los subtipos de cáncer.	64
8.6 Genes potenciales asociados a subtipos de cáncer de mama	67
8.7 Asociación entre las variables clínicas y los subtipos de cáncer	70
Capítulo IX. Discusión	71
Capítulo X. Conclusiones	98
Capítulo XI. Perspectivas	99
Capítulo XII. Bibliografías	100
Capítulo XIII. Anexos	114



ABREVIATURAS

aCGH	Microarreglos de hibridación genómica comparativa
ADNg	ADN genómico
BAAF	Biopsia por aspiración con aguja fina
BSA	Albúmina de suero bovino
β -ME	β -mercaptoetanol
CAP	Complejo areola-pezón
cDNA	ADN complementario
CNVs	Variaciones en el número de copias
CNAs	Alteraciones en el número de copias
Cy5	Cyanine-5
Cy3	Cyanine-3
CTGF	Familia de factores de crecimiento de tejido
DSB	Hebras rotas de DNA de doble cadena
DTT	1,4-Ditiotreitol
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofina
IHQ	Inmunohistoquímica
IRM	Imagen de resonancia magnética
Ki67	Antígeno de proliferación 67
LCR	Regiones de control génico
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante
miARN	Micro-ARN
MMBIR	Replicación inducida por rupturas y mediada por micro-homologías
NHEJ	Unión de terminaciones no homólogas
MMEJ	Unión de terminaciones mediada por microhomología
NAHR	Recombinación homóloga no álelica
pb	Pares de bases



PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RH	Recombinación homóloga
Rh	Receptores hormonales
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
SERMs	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos
SNP	Polimorfismos de un sólo nucleótido
Trucut	Biopsia con aguja de corte
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Mecanismo de la recombinación homóloga no alélica.	27
2	Formación de una CNV por el mecanismo de MMBIR.	29
3	Estrategia General.	44
4	Tejido tumoral ubicado en la mama.	45
5	Diagrama de la hibridación de las muestras en el Microarreglo.	46
6	Diferencial cromosómico del subtipo Luminal.	54
7	Diferencial cromosómico del Luminal II.	56
8	Diferencial cromosómico del subtipo HER-2.	57
9	Diferencial cromosómico del subtipo HER-2 II.	58
10	Diferencial cromosómico TN.	59
11	Diferencial cromosómico en común en los tres subtipos (Cromosomas 2 y 22).	60
12	Clasificación de los genes alterados con base al tipo de alteración.	61
13	Frecuencia de las variaciones en el número de copias y genes alterados en subtipo Luminal.	62
14	Frecuencia de las variaciones en el número de copias y genes alterados en subtipo HER-2.	63
15	Frecuencia de las variaciones en el número de copias y genes alterados en subtipo Triple Negativo.	64
16	Vías de señalización alteradas en el subtipo Luminal.	65
17	Vías de señalización alteradas en el subtipo HER-2.	66
18	Vías de señalización alteradas en el subtipo TN.	67
19	Genes candidatos propios y en común en los subtipos de CaMa.	68
20	Primer punto de control del aCGH.	139
21	Interacciones entre las principales proteínas alteradas en subtipo Luminal.	141
22	Interacciones entre las principales proteínas alteradas en subtipo HER-2.	142
23	Interacciones entre las principales proteínas alteradas en subtipo HER-2 II.	143
24	Interacciones entre las principales proteínas alteradas en TN.	144

LISTA DE TABLAS

TABLA	CONTENIDO	PÁGINA
1	Sistema de estadificación por TNM.	10
2	Clasificación molecular del cáncer de mama.	21
3	Distribución de los pacientes mediante las características clínicas por subtipo de cáncer.	49
4	Distribución de los factores de riesgos ginecológicos y obstétricos por subtipo de CaMa.	50
5	Distribución de las características patológicas por subtipos de CaMa.	51
6	Inmunohistoquímica realizada y apoyo diagnóstico.	52
7	Diagnóstico molecular presuntivo de los subtipos de CaMa por aCHG.	52
8	Categorización de los pacientes de acuerdo al subtipo molecular de CaMa.	53
9	Asociación entre variables clínicas y subtipos de cáncer.	70
10	Lista de genes candidatos propios y compartidos en los subtipos de CaMa.	79
11	Datos clínico-patológicos de los pacientes con CaMa.	125
12	Volúmenes de Buffer RLTPlus para la disrupción y homogenización de la muestra.	127
13	Requerimientos de ADNg.	130
14	Master Mix de digestión.	131
15	Incubación digestión.	132
16	Master Mix de marcaje.	133
17	Incubación marcaje.	133
18	Rendimiento y actividad específica esperados.	135
19	Master Mix de hibridación.	136
20	Incubación de hibridación.	137
21	Condiciones de lavado.	138
22	Segundo punto de control del aCGH.	140



RESUMEN

“Análisis de alteraciones genómicas focales y amplias en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante”

Introducción: A nivel mundial, el cáncer de mama (CaMa) representa el tumor maligno más frecuente (23% de todos los cánceres,) y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres (14% del total de muertes por neoplasia en mujeres). De acuerdo con datos del Consenso Mexicano de CaMa (CMCaMa), en México, el CaMa ocupa en la actualidad el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres, representa 11.34% de todos los casos de cáncer y presenta un incremento global de ~1.5% anual. El CaMa es una enfermedad heterogénea que consiste de cuatro subtipos principales de tumores: HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)/receptor de estrógeno (RE) negativo, luminal A, luminal B y TN (triple negativo). Estos subtipos exhiben distintos patrones de expresión génica con base a resultados de microarreglos y perfiles clínicos. Es interesante notar que además de la distinción de los subtipos de CaMa por perfiles de expresión génica, recientes abordajes genómicos son arreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) que han demostrado que los subtipos de CaMa están asociados con perfiles de alteraciones de número de copias (CNA) característicos. **Objetivo:** Analizar las alteraciones genómicas focales y amplias en pacientes con CaMa ductal infiltrante mediante aCGH. **Material y métodos:** Se creó una base de datos clínico-patológicos para la estratificación de pacientes/subtipos de CaMa. Se hizo la extracción de ADN, de biopsias en fresco, para la identificación de las diferentes firmas de CNA (a través de aCGH), correspondientes a subtipos de CaMa. Así como también, las principales vías y/o rutas de señalización alteradas en cáncer y los genes implicados en ellas. **Resultados.** Nuestros resultados mostraron que la amplificación de genes, fue la CNA predominante en nuestro estudio, afectando a vías como: angiogénesis, EGF (factor de crecimiento epidérmico) y FGF (factor de crecimiento fibroblástico). Además, se detectaron 25 genes mayormente afectados para Luminal, 14 para HER-2 y 11 para TN; así como cuatro genes compartidos entre los subtipos Luminal y HER2; dos genes compartidos entre Luminal y TN; dos genes más compartidos entre HER-2 y TN. **Conclusiones.** Se logró caracterizar las alteraciones focales y amplias, así como la identificación de genes específicos para cada subtipo de cáncer y su implicación en vías reguladores de la homeostasis celular.

FIRMA DEL ASESOR:

Dr. en C. Carlos Córdoba Fletes



Capítulo I

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un proceso descontrolado del crecimiento y diseminación de células. La etiología del cáncer es multifactorial, debido a la interacción de factores genéticos, ambientales y estilo de vida; que se suman para producir una malignidad. Por ejemplo, el desarrollo de un tumor se asocia con la adquisición de alteraciones genéticas, epigenéticas y los correspondientes cambios en la expresión génica que modifican el control de la proliferación y la supervivencia celular (Donna et al., 2006). Además, debido a estos cambios, la presencia de un tumor representa la posibilidad de invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Cierta porción importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (OMS, 2014).

1.1 Epidemiología del cáncer de mama.

El cáncer de mama (CaMa) es la primera causa de muerte por neoplasia en la mujer en el ámbito mundial con cerca de 500 mil decesos cada año, de los cuales el 70% ocurre en países en desarrollo (Consenso Mexicano, 2015). El riesgo de padecer esta enfermedad es superior en las mujeres de países con nivel socioeconómico alto, pero el riesgo de morir por ella es mayor entre las mujeres que habitan países pobres, debido a un menor acceso a los servicios



de salud para el diagnóstico temprano, tratamiento y control (Consenso Mexicano, 2015).

Un programa de detección y control efectivo del CaMa, implica un modelo de atención que asegure el diagnóstico temprano y adecuado de todas las mujeres con síntomas clínicos o imágenes anormales en la mastografía (Consenso Mexicano, 2015).

En cuanto a la magnitud actual del CaMa en México, a partir de 2006 éste ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino. El grupo de edad más afectado se encuentra entre los 40 y los 59 años de edad. La mortalidad por cáncer mamario se ha incrementado 10.9% en los últimos años (de 13.06 en 1990 a 14.49 en el año 2000) (Secretaria de Salud, 2003).

1.2 Síntomas

Aunque el CaMa es usualmente no doloroso en sus estados tempranos, pero hay algunos signos que podrían ser indicativos de CaMa; algunos de ellos podrían ser signos de un abultamiento no canceroso (KID, 2012).

Los signos y los síntomas que se deben analizar con el médico incluyen:

- Un cambio de tamaño o forma en la mama.
- Sentir un abultamiento en una mama o axial.
- Un hoyuelo o hundimiento en el pezón o en cualquier parte de la mama.
- Piel roja o irritada en las mamas que no sanan.



- Fluido claro o sangriento saliendo del pezón.

1.3 Abordaje diagnóstico

El CaMa en etapas iniciales se presenta de manera sub-clínica en la mayoría de los casos; es decir, que solamente es detectable por estudios de imagen (mastografía, ultrasonido y resonancia magnética) y en menor proporción por clínica (tumores palpables). Sin embargo, otra forma de presentación común es como un tumor no doloroso que hasta en 30% se asocia a adenopatías axilares. El 70% de los diagnósticos de tumores en nuestro país, ocurren generalmente en estadios avanzados de la enfermedad y pueden incluir cambios cutáneos como edema, ulceración, cutánides, así como afectación de ganglios como los supra e infraclaviculares homolaterales (Berg et al., 2004; Gutiérrez et al., 2011).

Es de suma importancia tener en cuenta dentro del abordaje diagnóstico, los factores de riesgo del paciente, sus condiciones generales y antecedentes heredo-familiares.

1.3.1 Estudios de imagen

La mastografía es hasta ahora el mejor método de detección, con una sensibilidad diagnóstica del 80 al 95%, aunque entre el 10 y el 15% de los tumores pueden estar ocultos sobre todo debido a la densidad mamaria (con el uso de mastografía digital mejora la sensibilidad diagnóstica en este grupo de pacientes). El ultrasonido es en algunos casos una herramienta complementaria



para diferenciar masas quísticas y sólidas, para caracterizar lesiones benignas y malignas y como guía para la realización de biopsias de lesiones no palpables.

La imagen por resonancia magnética (IRM) con gadolinio tiene una sensibilidad diagnóstica del 94 al 100%, pero baja especificidad (37 al 97%) y valor predictivo positivo del 44 a 96%.

Las indicaciones actuales de este estudio son: a) como estudio de detección en mujeres con alto riesgo (como aquellas portadoras de mutaciones *BRCA 1* y *BRCA 2*, b) búsqueda de tumores ocultos mamarios de presentación axilar, c) mujeres portadoras de implantes o prótesis mamarias, d) evaluación de la respuesta al tratamiento sistémico neoadyuvante, y e) evaluación complementaria para determinar multicentricidad y bilateralidad (Agarwai et al., 2003; AJCC., 2009; Pediconi et al., 2010).

1.3.2 Biopsia

El fundamento del diagnóstico del CaMa es la confirmación histológica del mismo. Para ello se prefiere la realización de biopsias de mínima invasión, con la obtención de material tisular que permita determinar factores pronósticos y predictivos de suma importancia en el manejo integral de las pacientes, por ejemplo, la determinación de receptores hormonales y de Her2/neu. El procedimiento de elección es la toma de biopsias con aguja de corte (trucut) tanto en lesiones palpables como en las no palpables. Esta forma diagnóstica

se asocia con una exactitud del 98.5%. En lesiones no palpables, la biopsia debe ser realizada bajo la guía de algún método de imagen (ultrasonido, mastografía, resonancia, etc.) (Pérez et al., 2008).

En la actualidad, la biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) generalmente está reservada para la confirmación de metástasis en adenopatías loco-regionales y tiene poca utilidad como método diagnóstico en la lesión primaria (Consenso Mexicano, 2015).

1.4 Estadificación

La estadificación del CaMa proporciona información respecto al pronóstico y orienta el tratamiento. Los estudios de imagen en la actualidad son un complemento para evaluar el tamaño del tumor, la presencia de los ganglios y las metástasis (ver tabla 1) (Sorlie et al., 2001).

Tabla 1. Sistema de estadificación por TNM.

Tumor primario (T)	
TX	No es posible evaluar un tumor primario
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ (CIS; células anormales están presentes pero no se han diseminado a los tejidos cercanos. Aunque no es cáncer, el CIS puede convertirse en cáncer y algunas veces se llama cáncer preinvasor)
T1, T2, T3, T4	Tamaño o extensión del tumor primario
Ganglios linfáticos regionales (N)	
NX	No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe complicación de ganglios linfáticos
N1, N2, N3	Grado de complicación de los ganglios linfáticos regionales (número y localización de los ganglios linfáticos)
Metástasis distante (M)	



MX	No es posible evaluar una metástasis distante
M0	No hay metástasis distante
M1	Presencia de metástasis distante

1.5 Evaluación patológica

La evaluación patológica del CaMa debe incluir de manera indispensable el tipo histológico, grado, permeación vascular y linfática, tamaño del tumor, márgenes, número de ganglios y tamaño de la metástasis ganglionar, estudios de inmunohistoquímica que evalúen la presencia o no de receptores hormonales para estrógenos y progesterona, Ki67 (antígeno de proliferación), la sobreexpresión del gen *ERBB2* (Her2/neu) y su amplificación por, además de estudios complementarios como citoqueratinas y factores de crecimiento epidérmico, entre otros (Slodkowska et al., 2009).

Cada vez es más importante la clasificación molecular del CaMa, por su repercusión pronóstica y predictiva (Albain et al., 2009), pudiendo ser evaluados mediante estudios de microarreglos y RT-PCR como los que emplean las pruebas referidas como Mamaprint® 70 genes (Fisher et al., 2002) y Oncotype® 21 genes (Veronesi et al., 2002).

1.6 Tratamiento

El tratamiento integral del CaMa es multidisciplinario, los manejos loco-regionales son cirugía y radioterapia en cualquiera de sus tres modalidades (neoadyuvante, adyuvante y paliativa), en tanto que el tratamiento sistémico



incluye la quimioterapia, la terapia endocrina y la terapia dirigida a blancos moleculares (GAMO, 2007).

Cirugía

El tratamiento quirúrgico del tumor primario en el CaMa ha pasado por múltiples modificaciones. En la actualidad se divide en cirugía conservadora y mastectomía, con sus múltiples variedades. El objetivo es lograr el mejor control oncológico, para esto deben tenerse en consideración factores propios del paciente (edad, género, comorbilidades, relación mama-tumor, antecedentes de radioterapia), o factores biológicos del tumor (componente intraductal extenso >25%, multicentricidad y tamaño tumoral), así como factores externos como por ejemplo, la disponibilidad de equipos de radioterapia (Veronesi et al., 2001). Las indicaciones para mastectomía incluyen: 1) contraindicación para recibir radioterapia; 2) enfermedad multicéntrica y 3) dificultad para obtener márgenes adecuados y resultado cosmético favorable después de un intento de cirugía conservadora (Veronesi et al., 2002).

Existen varios tipos de mastectomía. La total, extirpa la totalidad del tejido mamario, incluyendo el complejo areola-pezón (CAP). En la mastectomía total preservadora de piel, se realiza una incisión circundante a la areola y se remueve solo el CAP. La ventaja de esta modalidad es favorecer los resultados cosméticos de la reconstrucción inmediata. Además, es posible en casos adecuadamente seleccionados, la preservación del CAP con mínimo riesgo de recurrencia local en la piel preservada.



La mastectomía radical modificada es un procedimiento realizado en nuestro país debido a los estadios localmente avanzados en los que se realiza el diagnóstico en las pacientes e incluye la resección de la totalidad del tejido y piel mamaria, así como la disección de los niveles ganglionares I y II, y procedimientos más extensos, como la mastectomía Halsted, están reservados solo en casos seleccionados (Cutuli et al., 2009).

1.6.1 Tratamiento adyuvante.

Es el tratamiento adicional para el cáncer que se administra después del tratamiento primario para disminuir el riesgo de que el cáncer vuelva. La terapia adyuvante puede incluir quimioterapia, radioterapia, terapia con hormonas, terapia dirigida o terapia biológica (NIH, 2014).

Quimioterapia

El objetivo de la quimioterapia adyuvante es eliminar la enfermedad micrometastásica antes del desarrollo de clonas resistentes, pues se ha demostrado que la recurrencia sistémica es la principal causa de muerte en estas pacientes (Luini et al., 2009; Lancet. et al., 2005).

La quimioterapia basada en antraciclinas disminuye 33% las recaídas y 27% la mortalidad en mujeres menores de 50 años. A 15 años de seguimiento, la mortalidad en números absolutos disminuyó 7% (78% vs 71%) en pacientes con ganglios negativos y 11% (53 vs 42%) en pacientes con ganglios positivos. En mujeres de 50 a 69 años de edad, el beneficio fue de 2% (69 vs 67%) en



ganglios negativos y 3% (49 vs 46%) en ganglios positivos (Dahabreh et al., 2008). El beneficio de la quimioterapia es independiente del estado ganglionar, menopáusico, expresión de los receptores hormonales u otras terapias adyuvantes.

Terapias biológicas

Aproximadamente 15 a 25% de los cánceres de mama tendrá sobre-expresión del gen HER2/neu (*ERBB2*). El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido en contra de la proteína HER2. Diversos estudios han evaluado el beneficio de trastuzumab concomitante o secuencial con quimioterapia de forma adyuvante, los resultados combinados demuestran disminución relativa del riesgo de recurrencia o muerte por cualquier causa, de 38% (Veronesi et al., 1998).

Terapia Endocrina

El tumor entre el 50 y el 70% de las pacientes con CaMa, será hormonosensible por lo que se podrán beneficiar de una de las modalidades de manejo que se describen abajo. No obstante, la decisión dependerá de las condiciones de la paciente, comorbilidades, biología tumoral y perfil de seguridad de cada tratamiento. Con cualquiera de estas modalidades terapéuticas (tamoxifeno, inhibidores de aromatasa, ablación ovárica y radioterapia) siguientes, no está recomendada la quimioterapia concomitante, aunque en la actualidad se



pueden combinar con terapia biológica (anticuerpos monoclonales contra HER-2) (Lancet et al., 2005).

Tamoxifeno

En el terreno adyuvante, la administración de tamoxifeno durante cinco años ha demostrado una disminución en el riesgo a recurrencia del 40% y en riesgo de muerte del 35%, así como reducción en el desarrollo de otro CaMa, lo que se traduce en un beneficio absoluto a 15 años de 12% y de muerte de 9%. Los beneficios de tamoxifeno son similares en mujeres premenopáusicas que en posmenopáusicas.

Es importante considerar que el uso de tamoxifeno está relacionado con eventos adversos mayores, tales como cáncer endometrial en 1% y enfermedad tromboembólica en 2% (Goldhrisch et al., 2009).

Inhibidores de aromatasa

Estos fármacos representan otra opción terapéutica en el tratamiento adyuvante exclusivo de mujeres posmenopáusicas, administrados de forma inicial o secuencial, han demostrado mejorar la supervivencia libre de enfermedad, no así la supervivencia global (Lancet et al., 1998). La decisión del tipo de inhibidor se relaciona con el perfil de toxicidad y características de riesgo en cada paciente. La duración óptima recomendada es de cinco años. El beneficio absoluto es de 3% de disminución de la recurrencia (Goldhrisch et al., 2009).



Los mayores efectos secundarios de estos fármacos son osteoporosis y fracturas secundarias, aunque dichos efectos son reversibles al suspender el tratamiento y se pueden disminuir con el uso de bisfosfonatos; por lo anterior es muy importante la vigilancia de la densidad mineral ósea (Lancet et al., 2005).

Ablación o supresión ovárica

En mujeres pre-menopáusicas, la ablación ovárica se ha asociado con disminución en recaída y en mortalidad, y los beneficios son similares en magnitud a los obtenidos con quimioterapia en pacientes con receptores hormonales positivos. La ablación o la supresión ovárica pueden conseguirse con irradiación, cirugía o agonistas de la hormona liberadora-gonadotropina (GnRH) o antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH). (Riemsma et al., 2010; Oncoguía. et al., 1995; Bartelink et al., 2000; Ellis et al., 2001). Esta opción de tratamiento se recomienda para pacientes que rechazan o que tienen alguna contraindicación para la quimioterapia o para tamoxifeno. Los efectos secundarios de esta opción son los propios de la ablación/supresión ovárica, es decir, síntomas menopáusicos. (GAMO., 2007; Slamon et al., 2001; Geyer et al., 2006).

Radioterapia

El tratamiento con radioterapia está indicado en todos los pacientes que hayan sido sometidos a cirugía conservadora. El boost o sobreimpresión se considera estándar, y se administra usando electrones. La irradiación parcial de la mama



es una modalidad empleada en tumores pequeños como parte integral del tratamiento conservador, pudiendo administrarse en forma de: 1) braquiterapia intersticial con implante de tasa alta, 2) braquiterapia intracavitaria (catéter o balón), 3) radioterapia intraoperatoria (orto-voltaje) y 4) radioterapia externa conformacional (Miller et al., 2007; Mauri et al., 2009; Crump et al., 1997; Klinj et al., 2001; Mouridsen et al., 2009).

1.7 Factores de riesgo y protectores

El incremento de la edad es el factor de riesgo más importante para CaMa;

otros factores de riesgo para cáncer de mama incluyen los siguientes:

- Historia familiar
- Susceptibilidad hereditaria
- Mutación germinal de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, y otros genes susceptibles para CaMa.
- Excesiva ingesta de alcohol.
- Densidad del tejido mamario
- Estrógenos (endógenos)
 - Historia menstrual (temprana menarquía y tardía menopausia)
 - Nuliparidad
 - Edad avanzada del primer parto.
- Terapia Hormonal



- Combinación de estrógenos más progesterona en terapia hormonal de reemplazo.

- Obesidad.
- Historia personal de CaMa.
- Historia personal de formas proliferativas de inicio de cáncer.
- Origen poblacional.
- Exposición a la radiación en mama y pecho.

De todas las mujeres con CaMa, del 5% al 10% pueden tener una mutación germinal de los genes *BRCA1* y *BRCA2* (KID. et al., 2012). Mutaciones específicas de *BRCA1* Y *BRCA2* son más comunes en mujeres de ascendencia judía (Agarwai et al., 2003). El riesgo estimado de desarrollo de CaMa para la mujer con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* es de 40% a 85 % (KID. et al., 2012).

Factores protectores para reducir el riesgo de CaMa, incluyen:

- Uso de estrógenos (después de la histerectomía)
- Ejercicio.
- Embarazo temprano
- Moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs).
- Inhibidores o inactivadores de aromatasas.
- Mastectomía



- Ablación ovárica.

1.8 Clasificación del Cáncer de mama.

Tradicionalmente, el CaMa se ha clasificado a través el grado histológico que presenta la muestra. Los primeros intentos para su clasificación fueron realizados por Greenough en 1925, seguido por Patey y Scarff en 1928, Haagensen en 1933 y Bloom y Richardson en 1957. Sin embargo, ha existido una gran variabilidad inter-observador y una baja reproducibilidad con respecto a la clasificación del tumor (Marilyn et al., 2015).

El consenso general es que tipos diferenciables de tumores, están asociados con distintas características biológicas y de comportamiento (agresividad). Asimismo, los criterios de clasificación y diagnóstico para cada tipo de tumor han variado a través de los años (Marilyn et al., 2015). Por lo que es difícil basarse en este tipo de clasificaciones.

1.8.1 Perfiles de expresión génica.

En el 2000, Perou et al, describieron por primera vez un sistema de clasificación molecular del CaMa, identificando 4 grandes subtipos con base a la expresión de proteínas de superficie: receptores hormonales (Rh)-positivo/Luminal, basal, ERB2-positivo (HER2-enriquecido) y similar normal.

Estudios posteriores redefinieron la clasificación intrínseca molecular, resultando una subdivisión del tipo Luminal en los tipos A y B. El cáncer del Luminal A tiene un bajo grado morfológico y son predominantes receptores de



estrógeno (RE) y receptores de progesterona (RP) positivos. Mientras que en el cáncer Luminal B, son también predominantes los RE positivos, pero frecuentemente tiene un alto grado morfológico, y puede en algunas ocasiones expresar bajos niveles de receptores hormonales (RE y RP) (Sørlie et al., 2001).

La amplificación y la sobre-expresión del gen *ERBB2*, junto con otros diversos genes del amplicón cercano a *ERBB2*, caracteriza a los cánceres enriquecidos con HER-2 y la mayoría (pero no todos) de los tumores del tipo basal que corresponden a RE-, RP- y HER-2 -. El subtipo similar normal no ha sido definido reproduciblemente y se piensa que puede ser un artificio o ser un mosaico de células tumorales de bajo grado no detectable por las técnicas tradicionales (Wu et al., 2014).

Aunque la clasificación ha ganado aceptación, la metodología usada para análisis de expresión de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) en tejidos frescos congelados, ha dificultado su introducción a la práctica clínica, debido a la complejidad de equipos y el personal especializado que se requiere (ver tabla 2) (Bastien et al., 2012).

Los populares predictores multigenes para CaMa utilizan plataformas que incluyen inmunohistoquímica (IHQ), hibridación fluorescente *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa acopladas a transcripción reversa (RT-PCR) y más recientemente, tecnología de microarreglos (Sinn et al., 2013).

Tabla 2. Clasificación del cáncer de mama que incorpora perfiles.

	Luminal A	Luminal B	Her2-positivo	Triple Negativo
Grado Histológico	Bajo- Intermedio	Intermedio- Alto	Alto	Alto
Carcinoma de mama (%)	40	20	20-30	15
Marcadores de expresión (más comunes)	ER (+) PR > 20% HER2(-) Ki67 <14%	ER (+) PR < 20% (+/-) HER2 (+/-) Ki67 > 14% (alto)	ER(-) PR(-) HER2 (+) Ki67 > 14% (alto)	ER(-) PR(-) HER2(-) Ki67 > 14% (alto)
Mutaciones en el ADN	PIK3CA (49%)	TP 53 (32%) PIK3CA (32%)	TP53 (75%) PIK3CA (42%)	TP53 (84%) BRCA 1 (ALTO)
Entorno Inmunológico (tumor infiltrante a linfa)	Bajo	Bajo	Alto	Alto
Comportamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo más común • Respuesta hormonal • Asociado a incremento de EDAD 	<ul style="list-style-type: none"> • Peor pronóstico al Luminal A 	<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo agresivo • Riesgo a menores edades (< 40 años) 	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente agresivo • Riesgo a menores edades (< 40 años)

1.8.2 Bases moleculares del diagnóstico.

Existen múltiples metodologías para determinar perfiles de expresión génica, siendo la utilización de microarreglos de expresión la de mayor difusión actualmente en países de primer mundo. Este procedimiento se basa en la hibridación de moléculas de ADN complementario (ADNc), preparadas a partir de ARN aislado del tejido tumoral, a sondas de exones génicas impresas en un orden predeterminado, en un soporte sólido (láminas de vidrio o membranas de nitrocelulosa). Con la finalidad de reconocer qué genes se están expresando en mayor o menor medida en el tumor (Quackenbush et al., 2006).

La contribución fundamental de los microarreglos de ADNc al estudio del CaMa ha sido develar la complejidad biológica de los tipos histológicos tradicionales,



apoyando la hipótesis que plantea que el cáncer mamario no es una simple enfermedad derivada de un único progenitor.

El perfil de expresión génica global ayuda a identificar genes con potencial para ser usado como una firma molecular en guías de terapias, pronóstico y de predicción de respuesta a tratamientos para cada pacientes.

1.9 Variación en el número de copias

Uno de los hallazgos más importantes del Proyecto Genoma Humano fue el reconocimiento de la abundancia de variación genómica en la forma de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés, single nucleotide polymorphisms) como una fuente de variación genética, sosteniendo la hipótesis que la variabilidad fenotípica en las poblaciones humanas se debía a esta clase de polimorfismos. Esto ha incentivado la investigación y el desarrollo de técnicas para encontrar, cartografiar y asociar SNP a variaciones fenotípicas y a la explicación de estados patológicos. En efecto se ha encontrado relación entre las variantes de SNP en ciertos genes, con la susceptibilidad individual a enfermedades comunes como por ejemplo diabetes, cáncer, asma, enfermedad de Crohn y degeneración macular (Henrichsen et al., 2009; Van Binsbergen et al., 2011; Theisen et al., 2010; HeY et al., 2011). Sin embargo en los últimos años se ha reconocido el papel crítico de variaciones genéticas estructurales en la modulación génica, expresión del fenotipo y susceptibilidad a enfermedades. En los autosomas existe una copia de ADN en cada cromosoma provenientes de cada uno de los progenitores, sin



embargo el proyecto genoma humano ha develado que muchas regiones génicas contienen variación en el número de copias de la secuencia en cada locus, así por ejemplo un alelo puede contener de 0 a 13 copias de la secuencia génica en el mismo cromosoma (Shlien et al., 2008).

Las variaciones en el número de copias (CNV) se definen como: el número de copias (ganadas o perdidas) de un segmento genómico en un locus determinado del genoma de un individuo respecto a un genoma de referencia (Kwei et al., 2010). Diferentes números de copias que varían de un individuo a otro dentro de una misma familia o población y entre poblaciones, lleva a explicar la diversidad y complejidad del genoma aun dentro de la especie (Henrichsen et al., 2009; Theisen et al., 2010; Mu XJ et al., 2011).

Las CNV se han asociado no solo a cambios que sustentan la variabilidad genómica entre etnias, sino que también se ha encontrado relación con la expresión fenotípica y la susceptibilidad a enfermedades asociadas a genes susceptibles a variación de dosis, como: síndrome DiGeorge, síndrome Smith-Magenis, síndrome Potocki-Lupski, Síndrome de Williams-Beuren, neuropatía y Charcot-Marie Tooth tipo 1A son causadas exclusivamente por cambios en CNV en loci críticos (HeY. et al., 2011; Mu XJ. et al., 2011; Sobreira et al., 2011; Henrichsen et al., 2009).

Recientemente también se han asociado a enfermedades poligénicas y multifactoriales como la esquizofrenia, autismo, retraso mental, epilepsia, susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, y a las enfermedades comunes



como la diabetes tipo 1 y 2, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y cerebro-vasculares (HeY et al., 2011; Mills et al., 2011).

Los efectos fenotípicos de diferencias en el genoma tanto a pequeña escala, como en el caso de los SNP y a gran escala, como CNV, se han asociado con cambios en la expresión génica: cambios en los niveles de expresión, ya sea afectando a la secuencia codificante, o a regiones de control de la actividad génica. Por lo tanto, el análisis del transcriptoma y los estudios de expresión de genes aislados son enfoques adecuados para comprender las consecuencias de los CNV en el fenotipo.

La forma como las CNV afectan el genoma tiene que ver con la dosis génica y las interacciones entre genes. La transcripción y traducción de un solo gen expresará determinados niveles de una proteína, pero la existencia de dos o más copias de éste en el genoma, teóricamente elevaría los niveles o la velocidad de formación de la proteína. Aún si existe un sistema de regulación que inhiba la expresión del gen, este debería actuar sobre varias copias, por lo cual los niveles de expresión génica se verán afectados. La presencia de una CNV en otra región del genoma podría tener un contexto diferente de cromatina, por lo que puede ser suprimida o inactivada. La interacción génica también se debe considerar al existir CNV ya que las copias de una región pueden favorecer la expresión génica o suprimirla (Qiao et al., 2013; SL et al., 2013).



Las interacciones epigenéticas de las CNV pueden verse en la duplicación o delección de regiones que codifiquen para miARNs los cuales tienen funciones de regulación en la transcripción y traducción génica, por lo cual los niveles alterados influirán directamente en la expresión génica y fenotipo (Zhang et al., 2009).

Otro efecto de las CNV es que puede provocar disrupción génica, ya que se trata de una variación de miles de pares de bases que pueden intercalarse en una secuencia codificante. Pueden actuar aumentando la expresión génica, que si bien no tienen efectos críticos en el desarrollo embrionario, ayuda a la interacción génica que potenciaría o disminuiría características del fenotipo como receptores olfatorios o gustativos, receptores inmunológicos, genes de respuesta inmunológica e inflamatoria, proteínas de señalización celular, moléculas de adhesión, proteínas estructurales, canales iónicos (MuX et al., 2011).

Diversos estudios han comparado el impacto de SNP y CNV en la expresión génica y se ha notado que aproximadamente el 18% de la variación en la expresividad génica es atribuible a CNV mayores a 40 kb. En el 53% de los genes influenciados por CNV, la correspondiente CNV se encuentra en regiones adyacentes al gen, sugiriendo que las CNV pueden afectar las secuencias reguladoras aún situados a distancia del gen blanco, por consiguiente, la influencia de una CNV podría ser mayor a la atribuida a un SNP (Shlien et al., 2008).



Se han realizado estudios en familias que sustentan tanto la heredabilidad de las CNV, como la aparición de CNV *de novo*, cuyo mecanismo puede deberse a recombinación no alélica, la importancia de estas nuevas CNV pueden ayudar a comprender las enfermedades complejas (Kwei et al., 2010).

Las CNV fueron también asociadas con predisposición a cáncer. De forma importante, las mutaciones *de novo de* CNV tienen una tasa por locus por generación de 100-10,000 veces más que las mutaciones puntuales, por lo que, son particularmente relevantes para la tumorigénesis (Shlien, et al., 2008).

Las aberraciones/alteraciones en el número de copias somáticas (CNA) se distinguen de las CNV, debido a que pertenecen a una subclase de CNV que son encontradas en ADN tumoral que reflejan las inestabilidades genómicas adquiridas durante la tumorigénesis. Las CNA identificadas en oncogenes y genes supresores de tumor son “rasgos” en genes desregulados relacionados a cáncer y por tanto, se piensa que están parcialmente relacionados con la tumorigénesis (Rojas et al., 2011).

1.9.1 Posibles mecanismos de formación de CNV

Las frecuencias de mutación en loci específicos para CNV y para otras variaciones estructurales, son de dos a cuatro órdenes de magnitud más frecuentes que las mutaciones que dan origen a los SNP (Shlien et al., 2009).

Las CNV se originan por mecanismos de recombinación y de reparación de rupturas en la doble cadena del ADN o por defectos durante la replicación del

ADN. En el caso de la recombinación, se ha identificado la participación de repeticiones de pocas copias, también llamados segmentos duplicados. Estos segmentos ocurren muy pocas veces en el genoma, tienen fragmentos que oscilan entre 1 a 5 kb y tienen una homología, superior a 95%. Pueden ocurrir eventos en que dos regiones cromosómicas que presentan dos segmentos flanqueados por repeticiones de pocas copias se alineen de forma errónea y participen en un proceso de recombinación homóloga desigual, precisamente facilitada por el apareamiento de estas estructuras altamente similares, como se ilustra (ver figura 1). Este fenómeno se denomina recombinación homóloga no alélica (NAHR, por sus siglas en inglés) y genera un cromosoma con una duplicación flanqueada por dos LCR. Este mecanismo también puede ocurrir si en lugar de LCR, las secuencias están flanqueadas por trasposones del tipo Alu, LINE o retrotrasposones (Shlien et al., 2009).

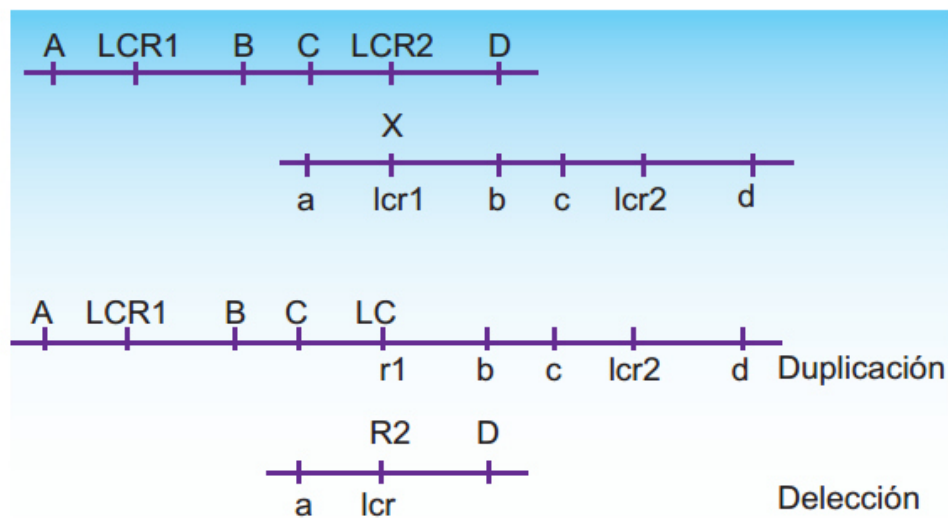


Figura 1. Mecanismo de la recombinación homóloga no alélica.



Las CNV que se forman por la reparación de rupturas en la doble cadena del ADN ocurren con menor frecuencia. Estas se encuentran flanqueadas por sitios de homología muy limitada que van de 2 a 15 pb. Estos segmentos son tan cortos que evidencian que la CNV no se originó por NAHR. En cambio, es probable que estas CNV se formen durante la reparación de dos hebras rotas de ADN de doble cadena (DSB, por sus siglas en inglés, double strand break). Esta reparación no involucra sitios homólogos para recombinación y puede realizarse de dos maneras: mediante la unión de terminaciones no homólogas (NHEJ, por sus siglas en inglés, non-homologous end joining), que requiere poca o ninguna homología para que las hebras rotas se unan y reparen (Yang et al., 2010). Las NHEJ permiten la unión de hebras de ADN en forma exacta, pero algunas veces pueden originar pérdidas o ganancias de 1 a 4 pb, que al ser reunidas y reparadas, generan un extremo flanqueante pequeño y repetido. Sin embargo, si ocurre un evento simultáneo de varias DSB, la reparación puede acarrear inserciones de ADN de otro cromosoma o de trasposones en la hebra original (Shlien et al., 2009).

La otra vía de reparación no homóloga de DSB se denomina unión de terminaciones mediada por microhomología (MMEJ, por sus siglas en inglés, microhomology-mediated end joining). La MMEJ utiliza secuencias homólogas cortas de 5 a 25 pb para alinear las DSB rotas. Por el corto tamaño de las secuencias homólogas, es probable que la reparación conduzca al apareamiento de regiones muy diferentes, entre distintos cromosomas o con

secuencias externas. En general, las CNV creadas por la reparación de DSB presentan secuencias cortas insertadas en los sitios de unión de la CNV con mezclas de duplicaciones, triplicaciones, inversiones y deleciones y con secuencias interespaciadas de ADN dentro de la CNV (Shlien, et al., 2009).

Se ha sugerido un mecanismo adicional para la generación de CNV denominado replicación inducida por rupturas y mediada por micro-homologías (MMBIR, en inglés, microhomology-mediated break-induced replication) (Yang et al., 2010). Se trata de la formación de CNV no recurrentes y complicadas, en los que se observan duplicaciones discontinuas mezcladas con deleciones, inversiones, duplicaciones y triplicaciones. Los extremos de estas CNV muestran regiones de micro-homología de 2 a 5 pares de base (pb) y ocurren cerca de repeticiones de pocas copias preexistentes. El mecanismo de formación (ver figura 2), es complicado y se sabe por estudios en otros organismos, que ocurre cuando está procediendo la replicación del ADN bajo condiciones de estrés. El evento desencadenante es una ruptura de una sola cadena del ADN que será replicada (Shlien et al., 2009).

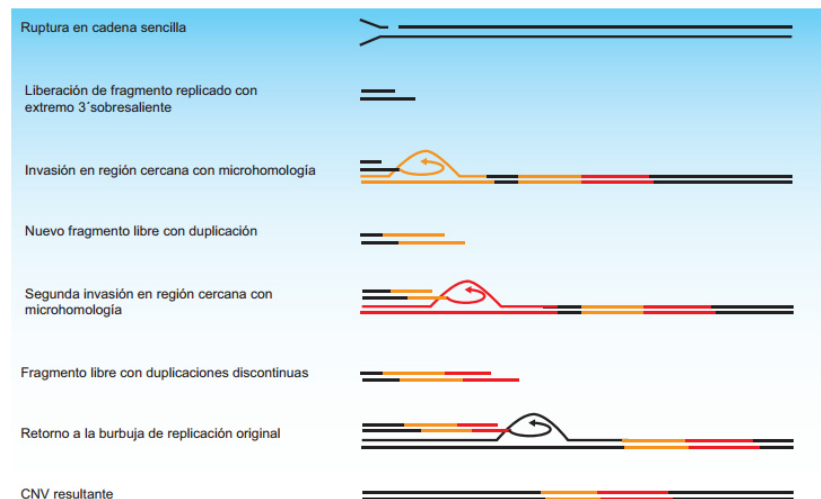


Figura 2. Formación de una CNV por el mecanismo de MMBIR.



A continuación, la horquilla de replicación avanza hasta el sitio de ruptura y la síntesis de ADN se colapsa, liberando un fragmento replicado con un pequeño extremo 3' sobresaliente. Esta estructura flotante invade una región cromosómica vecina que muestra pequeña homología con el extremo 3' del fragmento, abriendo la doble hebra e induciendo la polimerización de un nuevo templado que abarca casi la totalidad del molde abierto en la burbuja. Cuando se llega al límite, el fragmento nuevamente se libera y está disponible para invadir otra región con micro-homología, repitiéndose todo el proceso previo (Stacey et al., 2014). El fragmento replicado y liberado de manera anormal retoma su molde original y se completa la replicación. Las CNV de línea germinal recurrentes ocurren como resultado de la NAHR en meiosis en secuencias que predisponen a este mecanismo; constituidas por secuencias únicas de ADN de 50 kb a 10 Mb, flanqueadas por bloques de secuencias repetitivas de 10 kb con un 95% de identidad entre ellas (son secuencias ricas en repeticiones en tándem de cuadrupletes de guanina). Algunos ejemplos de enfermedades asociadas con CNV constitutivas recurrentes son, la enfermedad de Charcot–Marie–Tooth type IA causada por una duplicación en el locus 17p12 y el síndrome de Williams–Beurens, asociado a deleciones en 7q11 (Shlien et al., 2009). Es por este mecanismo que dos personas sin relación presentan el mismo desorden con puntos de ruptura y variación similares. Los CNV no recurrentes son causados por errores durante la duplicación y se disponen a lo largo del genoma, pero los loci afectados no siempre son consistentes con un



cuadro clínico o característica fenotípica determinada (Qiao et al., 2013; Gersen et al., 2013).

Los reacomodos cromosómicos, son causados por múltiples eventos que incluyen factores externos, como el estrés celular y la reparación o recombinación incorrecta del ADN. Las duplicaciones de segmentos en las regiones sub-teloméricas son particularmente frecuentes, lo cual facilita la NAHR y son considerados puntos calientes para reacomodos cromosómicos recurrentes, tanto constitutivos como somáticos (Stratton et al., 2008).

Rojas et al., en 2011 analizaron 251 casos de portadores de reacomodos cromosómicos equilibrados, encontrando puntos de ruptura comunes en los cromosomas independientes de su tamaño. Estos sitios podrían contener secuencias que contengan baja cantidad de secuencias repetitivas, lo que favorecería la recombinación por los mecanismos mencionados. Se plantea la hipótesis que estos puntos en el cromosoma son sitios frágiles, candidatos a ser puntos de ruptura, que favorecerían a la formación de reacomodos cromosómicos. Los cromosomas más frecuentemente involucrados en reacomodos cromosómicos son 2, 3, 9 seguidos por 1, 4, 5, 10 y 14, y los más raramente involucrados los cromosomas 13, 17, 19, 22 y X (Shlien et al., 2009).



1.9.2 CNA y la susceptibilidad a CaMa.

El CaMa es el cáncer más común en la mujer, causado por factores genéticos y ambientales, con aproximadamente el 10 % del CaMa siendo de origen familiar (Mu et al., 2011).

Se ha demostrado que la pérdida de funciones en línea germinal por mutaciones en genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2*, *NBN*, *RAD50*, *BRIP1*, *PALB2* y *RAD51C*, puede incrementar al menos dos veces el riesgo a CaMa (Naylor. et al., 2005; Stratton. et al., 2008).

Interesantemente, mutaciones mono-alélicas en cuatro de esos genes, es decir, en *BRCA2*, *RAD51C*, *BRIP1* y *PALB2*, confieren un riesgo incrementado de CaMa familiar. Más aún, los productos proteicos de estos genes juegan un rol en la reparación por DSB, particularmente en la recombinación homóloga (RH) (Stratton. et al., 2008).

Con la llegada de nuevas tecnologías en los últimos años, la atención fue establecida a la elucidación del impacto de CNA en la susceptibilidad y biología del CaMa, y por tanto, en discriminar entre los CNA existentes de línea germinal del ADN frente a los reacomodos cromosómicos adquiridos somáticamente en el tumor (HeY et al., 2011).



1.9.3 La formación de CNA como parte integral en la biología del CaMa.

Las CNA en el ADN de tumores sólidos son frecuentes y variadas, respecto a la longitud en pares de bases (pb). Las causas subyacentes para este tipo de inestabilidad genética permanecen todavía poco comprendidas. Sin embargo, diversos estudios usando tecnologías basadas en microarreglos para detectar CNA en CaMa, han revelado al menos regiones universalmente afectadas en cromosomas 1, 8 y 16 (Jönsson et al., 2010; Haverty et al., 2008).

Los genes conocidos relacionados a cáncer tales, como *HER2*, *FGFR1*, *CCND1*, *MYC*, *MDM2*, *PIK3CA*, *KRAS* y *CDKN2A*, se encuentran en las regiones de número de copias alteradas (Haverty. et al., 2008; Kwei et al., 2010).

Kwei et al., en 2010 describieron tres diferentes regiones comunes: la primera contiene pocas CNA, principalmente ganancias y pérdidas de brazos completos de cromosomas (mayoritariamente se detectaron ganancias en 1q y 16p y pérdida de 16q), siendo este patrón asociado con la expresión génica del tipo Luminal A.

El segundo patrón exhibió múltiples CNA a nivel focal en diversos cromosomas, bajo la forma de ganancias y pérdidas complejas vinculadas a los subtipos tumorales Luminal B y HER-2. Los sitios aberrantes comúnmente incluidos son 8p12 (*FGFR1*), 8q24 (*MYC*), 11q13 (*CCND1*), 12q15 (*MDM2*) 17q12 (*ERBB2*) y 20q13 (*ZNF217*) (Shlien et al., 2008).



El tercero se caracteriza por numerosas ganancias y pérdidas de corta amplitud. Este tercer patrón se encuentra en los subtipos similar basal y Triple negativo (TN). Por ejemplo, tumores carentes de la expresión de HER-2, RE y RP, se asocian con mutaciones en *P53*. Aunque las aberraciones son complejas, hay una prevalencia de ganancias en 10p y pérdidas en 4p, 4q, 5q, 14q. Por lo que, lo observado correlaciona entre los tipos de aberraciones cromosómicas y los subtipos basados en expresión génica. Esto sugiere que los diferentes tipos de expresión emergen de mecanismos distintos subyacentes a la inestabilidad genómica (Jönsson et al., 2010).

C. Curtis et al., en 2012, describieron 45 regiones de CNA que afectan la expresión que contienen genes conductores conocidos como *PTEN*, *MYC*, *ZNF703*, *CCND1*, *MDM2*, *MDM4*, *ERBB2* y *CCNE1*, que confieren ventajas selectivas a células cancerígenas, por lo tanto, estando causalmente implicadas en oncogénesis.

Las metas actuales de las investigaciones en la identificación de características de los subgrupos de CaMa, podrían representar el talón de Aquiles para el ataque a blancos terapéuticos (Shah et al., 2012).



CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

El desarrollo de cáncer frecuentemente se presenta por la adquisición de aberraciones genéticas somáticas, incluyendo SNP, translocaciones cromosómicas, infecciones (por virus oncogénicos) y CNA.

Recientes avances tecnológicos para el estudio del genoma han permitido sistemáticamente caracterizar esas alteraciones en biopsias de tumor (Stratton et al., 2009). La identificación de esas alteraciones puede proporcionar importantes perspectivas hacia las causas que originan el cáncer y sugerir potenciales estrategias terapéuticas.

Por todo lo anterior, diversos grupos de investigadores se han enfocado en el estudio de las CNV, como un nuevo campo de gran relevancia para el estudio del cáncer.

En 2010, Rameen et al., analizaron 3131 biopsias de cáncer, pertenecientes a 26 tipos histológicos, identificando 158 regiones significativas de CNA focales a través de los múltiples tipos de cánceres. Demostraron que las células cancerígenas portan amplificaciones alrededor de genes anti-apoptóticos, lo que conlleva a una sobre-expresión para la supervivencia.

En 2012, Joseph et al., se enfocaron en estudiar el perfil genómico global de células neoplásicas de adenocarcinoma ductal *in situ*, en pacientes con y sin asociación a adenocarcinoma ductal infiltrante, mediante microarreglos de



hibridación genómica comparativa (aCGH). En éste identificaron ganancias y pérdidas en el número de copias, la cuales se validaron por PCR tiempo real (qPCR), revelando que las firmas de ADN detectadas correlacionan con un potencial invasivo hacia metástasis.

En 2013, para elucidar el rol de las mutaciones somáticas en el cáncer, un grupo de investigadores realizaron un estudio de secuenciación completa del genoma de neoplasias tempranas, comparadas con tejido sano, analizando en total 31 muestras de adenocarcinomas ductales tanto *in situ* como infiltrante en pacientes con CaMa (Daniel et al., 2013). Mediante el uso de mutaciones somáticas como marcadores de linaje, construyeron árboles que relacionaron las muestras de tejido con cada paciente, infiriendo el orden y la tasa de los eventos genómicos, ellos encontraron que neoplasias tempranas y carcinomas comparten mutaciones antecesoras en común como recurrentes aneuploidias, CNA y mutaciones puntuales, sugiriendo que la acumulación de mutaciones somáticas es un resultado de incremento en la división celular, más que mecanismos específicos de mutaciones. Por último, ellos concluyeron que las aneuploidias y la CNA que ocurren en ancestros comunes de células tumorales, son los eventos más tempranos que afectan un gran número de genes y que predisponen al tejido mamario para el desarrollo eventual de carcinoma invasivo.

En 2015, otro grupo de investigadores definieron claramente CNA en tejido mamario sano, y en muestras sin tratamiento de tumores primarios y de



nódulos linfáticos de pacientes con CaMa. Encontraron una distribución estocástica no recurrente de una porción considerable de CNA entre los tejidos comparados, indicando desestabilización genómica. Ellos hipotetizaron que la desestabilización genómica es un evento secundario que puede ser predeterminado por mutaciones en genes que son responsables del mantenimiento genómico. Por otro lado, sus resultados demostraron que las mutaciones en genes que codifican a proteínas con participación directa en el mantenimiento de la integridad genómica, co-ocurren con las CNA en tejidos mamarios sanos. Sin embargo, también demostraron que las CNA, así como también mutaciones puntuales en genes candidatos o conductores a predisposición de cáncer pueden estar presentes en una porción sustancial de células de tejido glandular mamario sano a una distancia anatómicamente distal de la localización del tumor; destacando el potencial neoplásico temporal y espacial del tejido sano mamario en pacientes con cáncer (Arkadiusz et al., 2015).

En 2016, un reporte realizado por Yang et al., acerca de los mecanismos de las CNA en el CaMa, como base crucial para el entendimiento de la etiología como desórdenes genéticos, diseñaron árboles oncogenéticos como una representación gráfica filogenética, para tratar de imitar la ocurrencia de alteraciones genéticas en el CaMa, destacando a genes como *ErbB2*, *AKT2*, *KRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* y *CCND1* con mayor frecuencia en CNA, que se presentan en fases tempranas del CaMa, en 963 casos analizados de tumores.



Capítulo III

JUSTIFICACIÓN

El CaMa representa uno de los principales problemas de salud a nivel nacional (e internacional), que requiere ser estudiado y tratado a fondo debido a su complejidad intrínseca. Por lo tanto, realizar un análisis genómico integral de las CNA en tumores mamarios, puede servir para encontrar biomarcadores útiles para la identificación de genes críticos que están consistentemente amplificados o deletados y que impactan a la biología tumoral, debido a que es importante para comprender la epidemiología de esta enfermedad, los mecanismos de patogénesis subyacentes y por ende, permitir al Sector Salud el diseño de mejores abordajes diagnósticos/predictivos y de tratamiento.

Capítulo IV

HIPÓTESIS

La adquisición de alteraciones genómicas, las cuales incluyen genes importantes de vías o mecanismos de regulación celular (apoptosis, crecimiento, diferenciación, etc.), es un evento crítico para la presencia de cáncer en pacientes mexicanas, y se presentan genes diferentes a los reportados para otras poblaciones.



Capítulo V

OBJETIVO GENERAL

Analizar las alteraciones genómicas focales y amplias en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante mediante aCGH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Crear una base de datos clínicos y patológicos para la estratificación de los diferentes pacientes de acuerdo al subtipo molecular de cáncer.
- 2.- Identificar y caracterizar en las biopsias tumorales de las pacientes reclutadas, las diferentes firmas de CNA a través de aCGH.
- 3.- Realizar un análisis integral de datos clínico-patológicos y de los genes candidatos a partir de las firmas de CNV obtenidas.



Capítulo VI

MATERIALES Y EQUIPOS

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos, perteneciente al departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El proyecto fue financiado por fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con el siguiente número de registro: No. 233212.

Material de consumo

El material plástico utilizado (puntillas desechables con y sin filtro, microtubos y guantes) fueron adquiridos Tips pipetas de Probiotek, microtubos con capacidad hasta .2mL, 1.5mL y 2mL de la marca SSI y guantes de Nitrilo de la marca SprenoSE™. Para la medición de volúmenes exactos se utilizaron micropipetas con capacidad hasta 1000 µl, 200 µl, 20µl, 10 µl y 2.5 µl fueron adquiridas de la marca Eppendorf Research Plus. Por último, se utilizaron Kimwipes de la marca Kimtech Science.

Extracción de ADN.

Se utilizaron columnas de centrifugación de la marca Allprep DNA/RNA Mini Kit. Cat. No. 80204

Microarreglos



Para la digestión y el marcaje se utilizó el kit SureTag DNA Labeling; la hibridación se realizó el kit SurePrint G3 Cancer CGH+SNP, 4x 180K.

Equipos de uso general.

Se empleó una microcentrífuga marca Eppendorf, modelo 5415 C; un vortex thermoline, modelo 16700. También, una balanza digital Core balance de la marca ADAM; un horno de microondas marca LG, modelo MS 701-C; una plancha de calentamiento, marca Thermolyne, modelo SP42965.; minispin, marca Labnet, modelo SN 1411; congelador vertical, -20°C, marca Torrey.

Equipo de Microarreglos

Para realizar la digestión enzimática e incubación se utilizó un termociclador de punto final marca Agilent technologies, modelo Surecyclor 8800; para la cuantificación del material genético se utilizó un NanoDrop 2000 Thermo Scientific modelo 2000c; la integridad del material genético se realizó en la cámara de electroforesis, marca BIO-RAD modelo powerpac basic; la visualización del gel de agarosa se realizó en el fotodocumentador ChemiDoc XLR+, marca Bio-Rad modelo Universal Hood II; la hibridación e incubación se realizó en el horno de Hibridación, marca Shel Lab e incubadora, Thermo Scientific.; el análisis de los datos fue llevado a cabo en la plataforma de microarreglos SureScan , marca Agilent Technologies.



Capítulo VII

Metodología

Tipo de estudio: Prospectivo-observacional.

Población de Estudio: Pacientes mujeres mexicanas con CaMa (previamente confirmado) que asistieron al Hospital Universitario de la UANL “Dr. José E. González” y al Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”.

Tamaño de la muestra: Censal o por conveniencia (todas los pacientes recolectados entre el periodo Octubre 2015- Junio 2016).

Criterios de selección de pacientes:

Inclusión:

- Diagnóstico clínico con el subtipo adenocarcinoma ductal infiltrante
- Con o sin la presencia de comorbilidades (diabetes, hipertensión, etc).
- Mayor o igual a 18 años.
- Firmar carta de consentimiento informado.

Exclusión:

- Tratamiento previo (quimioterapia, radioterapia, entre otros).
- Menores a 18 años.

Eliminación:



- Extravío del material genético (ADN o ARN).
- Degradación del material genético.
- No obtener una concentración suficiente en la extracción.

Aspectos éticos.

Es una investigación con riesgo mínimo, por lo que, la participación de todos los individuos en el presente proyecto fue respaldada con la firma de un consentimiento informado por escrito, previa a la operación quirúrgica y otorgada por el médico tratante. El servicio de oncología-cirugía fue responsable de la toma de muestras de tumores malignos y sangre periférica para los estudios de rutina correspondientes y para los de interés del presente proyecto. A todas las muestras provenientes de los pacientes se les asignó un código, para facilitar el manejo y a su vez, cumplir en el aspecto de confidencialidad. Un beneficio de este proyecto, sería el poder identificar fases de progresión de la enfermedad, así como la detección de clonas tumorales relacionadas con pronósticos desfavorables o favorables. Los investigadores responsables del presente proyecto proporcionaron los resultados del estudio molecular al (los) oncólogo(s) responsable(s) de los pacientes, y se realizó con dicho(s) oncólogo(s) una sesión informativa corta acerca de los resultados encontrados. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas de conducta éticas y el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, y

con la declaración de Helsinki y sus enmiendas, así como los códigos y normas vigentes para las buenas prácticas de la investigación clínica. Se anexa ejemplo de carta de consentimiento informado (ver anexo 1).

Estrategia general

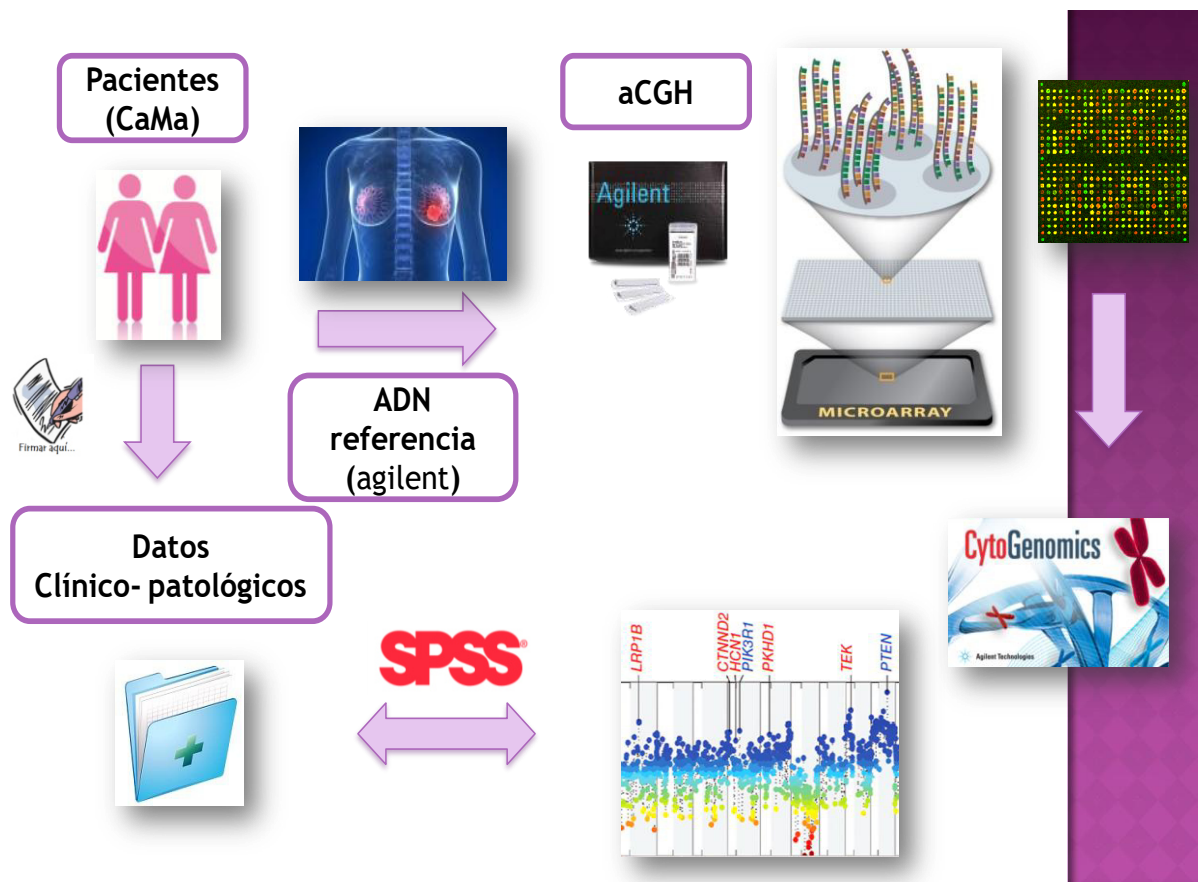


Figura 3. Estrategia experimental. Las pacientes reclutadas (previamente diagnosticadas), firmaron el consentimiento informado y se procedió con la obtención de los datos clínico-patológicos. Se tomó una porción de la región tumoral, a la que se le extrajo ADN y se comparó con un ADN de referencia (agilent). Después se realizó para el primero, el análisis de las alteraciones en el número de copias (CNA), utilizando la plataforma de microarreglos de hibridación genómica comparativa basada en arreglo (aCGH). Posteriormente se recurrió al software bioinformático CytoGenomics para la selección de las alteraciones más significativas presentes en el ADN de las pacientes, pero ausente en el de referencia y con ello, seleccionar a los genes candidatos. Por último se hizo una correlación entre los datos genómicas y clínico-patológicos.

Obtención de las muestras

Con la finalidad de determinar las CNA, se obtuvieron porciones de tejido tumoral en fresco (cubos de 5 x 5x 5 mm) de aquellas pacientes sin tratamiento (ver figura 4). Inmediatamente después de la toma de la biopsia, se colocó en tubos que contenía una sustancia estabilizante y protectora del ARN (RNAlater, en inglés), para preservar los ácidos nucleicos. Una vez colocados en los dichos tubos, se mantuvo en refrigeración a 4°C para potenciar aún más el efecto protector del RNA later, antes de la extracción programada.

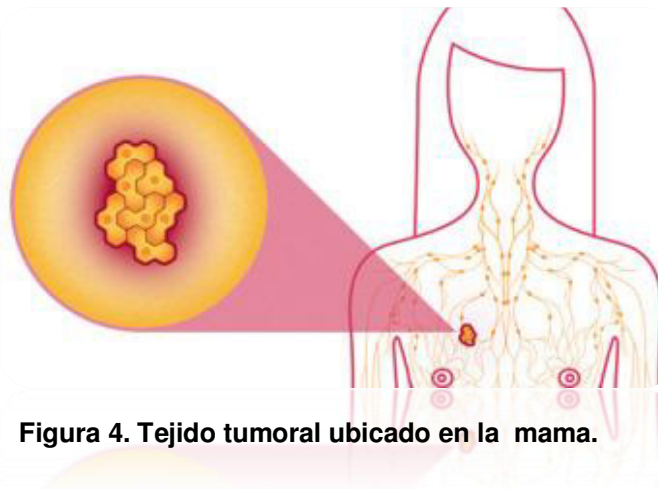


Figura 4. Tejido tumoral ubicado en la mama.

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN, primeramente se tuvo que preparar la muestra. Ya que, como se mencionó anteriormente ésta se encontraba sumergida en RNA later. Dicho compuesto, es un inhibidor para los reactivos utilizados en la extracción del ADN. Por lo que, a la porción de muestra se hizo un lavado con PBS para quitar los restos de RNA later. Después se colocó en un homogenizador vidrio-vidrio que contiene 300 µL de RLT plus (buffer de lisis),



este compuesto es útil para la lisis del tejido tumoral y así poder liberar el ADN deseado. Una vez colocada la muestra en el homogenizador, se procedió de manera física a romper el tejido. Una vez, homogéneo el tejido disgregado en la solución de lisis, se procedió a la extracción mediante el kit Allprep DNA/RNA mini (ver anexo 3).

Cuantificación e integridad del ADN

Después de la extracción del ADN, se procedió a realizar la cuantificación en el NanoDrop 2000, donde se esperaba una concentración mínima de 25 ng/ μ L. Una vez obtenida la concentración, se preparó un gel de agarosa al 1% y se corrió en la cámara de electroforesis (BIO-RAB), para observar la integridad de manera visual respecto a nuestro marcador de peso molecular, visualizándolo al foto-documentador (BIO RAD).

aCGH

Una vez obtenida la concentración mínima de ADN (500 ng) y confirmada su integridad óptima (visualizado a través de un gel de agarosa), se procedió a realizar la aCGH, con sondas específicas de cáncer, para una mejor selección de aquellas regiones/genes candidatos ya que, fue de nuestro interés saber cuáles alteraciones eran aquellas que mayormente estaban amplificadas o deletadas y los genes claves en las cuales repercutían. La forma en cómo se hizo dicha comparación, a continuación se esquematiza (ver figura 5).

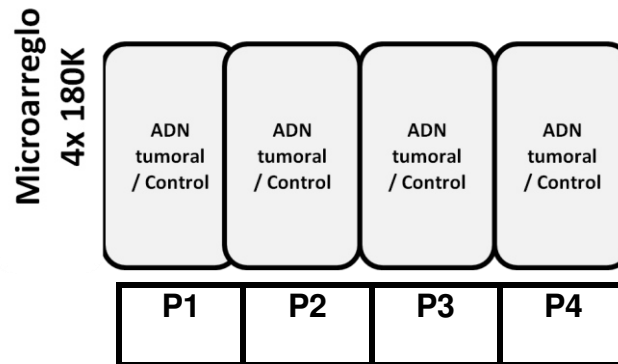


Figura 5. Diagrama de la hibridación de las muestras en el microarreglo. Cada arreglo contiene 180 mil sondas, para analizar 4 pacientes máximo por corrida.

Al ADN de los pacientes, como al del control (referencia Agilent; ver anexo 4), se les realizó una digestión enzimática para generar fragmentos entre 200 y 500 pb. Esto con el afán de facilitar procesos como el marcaje y la hibridación con las sondas de los microarreglos.

Después de la digestión, el paso siguiente fue el marcaje de los ácidos nucleicos (ADN tumoral y control) con los fluorocromos Cy5 y Cy3. Después se hizo la purificación del marcaje para eliminar el exceso de fluorocromos no intercalados en el ADN, posteriormente se hibridó (ver figura 5), y por último se hizo el lavado, para que los fragmentos de ADN no adheridos se eliminaran y no causaran ruido de fondo o bien, que interfirieran con el análisis.

Una vez colocado el chip de microarreglo en la plataforma de análisis para microarreglos (Sure Scan), se procedió a analizarlo. Lo primero que se obtuvo fue una imagen en blanco y negro de toda la laminilla, donde se visualizaron los puntos que corresponden a las sondas. Después se exportó al software



Cytogenomics para la extracción de datos y evaluación de la calidad del microarreglo y a su vez, para el análisis del mismo. Se seleccionaron aquellas alteraciones como amplificaciones que fueran $>.30$ y aquellas deleciones que fueran $< -.60$ (respecto a la relación de Log_2), que tuvieran al menos tres sondas implicadas en la región afectada y aquellas que contuvieran genes mayormente asociados a cáncer. Asimismo, una vez seleccionados los genes alterados de acuerdo al subtipo de cáncer, se utilizó el programa String para la visualización de las interacciones proteína-proteína y el programa Gene Ontology (GO) para obtener los procesos biológicos alterados más significativos (prueba de Bonferroni corregida).

Capítulo VIII

Resultados

8.1 Estratificación de los pacientes de acuerdo al subtipo molecular de cáncer de mama. Durante el periodo comprendido entre Octubre-2015 y Mayo-2016, se lograron recolectar biopsias de tejido tumoral de 21 pacientes procedentes de los hospitales Metropolitano y HU, los cuales fueron seleccionados directamente en fresco, sin la adición de ningún aditivo químico preservante utilizado en la clínica. A continuación se describen las características clínicas correspondientes a los pacientes (ver tabla 3). La mayoría de los pacientes estuvieron en el rango de 46-69 años, seguido de los < 45 años y sólo 1 paciente fue > 70 años. No hubo datos suficientes de la Historia familiar de CaMA, IMC, comorbilidad, consumo de tabaco y alcohol.

Tabla 3. Distribución de los pacientes mediante las características clínicas por subtipo de cáncer.

Características clínicas		Subtipo de cáncer		
		LUMINAL	HER2+	TRIPLE NEGATIVO
Edad (años)	≤45	3	2	1
	46-69	3	3	2
	>70		1	
Historia Familiar de CaMa		1	1	1
IMC (Kg/m ²)	< 25	1		
	25 a 29	1		
	> 29	1		
Comorbilidad			1	
Consumo de tabaco				
Consumo de alcohol		1		

También se tomaron para este estudio los factores de riesgos ginecológicos y obstétricos (ver tabla 4). Destaca la presencia de menarquía ≥ 12 , la edad del primer embarazo < 20 años, número de embarazos ≤ 3 y presencia de menopausia > 9 . Aunque no hubo diferencia significativa entre subtipos.

Tabla 4. Distribución de los factores de riesgos ginecológicos y obstétricos por subtipo de CaMa.

Factores de riesgo Ginecológicos y Obstétricos		Subtipo de cáncer		
		LUMINAL	HER2+	TRIPLE NEGATIVO
Menarquía	< 12		2	
	≥ 12	6	4	3
Anticonceptivos orales	SI	1	1	2
	NO	4	3	
Nuliparidad			1	
Edad del primer embarazo	< 20	4	1	2
	≥ 20	1	1	
Número de embarazos	> 3	2	1	
	≤ 3	2	1	2
Menopausia	SI	5	3	1
	NO	1	3	2

En cuanto a las características patológicas presentes (ver tabla 5), la mayoría de los pacientes obtuvieron un grado histológico entre I y II, estratificación entre IIB y IIIA, estatus de nodo linfático entre 2 y 3. Es importante destacar que los datos no presentan diferencia estadística entre los subtipos de CaMa.

Tabla 5. Distribución de las características patológicas por subtipo de CaMa.

Características patológicas		Subtipo de cáncer		
		LUMINAL	HER2+	TRIPLE NEGATIVO
Grado Histológico	I	2	1	2
	II	2	1	1
	III		1	2
Estratificación	IA		1	
	IIA			
	IIB	2	2	
	IIIA	2	2	1
	IIIB			1
Estatus de nodo linfático	N 0-1	1		2
	N 2-3	2	2	

8.2 Inmunohistoquímica (IHQ).

Como parte del proceso clínico que lleva el paciente, para su posterior tratamiento contra el cáncer, la IHQ tiene un rol importante, ya que la expresión de los receptores nos permite clasificar a los pacientes, de acuerdo a la más actual clasificación molecular.

De los 21 pacientes analizados, solamente a 9 se les realizó la IHQ correspondiente (ver tabla 6). Como el objetivo adicional de este proyecto, fue servir de un apoyo adicional para un diagnóstico molecular de CaMa más eficiente, se realizó un apoyo diagnóstico presuntivo por aCGH, destacando una concordancia entre los resultados en 6 de 9 pacientes.

TABLA 6. Inmunohistoquímica realizada y apoyo diagnóstico. Las filas de color verde, hace referencia a la concordancia entre el subtipo de cáncer correspondiente a los pacientes, obtenido mediante la inmunohistoquímica y la plataforma de microarreglos. Las filas de color azul (*) corresponde a la falta de concordancia entre el subtipo de cáncer obtenido por la inmunohistoquímica comparado con la plataforma de microarreglos.

Inmunohistoquímica	Apoyo diagnóstico (aCGH)	Subtipo de cáncer
* ER+	HER+	LUMINAL
* ER+, HER2 (indeterminado)	(-)(-)(-)	LUMINAL
ER+	ER+	LUMINAL
HER2 +++	HER2+	HER 2
* ER+, EP+,	(-)(-)(-)	LUMINAL
ER +, Her2 +++	HER2+	HER2
ER+, PR+	PR+	LUMINAL
HER2 +++	HER2+	HER2
ER+	ESR1+ (1.2)HER2+(. 78)	LUMINAL

En el resto de los pacientes, de los que no se contó con el dato de la IHQ, se les realizó la categorización al subtipo molecular correspondiente mediante el uso de la plataforma de microarreglos (ver tabla 7).

TABLA 7. Diagnóstico molecular presuntivo de los subtipos de CaMa por aCHG. Fueron 12 pacientes, los cuales no se contó con la información de la inmunohistoquímica, por lo que se realizó la búsqueda de los genes correspondientes a cada subtipo, esto fue con el afán de usar la plataforma de microarreglos como apoyo diagnóstico y así poder saber presuntivamente el subtipo de cáncer del paciente.

Pacientes sin inmunohistoquímica	Apoyo diagnóstico (aCGH)	Subtipo de cáncer
LCM 49	(-)(-)(-)	TRIPLE NEGATIVO
LCM 54	(-)(-)(-)	TRIPLE NEGATIVO
LCM 55	HER-2	HER-2
LCM 56	(-)(-)(-)	TRIPLE NEGATIVO
LCM 58	ESR1+(.4) HER-2(2.5)	HER-2
LCM 59	HER-2	HER-2
LCM 61	(-)(-)(-)	TRIPLE NEGATIVO
LCM 62	(-)(-)(-)	TRIPLE NEGATIVO
LCM 63	(-)(-)(-)	TRIPLE NEGATIVO
LCM 64	HER-2	HER-2
LCM 71	HER-2	HER-2
LCM 77	HER-2	HER-2

Posteriormente se logró categorizar a las pacientes de acuerdo al subtipo correspondiente (ver tabla 8); 6 pacientes presentes al subtipo Luminal, 9 presentes al subtipo HER-2 y 6 del subtipo TN.

TABLA 8. Categorización de los pacientes de acuerdo al subtipo molecular de CaMa. LCM corresponde al ID de cada paciente. Incluye a los pacientes con el subtipo proporcionado por la inmunohistoquímica, así como también pacientes sin datos de inmunohistoquímica pero con apoyo diagnóstico de la plataforma de microarreglos para saber el presuntivo subtipo.

Subtipos de cáncer de mama		
LUMINAL	HER+2	TRIPLE NEGATIVO
LCM 34	LCM 45	LCM 54
LCM 35	LCM 49	LCM 55
LCM 29	LCM 51	LCM 58
LCM 50	LCM 56	LCM63
LCM 52	LCM 57	LCM 64
LCM 65	LCM 59	LCM 62
	LCM 61	
6	7	6

8.3 Diferencial cromosómico por subtipo de cáncer de mama.

El diferencial cromosómico revela a grosso modo las alteraciones en el número de copias de material genético. Las franjas azules denotan amplificaciones y las rojas denotan deleciones (ver figuras 6-11).

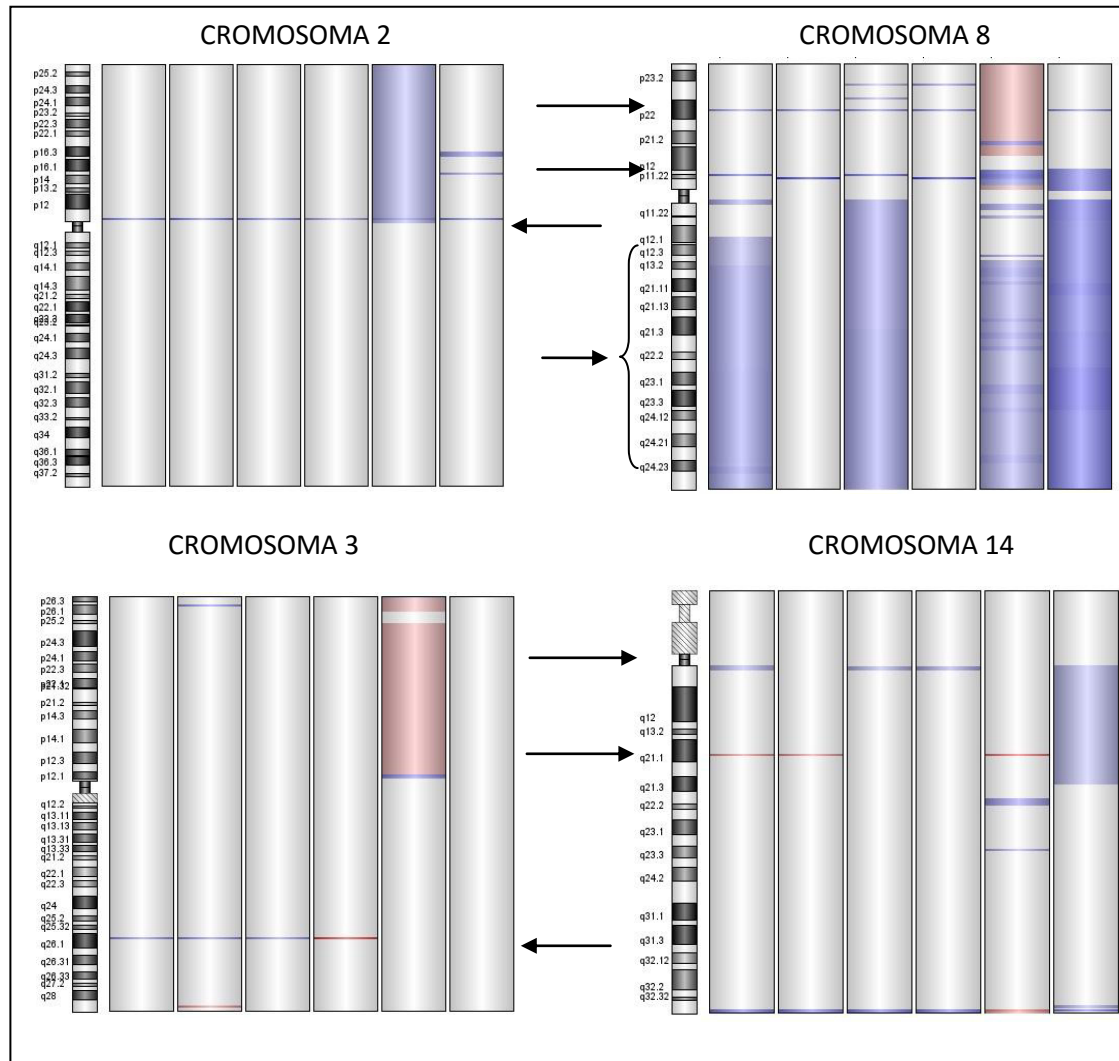


Figura 6. Diferencial cromosómico del subtipo Luminal. Se observan las diversas alteraciones cromosómicas de los principales cromosomas afectados en 6 pacientes. Franjas rojas (deleciones), franjas azules (amplificaciones). Las flechas indican la alteración común en la mayoría de los pacientes del mismo subtipo.

Como podemos observar en el subtipo Luminal (ver figura 6). Se visualiza en el cromosoma 2, una amplificación que se repite en todos los pacientes ubicada



en la región 2q. El cromosoma 8 presenta 3 patrones de bandas que están presentes en la mayoría de los pacientes, y es el cromosoma donde se visualiza un mayor número de amplificaciones amplias respecto a los otros. El primer patrón ubicado en la región citogenética 8p22 se visualiza en 5 de 6 pacientes. El segundo patrón en la región 8p11-12, se presenta en todos los pacientes del subtipo Luminal con diferencia en la amplitud.

El tercer patrón ubicado desde la banda q13.2 a q24.23 está presente en 4 de 6 pacientes. En el cromosoma 3, se observó una pequeña amplificación en la región 3q26.1, en 3 pacientes. El cromosoma 14 presenta 2 patrones de alteraciones, uno corresponde a una amplificación cercana a la región del centrómero, que se puede observar en 3 de 6 pacientes. La otra alteración corresponde a una delección de material genético ubicada en la región q21.1 de igual manera que la alteración anterior, estando presente en 3 de 6 pacientes.

En el cromosoma 16, observamos un patrón de delección presente en 5 de 6 pacientes, cercano al centrómero de dicho cromosoma. El cromosoma 22 presenta una pequeña amplificación de la misma amplitud en la región q11.22 (ver figura 7).

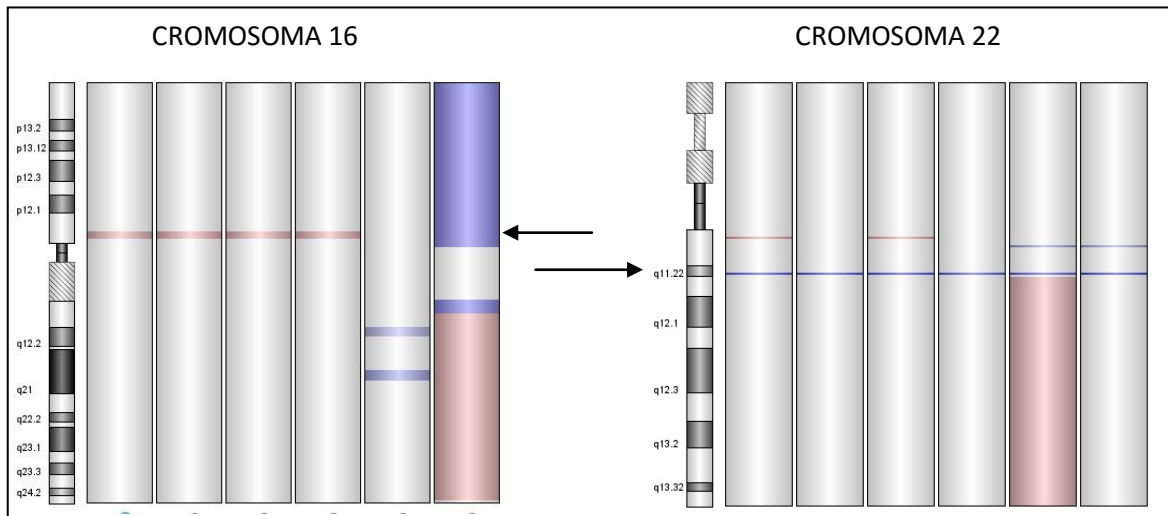


Figura 7. Diferencial cromosómico del subtipo Luminal II. Se observan las diversas alteraciones cromosómicas de los principales cromosomas afectados. Franjas rojas (deleciones), franjas azules (amplificaciones). Las flechas indican la alteración común en la mayoría de los pacientes del mismo subtipo.

En cuanto al subtipo HER-2, presentó alteraciones en los cromosomas 1, 2, 6, 8, 17 y 22. El cromosoma 1 se observa la presencia de 2 patrones de alteraciones correspondiendo a amplificaciones. En las regiones correspondientes q22 y q32.2 - q42.2 presente en 5 de 9 pacientes, cabe señalar que 3 pacientes coinciden con la amplificación casi completa del brazo largo del cromosoma 1. El cromosoma 2 muestra dos amplificaciones en las regiones p12 y p 16.3. Una corresponde a la región p16.3, observada en 4 de 9 pacientes. La segunda amplificación ubicada cerca del centrómero del cromosoma 2 fue observada en casi todos los pacientes, excepto por uno que presenta la deleción completa del cromosoma 2. En el cromosoma 6, se destaca una deleción en la región p21.32, observada en 7 de 9 pacientes. Con respecto al cromosoma 8, se visualiza una pequeña amplificación en la región p22 en 7 de 9 pacientes, debido a la deleción de casi el brazo corto del

cromosoma 8 en dos pacientes. También se observa, otra amplificación en la región 11.22 presente en todos los pacientes. Además, 2 pacientes presentaron amplificación casi completa del brazo largo del cromosoma 8 (ver figura 8).

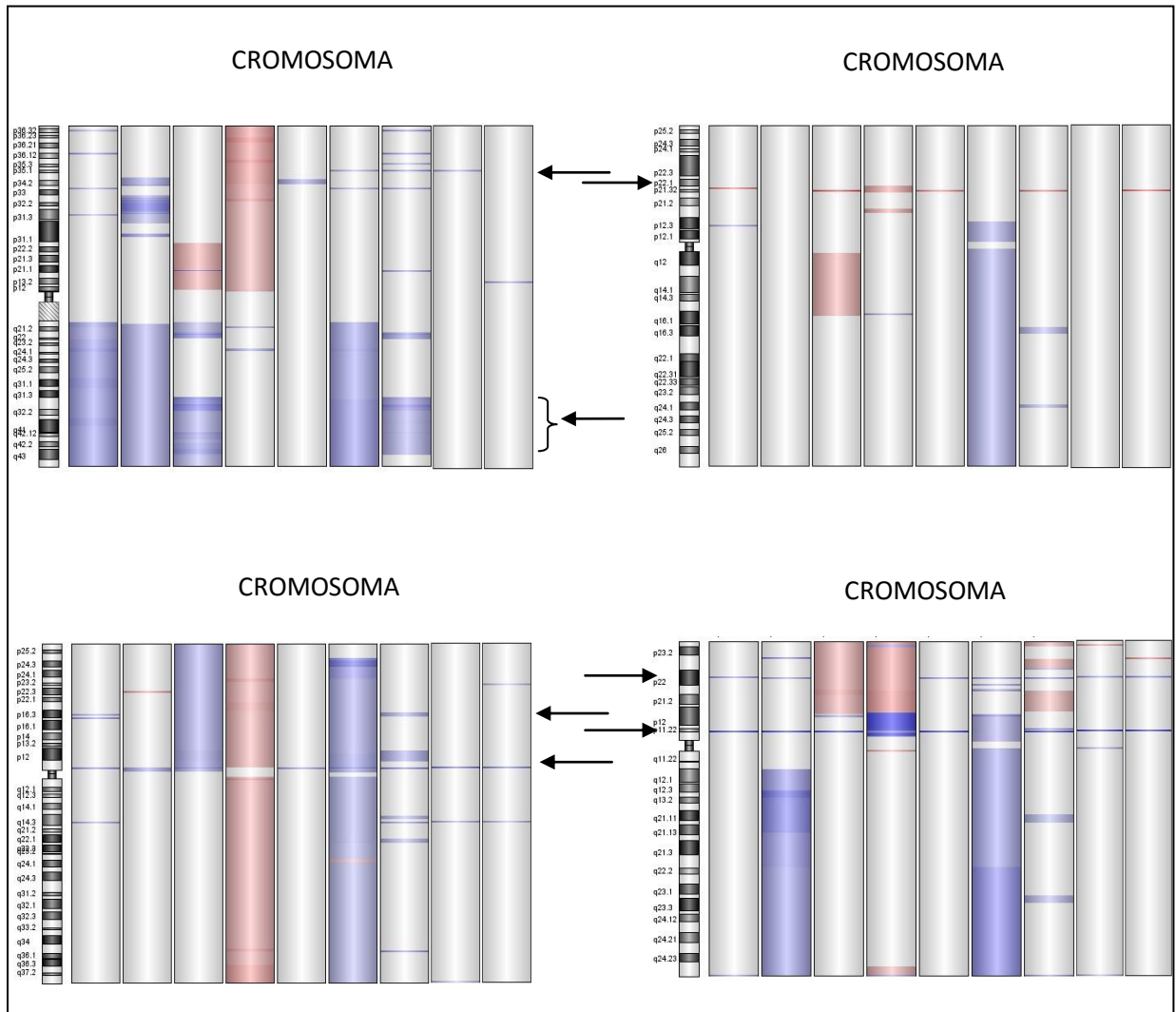


Figura 8. Diferencial cromosómico del subtipo HER-2. Se observan las diversas alteraciones cromosómicas de los principales cromosomas afectados en 9 pacientes. Franjas rojas (delecciones), franjas azules (amplificaciones). Las flechas indican la alteración común en la mayoría de los pacientes del mismo subtipo.

En el subtipo HER-2, el cromosoma 17 es el que presenta más alteraciones con

respecto a los demás cromosomas. Se pueden destacar 5 principales amplificaciones en las regiones q12, q23.2, la banda entre q21.32 y q22, q21.32 y la banda del brazo largo cerca al centrómero, con 9, 6, 6, 5 y 5 pacientes en común, respectivamente. En el cromosoma 22, se destaca la amplificación en todos los pacientes ubicada en la región q 11.22. Cabe señalar que 2 pacientes presentan 2 deleciones completas del brazo largo de dicho cromosoma (ver figura 9).

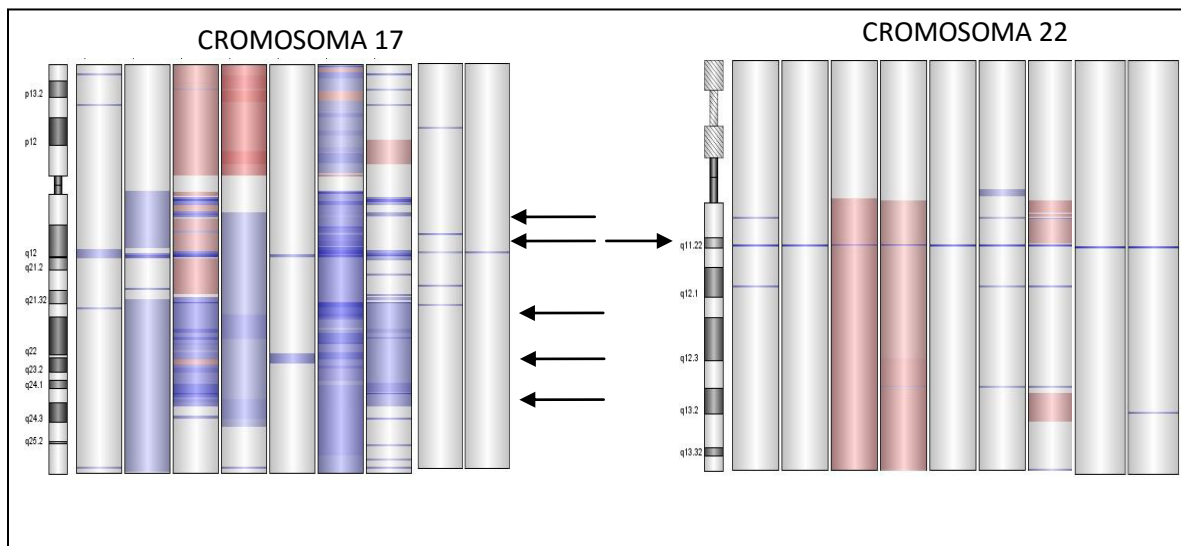


Figura 9. Diferencial cromosómico del subtipo HER-2 II. Se observan las diversas alteraciones cromosómicas de los principales cromosomas afectados. Franjas rojas (deleciones), franjas azules (amplificaciones). Las flechas indican la alteración común en la mayoría de los pacientes del mismo subtipo.

El subtipo TN, también presentó alteraciones mayores en los cromosomas 3,4, 14 y 22 (ver figura 10). En el cromosoma 3, se observó una pequeña amplificación en la región 26.1 presente en 4 de 6 pacientes. Es importante señalar que un paciente tuvo una amplificación amplia que abarca gran parte del brazo largo del cromosoma 3 y otro paciente presentó una amplificación y deleción amplia simultáneamente. El cromosoma 4, presentó una amplificación

en la banda ubicada entre las regiones q13.1 – 13.3, observada en 4 de 6 pacientes. En un paciente se visualizó una amplificación casi completa del cromosoma 4. En el cromosoma 14, se observó una amplificación cerca de la región del centrómero, la cual se encontró en 4 de los 6 pacientes. Mientras que en el cromosoma 22, se destaca la amplificación en todos los pacientes de la región q11.22. Así como también, la delección casi completa del brazo largo en uno de los pacientes.

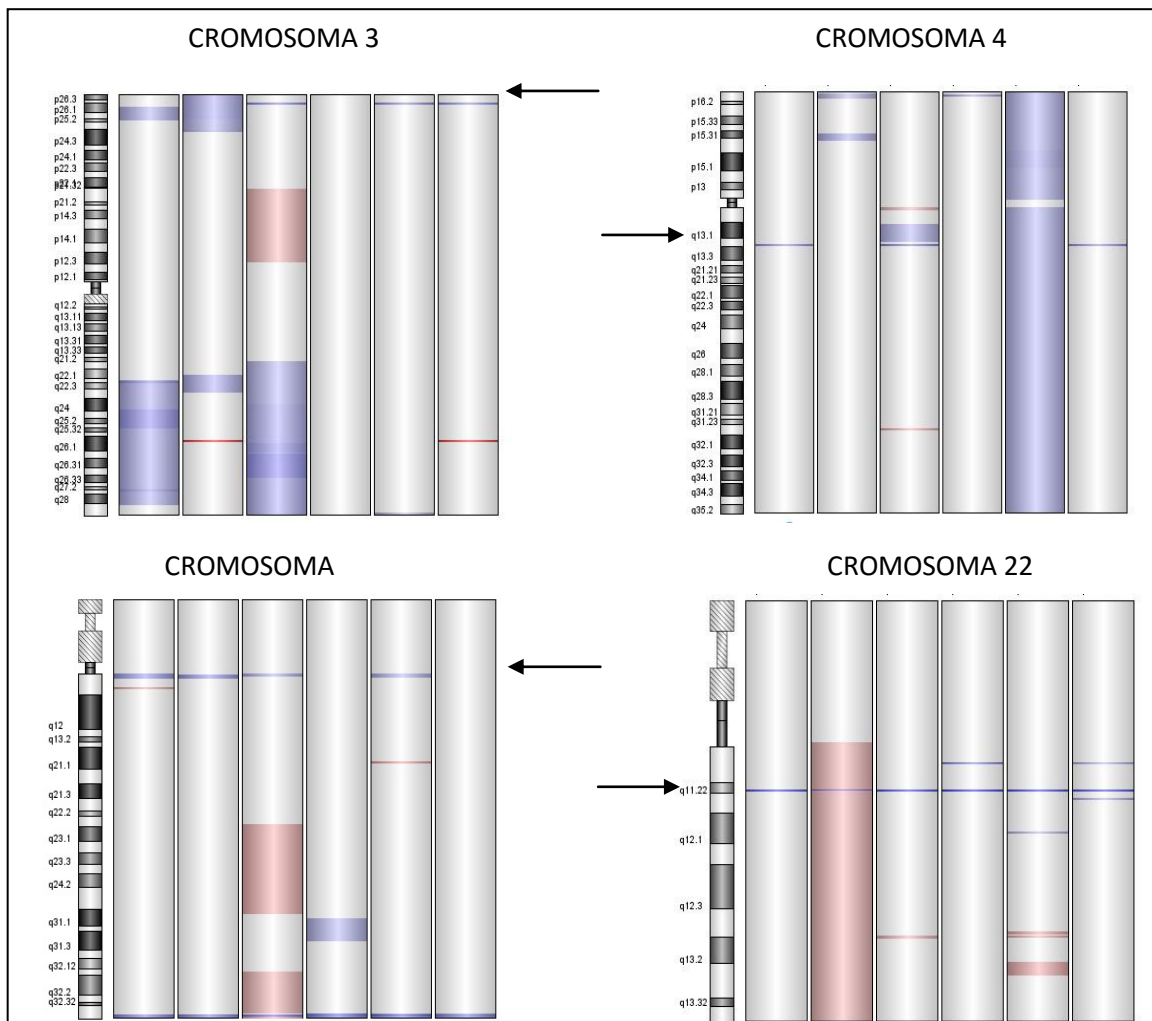


Figura 10. Diferencial cromosómico del TN. Se observan las diversas alteraciones cromosómicas de los principales cromosomas afectados. Franjas rojas (delecciones), franjas azules (amplificaciones). Las flechas indican la alteración común en la mayoría de los pacientes del mismo subtipo.

Se realizó una comparación de alteraciones presentes en la mayoría de los subtipos, para poder detectar un posible biomarcador propio de CaMa, sin tomar en cuenta el subtipo. En el cromosoma 2 se pudo visualizar una amplificación en casi todas las pacientes, ubicada en la región cercana al centrómero, con excepción de una paciente que presentó una delección completa de dicho cromosoma. En el cromosoma 22, se observa una amplificación en la región q11.22 en todas las pacientes, a pesar, de que algunas pacientes presentaron delección en gran parte del brazo largo de este cromosoma. Esto podría indicar la presencia de potenciales biomarcadores con relación a CaMa. Ya que la presencia de estas amplificaciones en casi todos los pacientes, es indicativo de asociación.

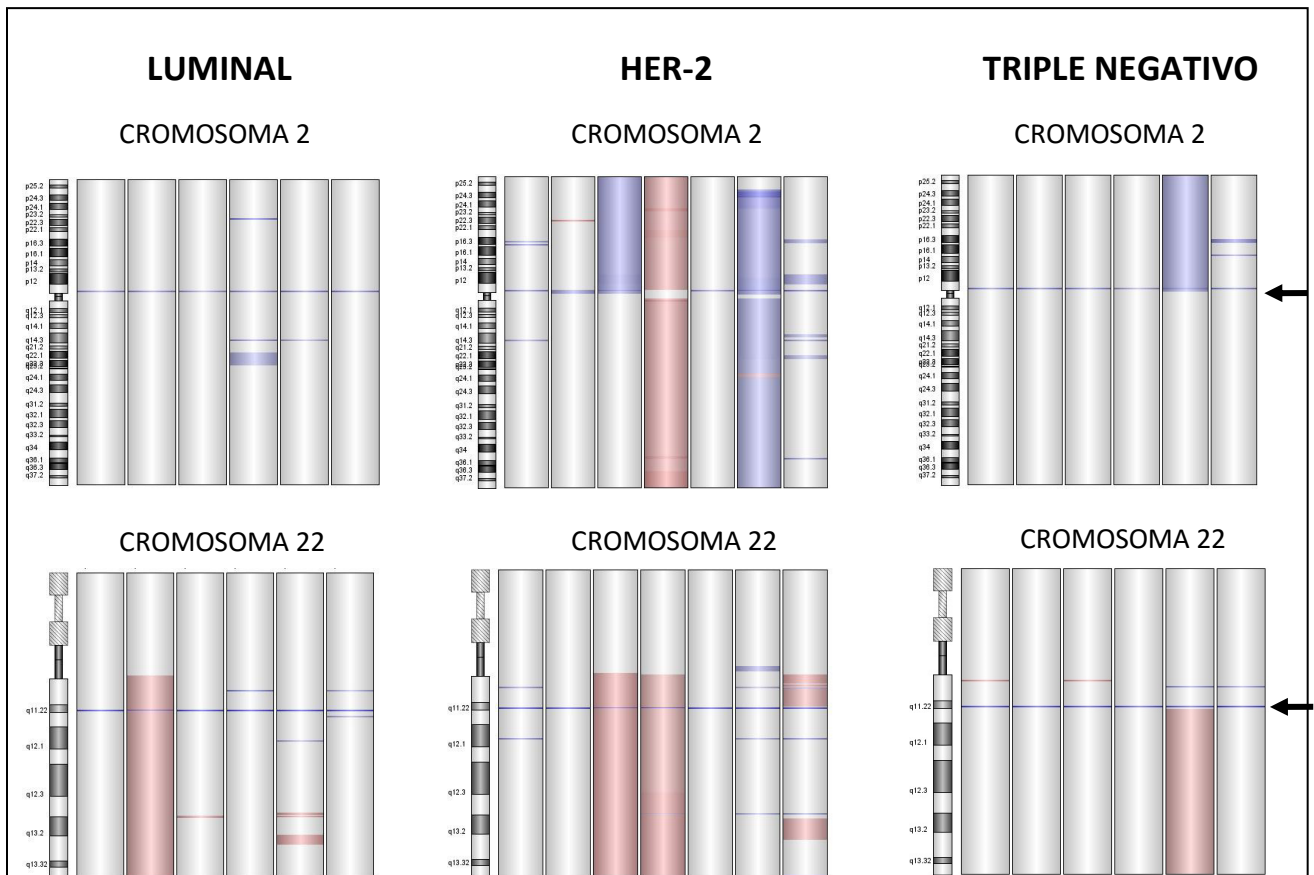


FIGURA 11. Diferencial cromosómico en común en los tres subtipos (cromosomas 2 y 22). Se observan las diversas alteraciones cromosómicas de los principales cromosomas afectados. Franjas rojas (deleciones), franjas azules (amplificaciones).

8.4 Genes alterados por subtipo de cáncer de mama.

Para conocer el número de genes, ya sea, amplificados o deletados de acuerdo al tipo de alteración, se realizó la siguiente clasificación (ver figura 12).

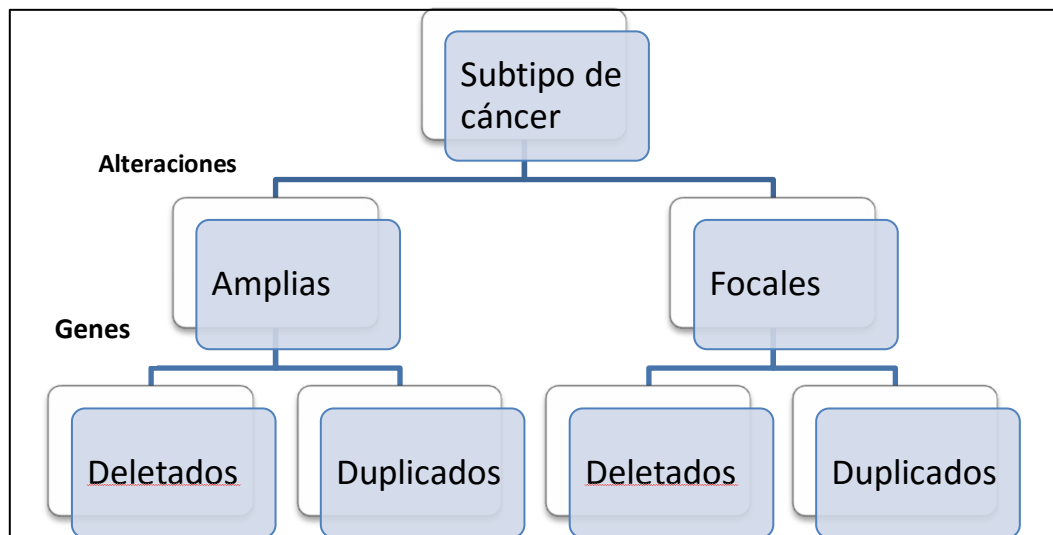


Figura 12. Clasificación de los genes alterados con base al tipo de alteración.

En el subtipo Luminal, las alteraciones amplias con ganancia de material genético, fueron las que se presentaron con mayor número, con aproximadamente 31, por cada paciente. Estas abarcaron 339 genes amplificados. Las alteraciones focales con ganancia de material genético, fueron el segundo grupo con mayor frecuencia, pero solamente afectó a 4 genes. Las alteraciones con pérdida de material genético, tanto amplias como focales, ocuparon el último lugar, ya que se detectó una alteración por cada subtipo y 7 genes deletados por ambas (ver figura 13). En lo que respecta al

subtipo HER-2, las amplias alteraciones con ganancia de material genético presentaron la mayor frecuencia con respecto a las otras. Fueron 42 alteraciones amplias que abarcaron a 495 genes duplicados.

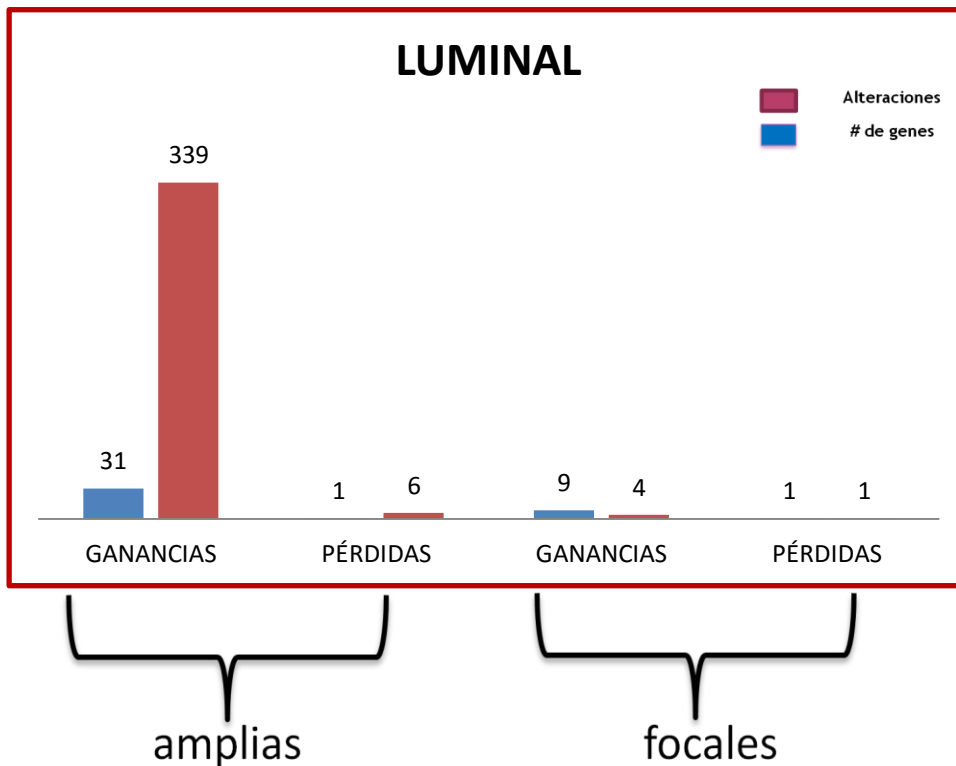


Figura 13. Frecuencia de las variaciones en el número de copias y genes alterados en subtipo Luminal.

En las alteraciones amplias con pérdidas de material genético se obtuvieron 9 alteraciones, que afectó a 297 genes deletados. Por otro lado, 12 fue la frecuencia obtenido de las alteraciones focales con ganancia de material genético que afectó a 38 genes. Mientras que 2 alteraciones focales con pérdida de material genético, fue la de menor frecuencia afectando a 3 genes (ver figura 14).

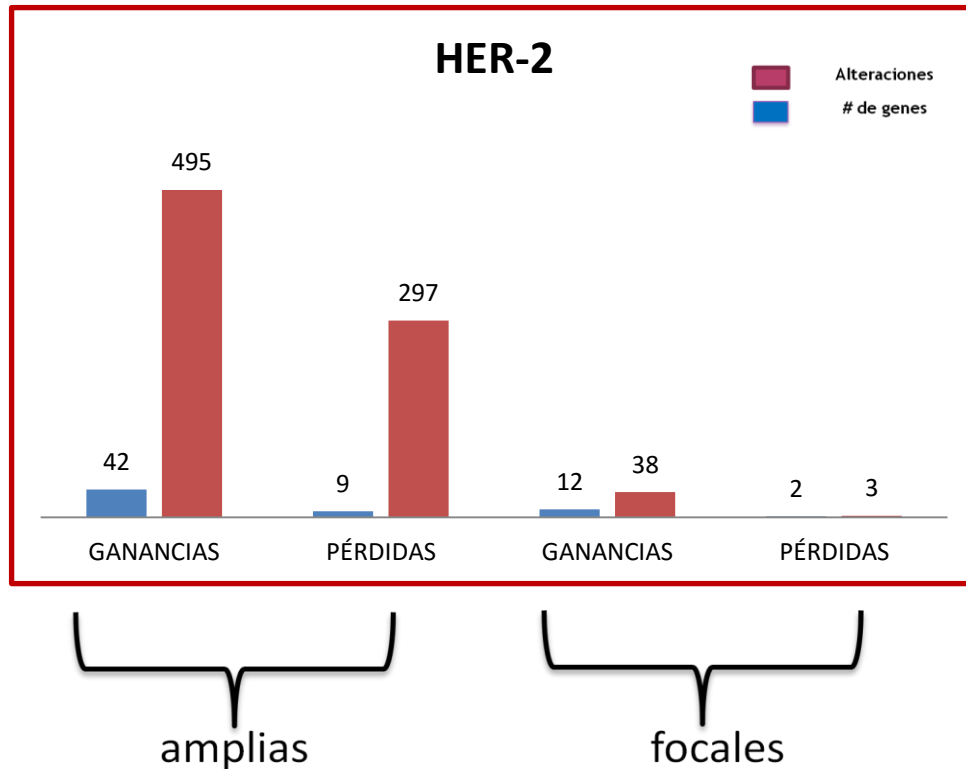


Figura 14. Frecuencia de las variaciones en el número de copias y genes alterados en subtipo HER-2

Al igual que los otros subtipos (Luminal y HER-2), en el subtipo TN, las alteraciones amplias con ganancia en material genético fueron las de mayor frecuencia con 23 de ellas, las cuales abarcaron a 310 genes. Las alteraciones amplias con pérdida de material genético fueron solamente 2, sin involucrar genes con asociación a CaMa. En cuanto a las alteraciones focales con ganancia de material genético, se obtuvo una frecuencia de 18, donde 15 genes estuvieron duplicados. Mientras que sólo se detectó 1 pérdida de material genético focal, sin afectar a genes importantes en la biología tumoral (ver figura 15).

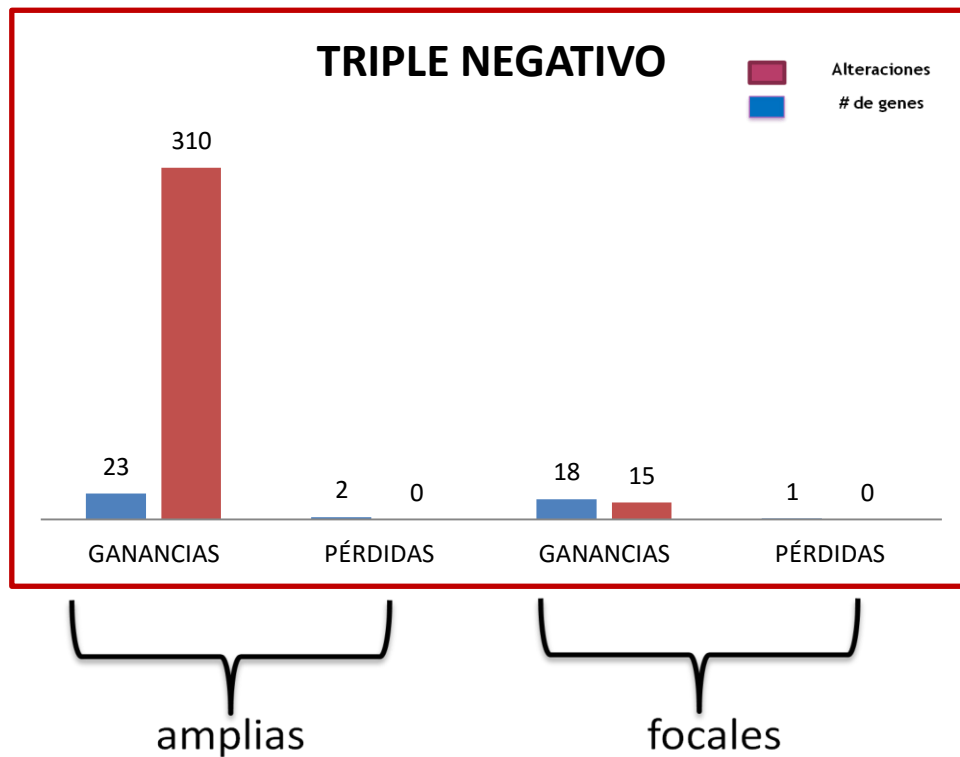


Figura 15. Frecuencia de las variaciones en el número de copias y genes alterados en subtipo Triple Negativo

8.5 PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ALTERADAS EN LOS SUBTIPOS DE CÁNCER.

LUMINAL

Entre las vías relacionadas con impacto en la biología tumoral se destacan las siguientes en orden decreciente: angiogénesis, caderinas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblastoide, respuesta a estrés oxidativo y señalización Wnt. Aunque actualmente desconocemos su significado, es

notable destacar una gran alteración en la vía de las presenilinas relacionada con la enfermedad del alzheimer (ver figura 16).

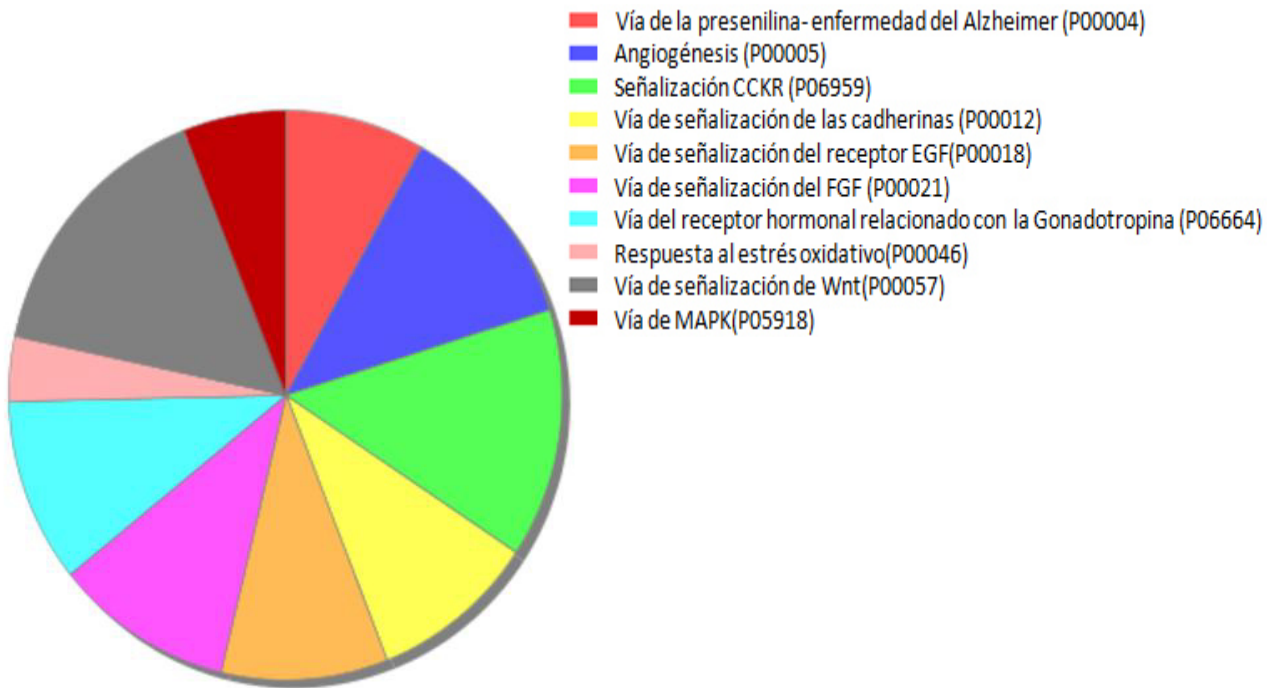


Figura 16. Vías de señalización alteradas en el subtipo Luminal.

HER-2

En el subtipo HER-2 se destacan las siguientes vías alteradas con relación directa o indirecta con cáncer: angiogénesis, apoptosis, biosíntesis de purinas y pirimidinas, replicación del ADN, factor de crecimiento epidérmico, señalización del endotelio, factor de crecimiento fibroblastoide, regulación de la transcripción, respuesta a hipoxia, señalización JAK/STAT, respuesta a estrés, factor de crecimiento derivado de plaquetas, Ras, ciclo de krebs, Notch, factor de crecimiento endotelial vascular, Señalización Wnt y p53. También se visualizan, otras vías alteradas, como son: activación de linfocitos B, orientación axónica

mediado por netrin y Slit/Robo, señalización del receptor 1 y 3 acetilcolina-muscarínico (ver figura 17).

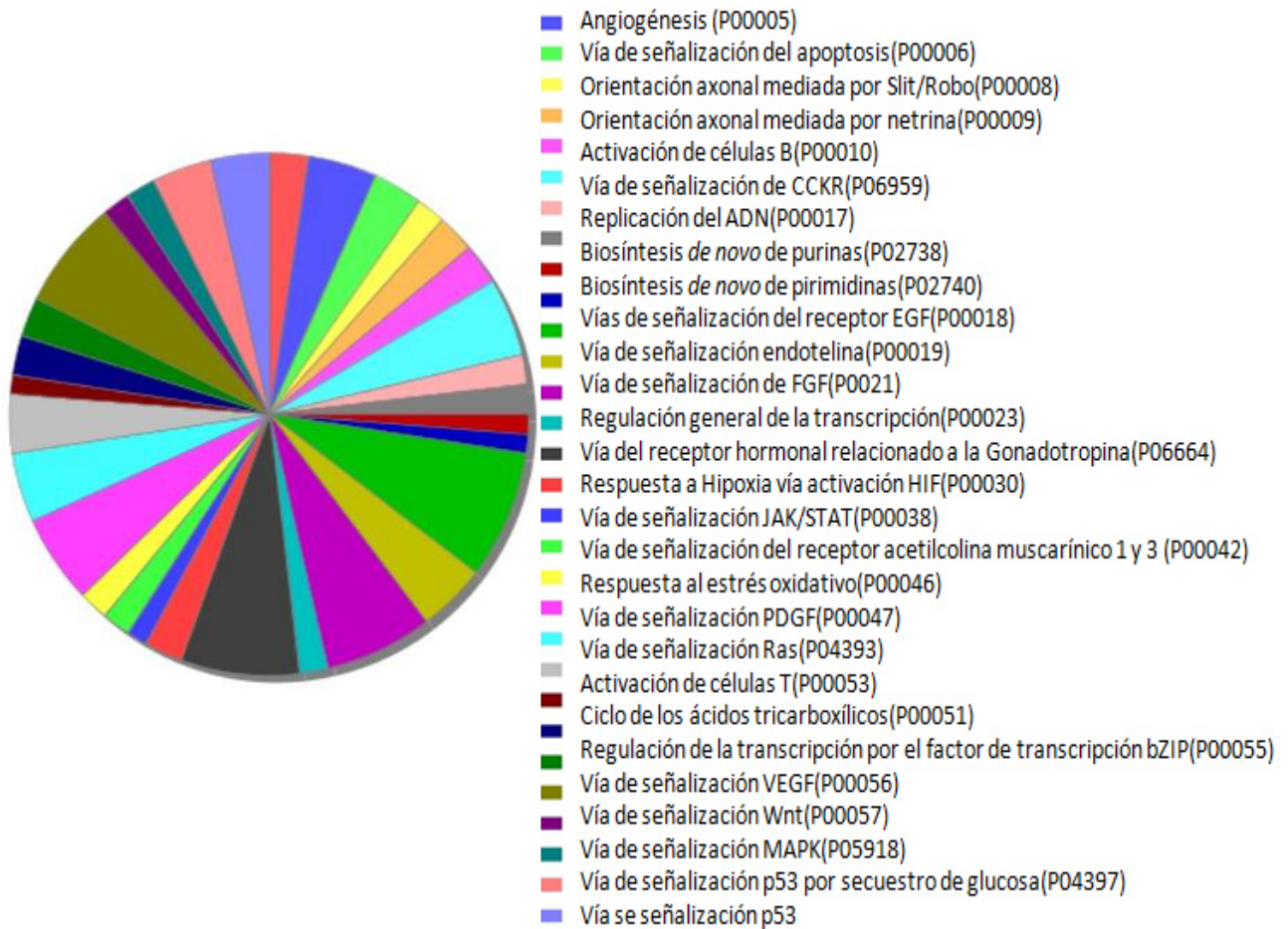


Figura 17. Vías de señalización alteradas en el subtipo HER-2

Triple Negativo

En lo que corresponde al subtipo TN, las vías alteradas que predominan en cáncer, fueron las siguientes: angiogénesis, biosíntesis de purinas, factor de crecimiento epidérmico, señalización del endotelio, factor de crecimiento fibroblástico, respuesta a hipoxia, factor de crecimiento insulina-quinasa B, factor de crecimiento derivado de plaquetas, Ras y p53. También se observó, la presencia de otras vías alteradas como son: orientación axónica mediado por netrina y activación de células T (ver figura 18).

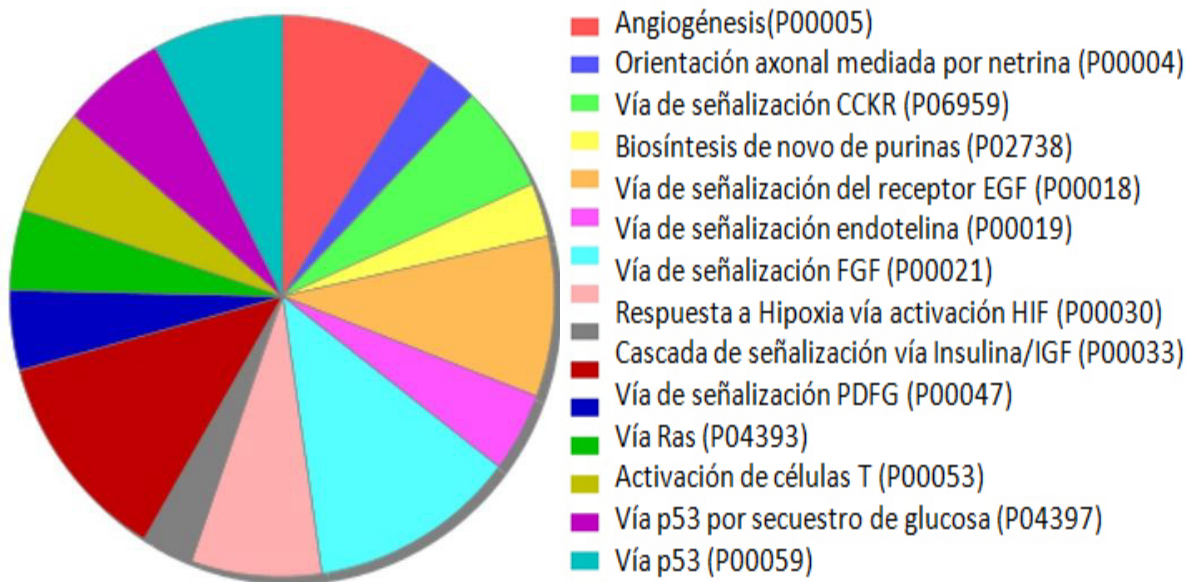


Figura 18. Vías de señalización alteradas en el subtipo TN.

8.6 Genes potenciales asociados a subtipos de cáncer de mama

En este gráfico de Venn, se visualizan los genes propios de cada subtipo, así como los genes que se comparten entre ellos. El subtipo Luminal presentó 25

genes mayoritariamente alterados en las pacientes. Entre los que se destacan: *RECQL4*, *PVT1*, *LSM1*, *MTSS1*, *PRKDC*, *CTHRC1*, *TRPS1*, *WISP1*, *BAALC*, *BOP1*, *EBAG9*, *HMGA2*, *LASP1*, *BRPF1*, *MMP16*, *NOV*, *PTK2*, *RAD54L*, *RDM1*, *RNF139*, *RP1*, *RRM2B*, *SCRT1*, *TAF1* y *TCEB1*. El subtipo HER-2 presentó 13 genes: *AKT3*, *TP53BP2*, *CSF3*, *KISS1*, *CASC3*, *RAD51C*, *NME2*, *C17ORF37*, *MIR21*, *USP32*, *SLC45A3*, *ICAM2* y *BRIP1*, en el subtipo TN se destacan 11 genes: *DAP3*, *ABL2*, *RAB25*, *RAB2*, *RHOA*, *C8ORF4*, *EIF4EBP1*, *RAD18*, *RASA2*, *CLPTM1L* y *SKP2*. Estos genes están asociados a cáncer de mama y otros tipos de cáncer, así como también a funciones importantes que aún no se reportan vinculados directamente a cáncer.

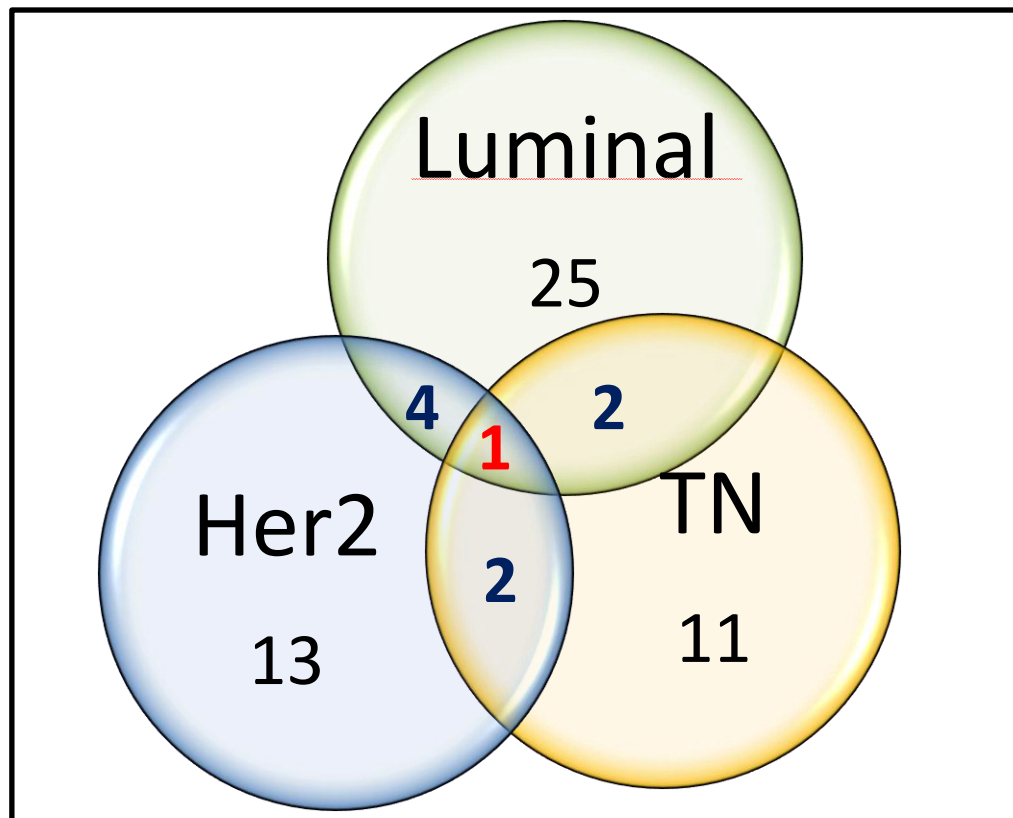


Figura 19. Genes candidatos propios y en común en los subtipos de CaMa.



Los genes que se comparten entre los subtipos Luminal y HER-2 son: *THRA*, *AATF*, *ERBB2* y *GRB7*. Los genes entre los subtipos Luminal y TN son: *WHSC1L1* y *FGFR1*. Los genes compartidos entre los subtipos HER-2 y TN son: *ERCC2* y *MN1*. Se detectó un gen en común entre todos los subtipos que muy probablemente esté asociado como biomarcador de diagnóstico temprano a CaMa, el cual es se encuentra en el cromosoma 22.

8.7 Asociación entre las variables clínicas y los subtipos de cáncer.

Se hizo la asociación entre los pacientes agrupados por cada subtipo con las principales variables clínicas que se presentaron en mayor frecuencia (edad, menarquía y menopausia). La prueba de Chi-cuadrados, utilizada para asociaciones entre variables, indicó que no existe asociación significativa, con un 95% de confianza (ver tabla 9).

Tabla 9. Asociación entre variables clínicas y subtipos de cáncer

Cáncer * rango de edades					
Tabla de contingencia					
Rango-Edades					
Recuento		29-48	49-68	69-88	Total
Cáncer	Luminal	2	2	2	6
	HER-2	4	2	1	7
	TN	0	2	0	2
Total		6	6	3	15
Pruebas de chi-cuadrado					
		Valor	gl	Asintótica (bilateral)	
Chi-cuadrado de Pearson		3.000 [*]	2	0.223	
Razón de verosimilitudes		3.542	2	0.170	
Asociación lineal por lineal		0	1	1.000	
No. De casos válidos		12			
[*] . 9 casillas (100 %) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es de .67.					
Cáncer * menarquía					
Tabla de contingencia					
Menarquía					
Recuento		10-dic	13-15	16	Total
Cáncer	Luminal	2	3	0	5
	HER-2	3	3	1	7
	TN	0	1	1	2
Total		5	7	2	14
Pruebas de chi-cuadrado					
		Valor	gl	Asintótica (bilateral)	
Chi-cuadrado de Pearson		3.511 [*]	4	0.476	
Razón de verosimilitudes		4.222	4	0.377	
Asociación lineal por lineal		1.787	1	0.181	
No. De casos válidos		14			
[*] . 9 casillas (100 %) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es de .29.					
Cáncer * menopausia					
Tabla de contingencia					
Menopausia					
Recuento		Si	No	Total	
Cáncer	Luminal	4	1	5	
	HER-2	2	3	5	
	TN	2	0	2	
Total		8	4	12	
Pruebas de chi-cuadrado					
		Valor	gl	Asintótica (bilateral)	
Chi-cuadrado de Pearson		3.000 [*]	2	0.223	
Razón de verosimilitudes		3.542	2	0.170	
Asociación lineal por lineal		0	1	1.000	
No. De casos válidos		12			
[*] . 9 casillas (100 %) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es de .67.					



Capítulo IX

Discusión

Este estudio representa un análisis de CNA en los principales subtipos moleculares de CaMa: Luminal, HER-2 y TN.

Los principales cromosomas alterados por subtipo, visualizados a través del análisis diferencial de aberraciones, que consiste en una vista panorámica de las amplificaciones y deleciones por cromosoma de cada paciente, se describe a continuación. Para el subtipo Luminal, los cromosomas que presentaron un mayor número de alteraciones fueron el 2, 3, 8, 14, 16 y 22. Nuestros resultados concuerdan parcialmente con el estudio de Francesc et al, del 2012, ya que ellos destacan mayores alteraciones en los cromosomas 1, 8, 16, 17 y 20. Esto quizá se deba a diferencias en las metodologías de obtención de muestras usadas en ambos estudios, ya que a pesar de que los pacientes no recibieron ningún tratamiento adyuvante, la obtención de las muestras fue a través de bloques de parafina, a diferencia de nuestro estudio que fue en fresco. Las muestras en parafina muestran algunas desventajas como el hecho de ser una barrera física y que además contiene formaldehído (componente activo de la formalina) el cual promueve la generación de entrecruzamiento entre ácidos nucleicos y proteínas, ocasionando inconvenientes durante la extracción de ADN e inhibiendo la PCR (Bustamante et al., 2011). Otro punto importante fue el threshold que dichos investigadores utilizaron, para las amplificaciones fue de > 0.5 y para las deleciones fue de < -0.50 ; diferente a



nuestro umbral de detección (amplificaciones $>.30$ [más laxo] y deleciones $>.0.60$ [más astringente]). Sin embargo, además de los valores umbrales, nuestro estudio evaluó también la región/genes involucrados en la alteración, asegurando la inclusión de aquellas alteraciones que involucrarán genes de cáncer. Es importante señalar por tanto, que el valor umbral establecido por cada laboratorio debe ser tomado con mucha prudencia y contar con un sistema de validación.

En cuanto a los cromosomas alterados en el subtipo HER-2, destacan el 1, 2, 6, 8, 17 y 22; aunque son los cromosomas 1, 8 y 17 los que presentan un mayor número de aberraciones con ganancia de material genético que el resto. Esto concuerda en gran medida con un estudio donde comparan pacientes con solamente adenocarcinoma ductal *in situ* y pacientes con adenocarcinoma ductal *in situ* y cáncer invasivo simultáneo, en los cuales se encontraron frecuentemente ganancias en el número de copias en las regiones que comprenden 1q, 8q24 y 11q13 (Allison et al., 2015). Un análisis multivariado, mostró que ganancias en las mismas regiones (1q, 8q24 y 11q13) son altamente asociadas a CaMa invasivo en pacientes con adenocarcinoma ductal *in situ* (Latta et al., 2002). La concordancia parcial de nuestros resultados con otros estudios sobre el tema, podría deberse a la diferencia histopatológica del CaMa, ya que nuestra población de estudio consistió en pacientes con adenocarcinoma ductal infiltrante. Es importante destacar, que las alteraciones adicionales de los cromosomas 6, 17 y 22, con respecto a los estudios en



pacientes con adenocarcinoma ductal *in situ*, podrían dar indicios acerca del entendimiento de cómo es la evolución del CaMa invasivo, en términos de progresión genómica y temporal.

Los principales cromosomas alterados en el subtipo TN fueron el 3, 4, 14 y 22. La alteración en común entre las pacientes observadas en el cromosoma 14, fue una amplificación amplia. Dicha alteración no concuerda con lo reportado por Peggy et al., en 2011 ya que, su estudio destaca pérdida en el número de copias en dicho cromosoma, con una frecuencia diferencialmente significativa comparada con los otros subtipos de CaMa (Luminal y HER-2). Esta diferencia entre los resultados probablemente sea, que dicho estudio se realizó sobre una población americana-africana, a diferencia de nuestra población que fueron pacientes mestizos del noreste de México, con componente en teoría más europeo; no obstante, esto es una especulación.

La alteración observada en el cromosoma 22 (ganancia) no concuerda con un estudio de CaMa en TN (Fabrice et al., en 2012), en una población de mujeres africanas, comparadas con una población de mujeres estadounidenses, donde la región alterada fue el segmento que comprende q12.1-q13.1, que fue predominante en las mujeres africanas, lo que posiblemente sea un biomarcador que distinga dichas poblaciones de estudio. Probablemente, esta región amplificada en el cromosoma 22, corresponde a un biomarcador temprano de CaMa específico de nuestra población, ya que otros estudios vinculan mutaciones puntuales o fusión génica en dicha región alterada con



asociación a metástasis de CaMa a cerebro y leucemia mieloide crónica respectivamente. No obstante, también podría representar un polimorfismo en nuestra población respecto a la referencia usada para el análisis de microarreglos.

Llamativamente, las alteraciones detectadas con mayor frecuencia en todos los subtipos de CaMa (Luminal, HER-2 y TN) fueron ganancias amplias. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los grupos.

Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Rameen et al., 2010, quienes encontraron que las CNA focales ocurren con mayor frecuencia que las amplias. Ellos consideran que la frecuencia de las alteraciones es inversamente proporcional a la longitud, es decir, entre menor tamaño mayor frecuencia. Es importante señalar que dichos autores hicieron un estudio amplio de 26 tipos diferentes de cáncer en 3,000 pacientes, por lo que, la variación de sus resultados respecto a los nuestros podría ser esperada, ya que nuestro enfoque fue exclusivamente en CaMa, además que, en cierto modo, el uso de diferentes metodologías para la obtención y procesamiento de las muestras podría representar un punto de variación. Sin embargo, otra posibilidad es que el genoma de nuestra población de estudio sea más susceptible a reorganizarse de manera diferente, similar a lo sugerido por Sánchez et al., en 2016.

Ahora bien, en cuanto a las alteraciones, no en función de su longitud (amplia o focal), sino al número de copias (ganancias o pérdidas), los resultados



obtenidos revelan una frecuencia significativa de genes duplicados y/o amplificados respecto a los deletados. Esto concuerda con lo reportado por Fridlyand et al., en 2006, destacan que las amplificaciones ocurren en tumores de CaMa con pocas y muchas aberraciones en el número de copias. Además, la presencia de múltiples regiones amplificadas en algunos tumores permite apoyar una posible base genética, en cuanto al origen y progresión del CaMa. Por ejemplo, Al-Kuraya et al., en 2004 reportaron un mayor número de co-amplificaciones en genes comunes en CaMa, respecto a la frecuencia de amplificaciones de manera individual.

Vías de señalización involucradas en los diferentes subtipos

Entre las principales vías de señalización alteradas en el subtipo Luminal destacan: angiogénesis, estrés oxidativo, factor de crecimiento epidérmico, fibroblástico, caderinas y Wnt. Todas ellas con significancia estadística. En un estudio realizado en 2016 por Carlos C., et al., se reportó que las vías de AKT, daño al ADN y apoptosis, son las principales vías alteradas en el subtipo de cáncer ER+. Otro estudio (Francesc et al., en 2012), reporta que regiones con pérdidas significativas en el subtipo Luminal repercuten en alteraciones de vías como: apoptosis, mitosis, angiogénesis y diseminación celular. En cuanto a las ganancias, las vías alteradas involucran: control del ciclo celular, angiogénesis, resistencia a apoptosis, agentes quimioterapéuticos, metástasis, diseminación celular y PI3K/AKT/mTOR. Es notable cierto contraste entre nuestros resultados con los reportados por otros investigadores, destacando solamente la



angiogénesis y daño al ADN (estrés oxidativo) son las vías alteradas en común. Esto puede deberse a que dicho estudio combinó el análisis de CNA y mutaciones puntuales (Carlos et al., 2016). Por otro lado, Francesc et al., en 2012 utilizaron una vez más puntos de corte diferentes a los nuestros, además de una resolución de la plataforma de análisis de las CNA diferente. Un punto importante a destacar, en cuanto a nuestros resultados, es la realización de microarreglos de expresión como la forma idónea para la corroboración de las alteraciones encontradas por aCGH, además de su posterior validación por qPCR. Sin embargo, también es posible encontrar diferentes mecanismos de regulación de la expresión derivada de tantos cambios genómicos y encontrar diferencias entre lo observado en CNA y expresión génica.

Los resultados obtenidos en cuanto a las principales vías de señalización relacionadas con el subtipo HER-2, se destacan las de angiogénesis, apoptosis, replicación ADN, biosíntesis de novo de purinas y pirimidinas, regulación de la transcripción, hipoxia, JAK/STAT, respuesta a estrés oxidativo, ciclo de krebs, Notch, Wnt, P53 y factores de crecimiento epidérmico, fibroblástico, endotelial vascular y derivado de plaquetas.

Nuestras observaciones concuerdan, parcialmente, con lo reportado por Tamar et al., en 2015, ya que ellos destacan que las principales vías alteradas fueron las de biosíntesis de glicanos, motilidad celular, crecimiento celular, muerte celular y energía metabólica, haciendo énfasis que las vías relacionadas a energía metabólica significativamente son las más alteradas; posiblemente sea



la principal función diferencial entre los subtipos de cáncer y revele con estudios posteriores una red molecular asociada con esas funciones. La parcialidad entre los resultados, tal vez se deban a la diferencia de enfoques entre los estudios; si bien, las variaciones genéticas muchas veces se presentan de manera concurrente, también es cierto que las repercusiones varían entre ellas (Arend et al., en 2013).

Las vías alteradas respecto al subtipo TN son las siguientes: angiogénesis, biosíntesis de purinas, respuesta a hipoxia, Ras, P53, activación de células T, factores de crecimiento epidérmico, fibroblástico, insulinoide y derivado de plaquetas. Esto puede indicar una desregulación de la fosforilación, como modificación covalente entre activación y/o inactivación de señales.

Asimismo, Tamar et al., en 2015, encontraron que el subtipo TN tiene alterada vías semejantes a los arrojados por nuestros resultados, entre las que destacan las vías de: replicación y reparación de ADN, traducción, catabolismo, crecimiento y muerte celular, haciendo énfasis en el gen *P53* como principal gen conductor mutado en la mayoría de los pacientes de TN. Cabe señalar que Lee et al., en 2006 sugieren utilizar al gen *p53* como un factor pronóstico específico para el subtipo TN. Nuestras observaciones señalan alteración en la vía Ras específicamente en TN, esto es muy importante, ya que se tienen reportes donde se menciona que la alteración de la vía Ras potencia en gran medida a la angiogénesis en CaMa, a pesar, de que no se realiza una distinción entre subtipos de CaMa. Es muy probable que la malignidad y la poca



sobrevida entre pacientes con dicho subtipo se deba a la desregulación ocasionada por la vía Ras (Ray et al., 2014).

Nuestros resultados hacen énfasis en vías en común que son compartidas en los tres subtipos de cáncer. En las que resaltan: angiogénesis, factor de crecimiento epidérmico y fibroblastoide. Estos resultados difieren de lo reportado por Charles et al., en 2016, puesto que sus resultados arrojan que las vías preferencialmente alteradas son: PI3K-Akt, p53 y Wnt. Probablemente la discrepancia entre los datos radica en que la población de estudio que utilizaron para dicho estudio, eran pacientes con tratamiento y sólo se enfocaron en mutaciones puntuales. En cierto modo, esto realza el papel de las CNA, ya que abren campos de oportunidad para poder conocer de manera más profunda su influencia sobre la biología tumoral, ya sea, antes o después del tratamiento.

Fue de nuestro interés conocer los genes tanto propios como compartidos entre cada subtipo de CaMa, con la intención de encontrar posibles genes alterados que posteriormente se puedan usar como biomarcadores. Entre los genes específicos para cada subtipo se visualizan (ver tabla 10). Es importante señalar que los genes propios para cada subtipo fueron seleccionados con base a las mayores frecuencias encontradas entre los pacientes de cada subtipo.

Tabla 10. Lista de genes candidatos propios y compartidos en los subtipos de CaMa.

GENES CON GANANCIA EN EL NÚMERO DE COPIAS RELACIONADOS AL CÁNCER DE MAMA					
LUMINAL	HER-2	TRIPLE NEGATIVO	LUMINAL Y HER-2	LUMINAL Y TRIPLE NEGATIVO	HER-2 Y TRIPLE NEGATIVO
RECQL4	AKT3	DAP3	AATF	WHSC1L1	MN1
PVT1	TP53BP2	ABL2	ERBB2	FGFR1	ERCC2
LSM1	CSF3	RAB25	GRB7		
MTSS1	KISS1	RAB2	THRA		
PRKDC	CASC3	RHOU			
CTHRC1	RAD51C	C8orf4			
TRPS1	NME2	EIF4EBP1			
WISP1	C17ORF37	RAD18			
BAALC	MIR21	RASA2			
BOP1	USP32	CLPTM1L			
EBAG9	SLC45A3	SKP2			
HMGA2	ICAM2				
LASP1	BRIP1				
MLLT6					
MMP16					
NOV					
PTK2					
RAD54					
RDM1					
RNF139					
RP1					
RRM2B					
SCRT1					
TAF15					
TCEB1					

Es importante destacar que de los 13 genes seleccionados correspondientes al subtipo HER-2, los genes amplificados *C17orf37*, *RAD51C*, *CASC3*, *NME2*, *AKT3*, *USP32* y *MIR21* presentan una relación directa a CaMa. Dasgupta et al., en 2009, reportaron que la alteración en la función del gen *C17orf37* está involucrada en potenciar la migración e invasión celular. Además las observaciones realizadas por Evans et al., 2006 consideran a *C17orf37* como posible biomarcador de CaMa, al encontrarlo sobre-expresado. Esto concuerda con nuestro estudio, ya que dicho gen presentó amplificación génica y muy probablemente existe una expresión diferencial a nivel transcripcional. El gen *RAD51C* presenta un rol importante en la estabilidad genómica y reparación del ADN mediante la recombinación homóloga. Diversos estudios indican que



mutaciones en dicho gen se asocian a enfermedades como anemia de fanconi y cáncer de ovario y mama (Somyajit et al., 2012; Wu et al., 2011), y a que dicho gen actúa como supresor de tumor. Nuestro estudio reveló una amplificación de este gen, que probablemente sea factor de buen pronóstico, ya que su posible sobre-expresión ayudaría a contrarrestar la inestabilidad genómica de la célula tumoral.

Degot et al., en 2004, reportaron que *CASC3*, cuyo producto proteico es un componente “core” de un complejo importante en el splicing del ARN, se sobre-expresa. Dicho reporte concuerda con la amplificación detectada en nuestro análisis, posiblemente sea un gen que su alteración sea de mal pronóstico para las pacientes de CaMa.

Las observaciones realizadas por Tong et al., en 2015, acerca del gen *NME2* sugieren la estimulación temprana de la angiogénesis tanto en tumor primario y/o metastásico en CaMa. Esto apoya a los datos obtenidos acerca de la amplificación de dicho gen y la alteración de la angiogénesis en nuestro estudio. *AKT3* es una protein-cinasa que tiene un papel clave en la regulación de la sobrevivencia celular, señalización de la insulina, angiogénesis y formación de tumor (Wright et al., 2008). Existen diversos estudios, que mencionan que el incremento en los niveles de fosforilación de este gen en conjunto con una sobre-expresión del gen *ERBB2*, se asocian a un mal pronóstico para pacientes con de CaMa del subtipo HER-2 (Cicenas et al., 2005). Esto concuerda con nuestros resultados parcialmente, ya que encontramos co-amplificados ambos



genes en el subtipo HER-2 y que muy probablemente se pueda reflejar a nivel transcripcional. La amplificación de *USP32*, que codifica para una proteasa específica de ubiquitina, se ha encontrado tanto en CaMa, como en tumor renal, lo que sugiere un rol funcional en el sistema de ubiquitinación y la tumorigénesis. (Akhavantabasi et al., 2010). Esto es consistente con nuestras observaciones, ya que detectamos amplificado dicho gen en nuestras pacientes con CaMa. *MIR21* es un miARN no codificante que está involucrado en la regulación post-transcripcional de la expresión génica (Quintana et al., 2001). Se ha implicado la alteración de *MIR21* en diversos tipos de cáncer. En lo que respecta al CaMa, se tiene reportado que la sobre-expresión de *MIR21* predice una baja supervivencia en pacientes con CaMa (Pan et al., 2014). La amplificación detectada en nuestro estudio del gen *MIR21* podría ser también un indicador de mal pronóstico para el subtipo HER-2, ya que muy probablemente dicha alteración corresponda con una expresión diferencial a nivel transcripcional.

En cuanto a los genes amplificados *SLC45A3*, *ICAM2*, y *CSF3*, no existen reportes hasta el momento que asocien la alteración de estos genes directamente con el origen o progresión del CaMa, pero sí con otros tipos, de cáncer, como son de próstata (Walker et al., 1999), colon (Krüger et al., 2001), y leucemia (Kim et al., 2007), respectivamente.

Llamativamente, nuestro estudio detectó la amplificación de genes supresores de tumor como el *KISS1*, que es un gen supresor de metastasis en melanoma y



CaMa (Kostadima et al., 2007). Por otra parte, *BRIP1* un gen que codifica a una helicasa que participa en la reparación de doble cadena del ADN (Cantor et al., 2001) y *TP53BP2* que juega un rol central en la regulación de la apoptosis y crecimiento celular (Schiffler et al., 2009). Un reporte realizado sobre *TP53BP2* destaca que su alta expresión correlaciona con una supervivencia extendida libre de enfermedad en pacientes con CaMa. (Ma. B et al., 2005). Muy probablemente la amplificación de estos genes corresponda a una asociación de buen pronóstico para CaMa o para otros tipos de cáncer donde estén implicados.

En el subtipo TN, detectamos 11 genes específicos. Entre los genes con relación directa a CaMa se destacan los siguientes: *ABL2*, *C8ORF4*, *DAP3*, *RAB25*, *EIF4EBP1*, *RAD18*, *CLPTM1L* y *SKP2*.

ABL2 es un oncogen vinculado en procesos como crecimiento celular, supervivencia, remodelación del citoesqueleto, motilidad celular y endocitosis (Hu et al., 2005). Diversos artículos publicados concuerdan que la sobre-expresión de *ABL2* promueve la proliferación, invasión y agresividad de las células cancerosas en pacientes con CaMa (Henn et al., 2013; Srinivasan et al., 2011). Posiblemente la amplificación detectada en dicho gen, pueda estar reflejada en la sobre-expresión transcripcional en el tumor y por ende, ser un biomarcador de mal pronóstico. El gen *C8orf4* codifica para una proteína que funciona como un regulador positivo de la vía de señalización Wnt/beta-catenina. La expresión de este gen puede jugar un rol en la proliferación de



diversos tipos de cáncer incluyendo el de tiroides, mama y de malignidades hematológicas (Zhang et al., 2011; Yang et al., 2006). La amplificación de este oncogen encontrado en nuestro estudio, podría influenciar en la transformación fenotípica en las células epiteliales mamarias. *DAP3* es una proteína relacionada a la biogénesis y mantenimiento de los organelos. Por otra parte, *DAP3* se ha asociado con el desarrollo del cáncer, pero también se ha observado suprime a otros. En cuanto a CaMa, una baja expresión de los niveles de *DAP3* fue significativamente asociada con una recurrencia focal, metástasis a distancia y mortalidad (Wazir et al., 2012). Probablemente la amplificación encontrada en *DAP3* en nuestras pacientes, sea un posible biomarcador de buen pronóstico, ya que existen reportes acerca de la función pro-apoptótica de dicho gen (Wazir et al., 2012). *RAB25* codifica a una proteína que está involucrada en el tráfico de membrana y supervivencia celular. Este gen, dependiendo del contexto, parece funcionar como supresor de tumor u oncogén (Caswell et al., 2007). Un reporte realizado por Cheng et al., en 2010, sugieren que *RAB25* actúa a través de múltiples vías como la potenciación de la apoptosis y supresión de la angiogénesis en el subtipo TN. Dichos datos concuerdan con nuestro estudio, ya que se encontró una amplificación de dicho gen, específicamente en el subtipo TN, sugiriendo que probablemente *RAB25* represente un nuevo modulador negativo que pueda influenciar tanto la iniciación como la progresión del tumor. Por otra parte, *EIF4EBP1* es un represor del inicio de la traducción que regula la actividad de EIF4E por prevención de su ensamblaje hacia el complejo eIFAF (Pause et al., 1994). Un



estudio realizado destaca que la co-expresión de *EIFAEBP1* y *S6K2* independiente del estatus de la fosforilación y los niveles de proteínas a nivel citoplasmático, están asociadas con un mal pronóstico en pacientes con CaMa. A pesar que *EIFAEBP1* es un represor, su efecto negativo al estar sobre-expresado radica en interaccionar con los receptores hormonales y por ende, evita el efecto benéfico del tratamiento (Elin et al., 2015). En contraste con el reporte de Elin et al., en 2015, nuestro estudio no detectó la co-amplificación de los genes *EIF4EBP1* y *S6K2*, y tampoco se encontró en el subtipo Luminal. Podría ser, que la amplificación solamente de *EIFAEBP1* en el subtipo TN, también tenga un efecto negativo en respuesta al tratamiento, ya que se trata de uno de los principales efectores de la complejo mTOR. RAD18 es un ligasa que participa en la reparación del daño en el ADN por exposición a radiación UV (Ramusino et al., 2011). Los principales reportes mencionan relación a enfermedades como anemias, cáncer de pulmón y mama. Aunque son solamente mutaciones puntuales las que se destacan como las principales variantes genéticas implicadas (Shen et al., 2010). Los resultados obtenidos de nuestro estudio, destacan una amplificación de dicho gen en CaMa como nueva variante genética, muy probablemente como biomarcador de buen pronóstico, ya que su función reparadora del ADN ayude a contrarrestar los efectos negativos de las células tumorales. *CLPTM1L* codifica a una proteína de membrana, cuya sobre-expresión en células sensibles a cisplatino causa apoptosis. (Yamamoto et al., 2001). Mutaciones puntuales en este gen, han sido reportadas en un incremento a la susceptibilidad a diversos tipos de



cáncer, incluyendo pulmón, páncreas y mama. (James et al., 2014; Wolpin et al., 2014; Haiman et al., 2011). La amplificación génica obtenida en nuestro estudio, concuerda parcialmente con un reporte (Haiman et al., 2011) que menciona una sobre-expresión de *CLPTM1L* en el subtipo TN, lo que podría sugerir un biomarcador de buen pronóstico específico del subtipo TN, ya que es posible que la sobre-expresión a nivel transcripcional induzca apoptosis en las células tumorales al estar expuestas a cisplatino. *SKP2* es un oncogén perteneciente a la familia F-box, usualmente involucrado en la patogénesis de linfomas y carcinomas (Larsson et al., 2003; Zuo et al., 2007). En lo que respecta al CaMa existen reportes donde mencionan que la sobre-expresión de *SKP2* está asociada a un mal pronóstico para CaMa, ya que contribuye a la resistencia de la quimioterapia en los pacientes (Davidovich et al., 2008). Posiblemente la amplificación de *SKP2* se vea reflejada a nivel transcripcional y pueda ejercer un efecto negativo a las pacientes con el subtipo TN, ya que hasta el momento es el tratamiento de elección para dicho subtipo de cáncer.

También encontramos genes que no presentaron una relación directa con el CaMa pero sí, con otros tipos de cáncer, por ejemplo: *RAB2* es un oncogén involucrado en la fusión y tráfico vesicular. Hasta el momento no existen reportes asociándole con CaMa y tampoco con algún otro tipo de cáncer. *RHOU* es un gen que regula los efectos de la vía de señalización WNT1 en la morfología, organización del citoesqueleto y proliferación celular. Al igual que *RAB2*, no existen reportes que indiquen una vinculación directa con CaMa, pero



sí, con otros tipos de cáncer. (Stacey et al., 2008). *RASA2* es un regulador inhibitorio de la vía cíclica AMP-RAS. Es decir actúa como un supresor de la función RAS. No existen alteraciones reportadas asociadas con CaMa, pero sí, con otros tipos de cáncer como cáncer de próstata y de pulmón (Kong et al., 2010; Shim et al., 2010).

Las amplificaciones de los genes *RAB2* y *RHOU* detectadas en nuestro estudio, podrían ser la primera vinculación de la alteración de estos genes con su asociación a CaMa. Ya que se trata de posibles oncogenes, que son imprescindibles para su selección como posibles biomarcadores de mal pronóstico para CaMa. Así como también, la amplificación encontrada en nuestro estudio de *RASA2* sea un posible biomarcador de buen pronóstico para las pacientes con CaMa, por su efecto inhibitorio sobre la vía RAS.

En el subtipo Luminal encontramos 25 genes potenciales específicos en nuestras pacientes. De los cuales *RECQLA*, *PVT1*, *LSM1*, *TRPS1*, *WISP1*, *EBAG9*, *HMGA2*, *LASP1*, *MMP16*, *NOV* y *PTK2*, presentaron una relación directa a CaMa, lo que denota su implicación al inicio y/o progresión tumoral. *RECQL4* es un gen que codifica a una helicasa involucrada en la modulación de la segregación cromosómica (Yin et al., 2004). La alta expresión de *RECQL4* está asociado con mal pronóstico y una alta concentración de pCR (proteína C Reactiva) después del tratamiento con taxano/antraciclina en pacientes de CaMa, con tumores RE+ y HER-2 + y TN, ya que disminuye la sensibilidad ante la quimioterapia (Libero et al., 2013). El reporte anterior,



contrasta con nuestras observaciones acerca de *RECQL4*, debido a que la amplificación génica y posible sobre-expresión sólo fue encontrada en pacientes con subtipo Luminal. *PVT1* codifica a un ARN no codificante y el incremento en el número de copias de este gen se ha asociado con muchos tipos de cáncer, incluyendo mama, ovario, leucemia y linfoma de Hodgkin (Carramusa et al., 2007). En el 2007, un reporte (Guan et al.) sugiere que *PVT1* regula la inhibición de la apoptosis, lo que podría explicar por qué la amplificación en 8q24 está asociada con una supervivencia reducida en pacientes durante el tratamiento con agentes que actúan sobre los mecanismos apoptóticos. La amplificación encontrada en *PVT1*, es de gran probabilidad que se encuentre sobre-expresado y por lo tanto, contribuya de manera negativa en la respuesta esperada del paciente al tratamiento. *LSM1* un gen que tiene un rol en la degradación de ARNm de histonas dependiente de la replicación (Mullen et al., 2008). Existen reportes que un aumento en la expresión participa en la transformación celular y la progresión de diversas malignidades, incluyendo cáncer de pulmón, mesotelioma y cáncer de mama (Takahashi et al., 2002). Por lo que, la amplificación de dicho gen es posible que sea un factor de mal pronóstico, ya que su posible sobre-expresión, como también lo reporta (Streicher et al., 2007) induce una proliferación celular independiente de factores de crecimiento. *TRPS1* codifica a un factor de transcripción que reprime los genes regulados por factores de transcripción *GATA*; regula además la proliferación y diferenciación de condrocitos. (Kaiser et al., 2003). Un reporte demostró que *TRPS1* promueve la angiogénesis en CaMa, ya que



induce un aumento significativo del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA, por sus siglas inglés, vascular endothelial growth factor A) en líneas celulares de CaMa (Hu et al., 2014). La alteración encontrada en *TRPS1* (amplificación) en las pacientes con CaMa, es indicativo de un aumento en la progresión del cáncer en las pacientes, ya que potencia la estimulación de la angiogénesis. *WISP1* es un gen que pertenece a la familia de factores de crecimiento de tejido (CTGF, por sus siglas en inglés, connective tissue growth factor), el cual se expresa en altos niveles en células del fibroblasto y se sobre-expresa en tumores de colon. *WISP1* atenúa la apoptosis mediada por *p53* en respuesta a daño en el ADN a través de la activación de AKT. La amplificación en *WISP1* obtenida en nuestro estudio, concuerda con un reporte realizado en relación a CaMa, ya que se ha encontrado una alta asociación a la transformación oncogénica al inhibir a células del sistema inmune (Klinke et al., 2014). *EBAG9* codifica para una proteína que es un antígeno asociado a tumor, que se expresa con alta frecuencia en varios tipos de cáncer. Existen reportes sobre que una sobre-expresión de *EBAG9* en CaMa se asocia con la progresión (Rousseau et al., 2002) e inmunoreactividad en pacientes tratadas con tamoxifeno (Ijichi et al., 2013). Por lo anterior, la ganancia en el número de copias de *EBAG9* en nuestro estudio, podría considerarse un marcador de mal pronóstico para las pacientes, ya que muy probablemente exista una sobre-expresión a nivel transcripcional. *HMGA2* es una proteína que contiene dominios de unión al ADN y puede actuar como un regulador transcripcional (Tessari et al., 2003). Además tiene un efecto negativo en pacientes con CaMa,



ya que la sobre-expresión del gen *HMGA2* tiene asociación significativa de invasividad (Fabjani et al., 2005) y es un marcador de mal pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad (Langelotz et al., 2003). Esto concuerda con nuestras observaciones en dicho gen, ya que la amplificación detectada podría repercutir en la sobre-expresión de un posible gen sensible a dosis. *LASP1* codifica a una proteína que ha sido vinculada a metástasis en cáncer de mama, tumores hematopoyéticos, linfomas de células B y cáncer colo-rectal. (Tomasetto et al., 1995), ya que tiene como función, la regulación dinámica de la actina en el citoesqueleto. Existen diversos estudios que han demostrado la amplificación y sobre-expresión del gen *LASP1* en pacientes con CaMa, lo que concuerda con la amplificación detectada por nuestro estudio, indicando la asociación de este gen con un mal pronóstico, debido a que potencia la proliferación y migración de las células tumorales (Frietsch et al., 2010). *MMP16* es una proteína de la familia de las proteinasas involucradas en la ruptura de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, tales como desarrollo embrionario, reproducción y remodelación de tejidos, así como también en procesos como artritis y metástasis (Lida et al., 2001). La alteración detectada en ganancia en el número de copias de este gen, es muy probable que repercuta en una expresión alta a nivel transcripcional, lo que sea indicativo de mal pronóstico en pacientes con CaMa. Ya que existen reportes que la sobre-expresión de dicho gen contribuye a la diseminación e implantación de las células tumorales (Lafleur et al., 2005).



NOV es un gen que codifica para una pequeña proteína rica en cisteína, asociada con la matriz extracelular y juega un rol importante en el desarrollo cardiovascular y esquelético, fibrosis y cáncer (Lin et al., 2003). Presenta una relación directa con el CaMa, ya que se ha demostrado que estimula la diferenciación de los osteoclastos, para crear el ambiente propicio, a favor de la metástasis de CaMa a hueso (Ouellet et al., 2011). Por lo que, la amplificación detectada de *NOV* en nuestros pacientes, podría considerarse como otro indicador de mal pronóstico, ya que también se ha reportado asociación de este gen con resistencia a la terapia endocrina (Ghayad et al., 2009). *PTK2* codifica a una proteína tirosina-quinasa que tiene un rol clave en la migración celular y la motilidad. La sobre-expresión de *PTK2* se ha implicado en etapas pre-invasivas de adenocarcinoma ductal *in situ* que precede a invasión celular o metástasis (Lightfoot et al., 2004). Si bien, nuestro estudio está enfocado en adenocarcinoma ductal infiltrante, es altamente probable que la amplificación encontrada en nuestros pacientes con tumores primarios de CaMa, pueda ser indicativo de mal pronóstico.

Nuestro estudio detectó genes con alteración en ganancia en el número de copias, relacionadas positivamente con la represión del CaMa. Entre esos genes se destacan: *MTSS1*, *PRKDC*, *RAD54L* y *RNF139*. *MTSS1* está relacionado a la progresión de CaMa y/o metástasis tumoral en una variedad de órganos, probablemente a través de la interacción con la actina del citoesqueleto (Lee et al., 2002). Se realizó una evaluación (Parr et al., 2009) de



pacientes con CaMa que tuvieron un mal pronóstico al expresar niveles reducidos de *MTSS1* ($p=0.042$). La amplificación detectada de *MTSS1* en nuestro estudio, probablemente se correlacione con un incremento en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0.012$), como lo reportan (Parr et al., 2009). *PRKDC* es una proteína nuclear que funciona como un sensor de daño al ADN (Yavuzer et al., 1998). La amplificación de dicho gen en nuestro estudio, posiblemente corresponda a una sobre-expresión a nivel transcripcional y sea un marcador predictivo positivo en respuesta a radioterapia en pacientes con CaMa (Leifler et al., 2010). *RAD54L* proteína conocida por estar involucrada en la recombinación homóloga y reparación del ADN (Swagemakers et al., 1998). La delección en este gen, ha sido reportada con mal pronóstico para pacientes con CaMa (Lidereau et al., 1999). Nuestros resultados arrojan una amplificación de dicho gen, por lo que, se consideraría como elemento de buen pronóstico, ya que la sobre-expresión de este gen podría ayudar a compensar los daños al ADN en la célula tumoral. La amplificación de *RNF139* presente en nuestras pacientes, podría considerarse como biomarcador positivo, ya que su función como regulador negativo de la proliferación celular a través del mecanismo que involucra arresto celular en G2/M (Brauweiler et al., 2007), podría contribuir a disminuir su proliferación y por tanto la progresión a metástasis. Delecciones y translocaciones cromosómicas como variantes genéticas de mayor frecuencia en dicho gen, se han asociado a predisposición a carcinoma renal (Poland et al., 2007).



Para genes como *CTHRC1*, *BOP1*, *RRM2B* Y *TAF15*, los reportes hasta la fecha, no indican una asociación directa con CaMa, pero sí con otros tipos de cánceres. Indicando que podrían ser genes clave y/o conductores de importantes procesos celulares, además de reportarse por primera vez en nuestro estudio, su posible implicación a CaMa, como nuevos posibles biomarcadores para nuestra población de estudio. *CTHRC1* codifica a una proteína que puede jugar un rol en la respuesta celular, al daño arterial a través de la remodelación vascular; fue reportada con posible asociación en algunos tipos como cáncer colo-rectal, gástrico y pulmonar (Duarte et al., 2014). Resultados de la sobre-expresión del gen *CTHRC1* en pacientes con cáncer gástrico se asociaron con progresión y mal pronóstico (Gu et al., 2014). Probablemente la amplificación presentada en nuestros pacientes con CaMa, pueda ser indicativo de regulación positiva para la invasión y/o metástasis. *BOP1* es un gen requerido para la maduración de los ARNs ribosomales 28S y 5.8S. Hasta la fecha, no existe una implicación directa de alteración en *BOP1* con CaMa, pero sí con otros tipos de cánceres, entre los que destacan: cáncer de colon y de páncreas (Killian et al., 2006; Nakatsura et al., 2001). La amplificación de este gen igual que el gen *CTHRC1*, podría ser un biomarcador potencial asociado a CaMa, ya que los reportes anteriores donde lo asocian con otros tipos de cáncer, destacan que la sobre-expresión de *BOP1* afecta principalmente al gen *MYC* (Killian et al., 2006). *RRM2B* presenta un rol en la supervivencia celular mediante la reparación de daños al ADN dependiente de *P53* (Tanaka et al., 2000). La amplificación detectada encontrada en nuestro



estudio, concuerda con un estudio previamente donde se trató de demostrar la asociación entre la alteración en el número de copias de este gen y la sensibilidad a la quimioterapia en líneas celulares de cáncer (Jørgensen et al., 2013). *TAF15* codifica a un miembro de la familia TET, importante para el inicio de la transcripción, su amplificación podría considerarse un factor de mal pronóstico, debido a que se ha reportado sobre-expresión en algunos tipos de cáncer, como leucemia aguda y condrosarcoma (Schatz et al., 2010).

También fue posible la detección de genes alterados con roles importantes en rutas y/o vías celulares, hasta la fecha, sin ninguna implicación a CaMa, ni otros tipos de cáncer, lo que es indicativo de ser potenciales biomarcadores para el subtipo Luminal, lo que enriquecería aún más el entendimiento del mismo. Entre esos genes sobresalen *BAALC*, *BRPF1*, *RDM1*, *SCRT1* y *TCEB1*. *BAALC* juega un papel sináptico en las balsas lipídicas post-sinápticas mediante la interacción con *CAMK2A* (Tanner et al., 2001). Este gen fue observado sobre-expresado en pacientes con leucemia mieloide crónica, confiriendo un mal pronóstico. Hasta el momento no existe una relación directa con el CaMa, pero la amplificación encontrada de dicho gen en nuestro estudio, posiblemente tenga un efecto negativo en las pacientes con CaMa, ya que se tiene reportes de sobre-estimulación de la hematopoyesis (Chapelle et al., 2001). *BRPF1* forma parte de un complejo proteico con actividad acetil-transferasa, participa en funciones muy importantes como la expresión génica y organización de la cromatina. No hay reportes hasta la fecha que indiquen alteraciones en este



gen relacionado con CaMa y otros tipos de cáncer. Potencialmente, la amplificación de este gen revelada en nuestro estudio, se asocia con mal pronóstico para CaMa, debido a que regula positivamente la transcripción de *RUNX1* y *RUNX2* (oncogenes). *RDM1* codifica a una proteína involucrada en la respuesta celular a cisplatino, un fármaco comúnmente usado en quimioterapia (Hamimes et al., 2005). No hay reportes que indiquen alguna relación directa con el CaMa. Sin embargo, la presente amplificación de dicho gen, en nuestras pacientes de CaMa, podría servir como un potencial biomarcador de resistencia al tratamiento en quimioterapia. RP1 es una proteína asociada a microtúbulos que regula su estabilidad y su longitud en el proceso de la polimerización. La alteración en dicho gen está implicada en retinitis pigmentosa (Pierce et al., 1999). La amplificación encontrada en dicho gen no concuerda con ningún reporte que lo asocie a CaMa u otro tipo de cáncer. El gen *SCRT1* codifica para un represor transcripcional dedo de zinc, que promueve la diferenciación neuronal y está involucrado en varios tipos de cáncer con características neuro-endocrinas (Nakakura et al., 2001). Hasta la fecha, no hay datos que involucren alteraciones de este gen en CaMa. Posiblemente la amplificación encontrada, contribuya en atenuar el desarrollo del cáncer debido a su efecto represor transcripcional, ya que presenta motivos de unión al ADN (Bastid et al., 2010). *TCEB1* es un gen que codifica a la proteína elongina C, el cual es una subunidad del complejo proteico factor de transcripción B. La sobre-expresión de este gen, se ha reportado en estudios relacionados con cáncer renal y de próstata, entre otros. Es posible que se



considere un biomarcador de mal pronóstico, para CaMa, ya que la amplificación encontrada en nuestros pacientes se vea reflejada con un incremento en la expresión a nivel transcripcional.

También fue de nuestro interés conocer aquellos genes compartidos entre subtipos de cáncer, para denotar alguna posible relación que permitan dilucidar aquellas similitudes o diferencias y la implicación en la biología tumoral.

En el presente estudio, encontramos cuatro genes en común entre los subtipos Luminal y HER-2. De ellos, 3 genes compartidos entre dichos subtipos, concuerdan con la literatura. *THRA*, *GRB7* y *ERBB2*, son los genes que se reportan estar alterados en más de un subtipo (Luminal y HER-2); están relacionados en vías importantes como transcripción (Borngraeber et al., 2003), señalización de factores de crecimiento epidérmico y regulación de la transcripción (Han et al., 2000; Xiang et al., 2008), respectivamente. Lo que concuerda, también con las vías en común entre dichos subtipos, detectadas en Gene Ontology (GO). Esto demuestra parcialmente que la expresión de HER-2 (*ERBB2*) no es específico del subtipo HER-2, sino también que el subtipo Luminal lo puede expresar, lo que podría impactar de manera notoria en la eficacia del tratamiento, para personas con ese subtipo de CaMa. El gen *AATF* se ha reportado como regulador negativo para el receptor de estrógenos en el subtipo Luminal.

Nuestros resultados también mostraron la alteración de los genes *WHSC1L1* y *FGFR1* en común subtipos Luminal y TN. *WHSC1L1* es una proteína que metila



a la H3 (histona 3), por lo que se considera un represor transcripcional. Se encuentra amplificado en CaMa, aproximadamente en un 15% (Yang Z. et al., 2010). No es específico de subtipo, por lo que concuerda parcialmente con nuestros datos, ya que se encontró afectado en Luminal y HER-2. FGFR1 es una molécula de señalización mitogénica que tiene roles en angiogénesis, migración celular, desarrollo embrionario y neuronal (Zhang et al., 2006). Existe un reporte, que destaca una alta asociación para el subtipo TN (Pintens et al., 2009). Al igual que el gen *WHSC1L1*, hay una concordancia parcial con nuestros resultados obtenidos, ya que su amplificación se detectó tanto en TN como Luminal.

Los genes *MN1* y *ERCC2* fueron detectados en común entre los subtipos HER-2 y TN. *MN1* es una proteína que juega un rol en la supresión de tumor. No existen reportes, que involucren en la biología tumoral del CaMa, pero sí, de otros tipos como leucemia y cáncer de próstata (Tao et al., 2012; Langer et al., 2009). *ERCC2* está implicada en el mecanismo de reparación del ADN, además presenta un rol en el proceso del envejecimiento y posible asociación en la generación de cáncer de piel (Sung et al., 1993). Algunos estudios han destacado que mutaciones puntuales en dicho gen, tienen una asociación directa con CaMa (Mojzis et al., 2008; Yan et al., 2005). Esto concuerda con nuestros datos, ya que la alteración en *ERCC2* se detectó en HER-2 y TN. La amplificación encontrada en dichos genes, podría ser indicativa de buen pronóstico para aquellos pacientes que tengan ganancia en el número de



copias, como un mecanismo de respuesta a la invasión celular (Tao et al., 2012; Sung et al., 1993).

En cuanto al análisis integral de datos clínico-patológicos y de genes potencialmente candidatos, no se encontró asociación significativa, en la menarquía, menopausia y edad, posiblemente debido a la ausencia de algunos datos clínicos relacionados y al número de muestras estudiadas.



Capítulo X

Conclusiones

- Las ganancias amplias fueron las CNA más frecuentes en los subtipos de cáncer.
- El subtipo de cáncer HER-2 fue el que presentó mayor número de alteraciones amplias en genes duplicados respecto a los otros subtipos.
- Las vías afectadas Notch, Jak/Stat, replicación ADN, apoptosis fueron específicas del subtipo HER-2.
- La vía afectada RAS fue específica del subtipo TN.
- Las vías afectadas de angiogénesis, EGF y FGF fueron comunes entre los tres subtipos de cáncer. (Luminal, HER-2 y Triple negativo)
- Se detectaron 25 genes específicos potenciales para el subtipo Luminal, 10 para HER-2 y 11 para TN implicados en procesos celulares importantes en acuerdo con la hipótesis.
- No se encontró correlación entre la menarquía, menopausia y edad con los subtipos de cáncer.



Capítulo XI

Perspectivas

- Ampliar el número de pacientes.
- Realizar microarreglos de expresión, para corroborar que las CNA corresponden a una expresión diferencial.
- Validar los genes diferencialmente expresados por qPCR.
- Validación de un potencial biomarcador.



Capítulo XII

Bibliografías

Agarwai T, et al. Core biopsy versus FNAC for palpable breast cancers. Is image guidance necessary? *Eur J Cancer* 2003;52-56

Albain KS, et al. Prediction of adjuvant chemotherapy benefit in endocrine responsive, early breast cancer using multigene assays. *Breast*, 2009;S141-S145

Allison W., et al. Chromosomal copy number alterations for associations of ductal carcinoma in situ with invasive breast cancer. 2015. *Breast Cancer Research*.17:108.

Al-Kuraya, K., et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. 2004. *Cancer Res*.64, 8534–8540.

Alpana Ray., et al. Induction of Ras by SAF-1/MAZ through a feed-forward loop promotes angiogenesis in breast cancer. 2014. *Cancer Medicine*. 4(2):224–234.

AJCC Cancer Staging Manual. Seventh ed. 2009; 419-460

Akhavantabasi S., et al. USP32 is an active, membrane-bound ubiquitin protease overexpressed in breast cancers. 2010. *Mamm. Genome*.

Arend Sidow . Genome evolution during progression to breast cancer. 2013. *Genome Research*. 1088-9051/13

A. Shlien, et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2008;11264–11269

A. Shlien, et al. Copy number variations and cancer, *Genome Med*, 2009

Bartelink H. Post-Mastectomy radiotherapy. Recommended standards. *Ann Oncol*. 2000; 7-11

Bastid J1., et al. The SNAIL family member SCRATCH1 is not expressed in human tumors. *Oncol Rep*. 2010 Feb;23(2):523-9 Bastien RR, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics*. 2012;44.



Brauweiler A., et al. RING-dependent tumor suppression and G2/M arrest induced by the TRC8 hereditary kidney cancer gene. *Oncogene*. 2007. 26:2263-2271

Borngraeber S., et al. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. 100:15358-15363

Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, et al. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology*. 2004;830-849

Bustamante Javier., et al. Evaluation of Two Methods DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues on Non-Optimal Conditions. 2011. *Scielo*. vol.16 no.2

Cantor S.B., et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. 2001. *Cell*

Carlos C. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. 2016. *Nature communications*. 7:11479

Cicenas J., et al. Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. 2005. *Breast Cancer Res.*

Caswell P.T., et al. Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. 2007. *Dev. Cell*

C. Curtis, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 2012;346–352.

Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario, Secretaria de Salud., 2015.

Charles D., et al. Mutated Pathways as a Guide to Adjuvant Therapy Treatments for Breast Cancer. 2016. *Mol Cancer Ther*; 15(1).

Cheng J.M., et al. Tumor suppressor function of Rab25 in triple-negative breast cancer. 2010. *Int. J. Cancer*



Cutuli B., et al. Breastconserving surgery with or without radiotherapy vs mastectomy for ductal carcinoma in situ: French survey experience. *Br J Cancer*. 2009;1048-1054

Crump M, et al. An individual patient based meta-analysis of tamoxifén versus ovarian ablation as first line endocrine therapy for premenopausal women with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1997;201-210

Geyer CE, et al. Lapatinib plus Capecitabine for HER.-2 positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2006; 355

Gersen SL, et al. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 3th Ed. Springer Science; 2013.

Gil-Henn H., et al. Arg/Abl2 promotes invasion and attenuates proliferation of breast cancer in vivo. 2013. Oncogene.

Ghayad S.E., et al. J. Identification of TACC1, NOV, and PTTG1 as new candidate genes associated with endocrine therapy resistance in breast cancer. 2009. *Mol. Endocrinol. function. Exp. Cell Res*. 2009. 315:1273-1286

G. Jönsson, J, et al. Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics, *Breast Cancer* ,2010;42.

Goldhirsch A, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*. 2009;1319-1329

Gutiérrez RL, et al. High cancer yield and positive predictive value: outcomes at a center routinely using preoperative breast MRI for staging. *Am J Roentgenol*. 2011; 93-99

Dahabreh IA, et al. Trastuzumab in the adjuvant treatment of earlystage breast cancer: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Oncologist*. 2008;620-630

Damiani D. et al. BAALC overexpression retains its negative prognostic role across all cytogenetic risk groups in acute myeloid leukemia patients. *Am J Hematol*. 2013 Oct;88(10):848-52.

Davidovich S., et al. Over-expression of Skp2 is associated with resistance to preoperative doxorubicin-based chemotherapy in primary breast cancer. 2008. Breast Cancer Res.



Dasgupta S., et al. Prenylated **c17orf37** induces filopodia formation to promote cell migration and metastasis. 2011. *J. Biol. Chem.*

Degot S., et al. Association of the breast cancer protein MLN51 with the exon junction complex via its speckle localizer and RNA binding module. 2004. *J. Biol. Chem.*

D.G. Albertson, et al. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat. Genet*, 2003; 370–376.

Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud. RHNM ,2003.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. 2005. *Lancet*;1687-1717

Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group. Effects of radiotherapy in early breast cancer. *Oncogüía: Cáncer de Mama An overview of the randomized trials. N Engl J Med.* 1995;1444-1445

Elin K., et al. Revealing Different Roles of the mTOR-Targets S6K1 and S6K2 in Breast Cancer by Expression Profiling and Structural Analysis. 2015. *Plos one.*

Ellis MJ, et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1-and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2001; 19

Evans E.E., et al. C35 (**C17orf37**) is a novel tumor biomarker abundantly expressed in breast cancer. 2006. *Mol. Cancer Ther.*

Fridlyand J., et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. 2006. *Cancer Cell*;10:529e541121. Tamar G. Proteomic maps of breast cancer subtypes. 2016. *Nature communications.* 10.1038.

Fabrice A., et al. Molecular biology in breast cancer: Should molecular classifiers be assessed by conventional tools or by gene expression arrays?. 2012. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 84. e58–e69



Fabjani G., et al. HMGA2 is associated with invasiveness but not a suitable marker for the detection of circulating tumor cells in breast cancer. 2005. *Oncol. Rep.*

Fisher B, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 12334

Francesc Solé., et al. Are ER+ PR+ and ER+ PR- breast tumors genetically different? A CGH array study *Cancer* 2012. *Genetics* 205 138-146.

Frietsch J., et al. Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long-term survival in female breast cancer. 2010 *Br. J. Cancer.*

F. Zhang, et al. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2009;451–481.

Iida J., et al. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *J. Biol. Chem.* 2001. 276:18786-18794

Ijichi N., et al. Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Clin. Breast Cancer* 2013

Ionita-Laza I, et al. Genetic association analysis of copy number Variation (CNVs) in human disease pathogenesis. *Genomics* 2009; 22–26.

James M.A., et al. CRR9/CLPTM1L regulates cell survival signaling and is required for Ras transformation and lung tumorigenesis. 2014. Cancer Res 5.-

Jobert L., et al. PRMT1 mediated methylation of TAF15 is required for its positive gene regulatory

Jorgensen CL1., et al. Gene aberrations of RRM1 and RRM2B and outcome of advanced breast cancer after treatment with docetaxel with or without gemcitabine. *BMC Cancer.* 2013 Nov 12;13:541.

Haiman C.A., et al. A common variant at the TERT-CLPTM1L locus is associated with estrogen receptor-negative breast cancer. 2011. *Nat. Genet.*



Hamimes S., et al. RDM1, a novel RNA recognition motif (RRM)-containing protein involved in the cell response to cisplatin in vertebrates. *J. Biol. Chem.* 2005. 280:9225-9235

Han D.C., et al. Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration. *J. Biol. Chem.* 2000. 275:28911-28917

Henrichsen C, et al. Copy number variants, diseases and gene expression. *Human Molecular Genetics* 2009;1-8.

He Y, et al. Copy Number Variants in pharmacogenetic genes. *Trends Mol Med* , 2011; 244–251.

Hu H., et al. RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration. 2005. Curr. Biol.

Hu J., et al. TRPS1 expression promotes angiogenesis and affects VEGFA expression in breast cancer. [Exp Biol Med \(Maywood\)](#). 2014 Apr;239(4):423-9.

K.A. Kwei, et al. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications, *Mol. Oncol*, 2010; 255–266

Kaiser F.J., et al. The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:38780-38785.

Killian A., et al. Contribution of the BOP1 gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006

Klinke DJ., et al. Induction of Wnt-inducible signaling protein-1 correlates with invasive breast cancer oncogenesis and reduced type 1 cell-mediated cytotoxic immunity: a retrospective study. *PLoS Comput Biol.* 2014 Jan;10(1):e1003409.

Klinj JG, Blamey RW, Boccardo F, et al. Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol.* 2001;343-353



Kim D.H., et al. The IFNG (IFN-gamma) genotype predicts cytogenetic and molecular response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. 2010. *Clin. Cancer Res.*

Kong Z., et al. Downregulation of human DAB2IP gene expression in prostate cancer cells results in resistance to ionizing radiation. 2010. *Cancer Res*

Kostadima L., et al. *The missing kiss of life: transcriptional activity of the metastasis suppressor gene KiSS1 in early breast cancer.* 2007. *Anticancer Res*

KrA1ger K., et al. *Activated T lymphocytes bind in situ to stromal tissue of colon carcinoma but lack adhesion to tumor cells.* 2001. *Eur. J. Immunol.*

Krebs informations dienst (KID). *Brustkrebs: Informationen für Patientinnen, Angehörige und Interessierte,* 2012.

Lafleur MA., et al. Upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer xenografts: a major induction of stromal MMP-13. *Int J Cancer.* 2005 Apr 20;114(4):544-54.

Langelotz C., et al. Expression of high-mobility-group-protein HMGI-C mRNA in the peripheral blood is an independent poor prognostic indicator for survival in metastatic breast cancer. 2003 *Br. J. Cancer.*

Langer C., et al. Prognostic importance of MN1 transcript levels, and biologic insights from MN1-associated gene and microRNA expression signatures in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. 2009. *J. Clin. Oncol.*

Latta EK., et al. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. 2002. *Mod Pathol.*15:1318–25.

Larsson L.G., et al. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. 2003. *Mol. Cell.*

Lee YL., et al. Multiplex sequencing of paired-end ditags (MS-PET): a strategy for the ultra-high-throughput analysis of transcriptomes and genomes. 2006. *Nucleic Acids Res*34:e84.



Lightfoot H.M., et al. Upregulation of focal adhesion kinase (FAK) expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) is an early event in breast tumorigenesis. 2004. *Breast Cancer Res*.

Lidereau R., et al. Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer. 1999. *Genes Chromosomes*.

Lin C.G., et al. CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. *J. Biol. Chem.* 2003. 278:24200-24208

Luini A, Rososchansky J, Gatti G, et al. The surgical margin status after breast-conserving surgery: discussion of an open issue. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 397-402

Ma B., et al. The contribution of the Trp/Met/Phe residues to physical interactions of p53 with cellular proteins. 2005. *Phys Biol* Marilyn Rosa, MD. *Advances in the Molecular Analysis of Breast Cancer: Pathway Toward Personalized Medicine.* *Cancer Control*, 2015; 211-215.

Mauri D, et al. Multiple treatment meta-analysis of chemotherapy and targeted therapies in advanced breast cancer. *Eur J Cancer.* 2009; 2749-2758

M.R. Stratton, et al. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 2008; 17-22.

Miller K, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2007; 2666-2677

Mills RY, et al. Mapping copy number variation by population scale genome sequencing. *Nature* 2011; 59-65.

Mouridsen HT, et al. Aromatase inhibitors in advanced breast cancer. *Semin Oncol.* 2004; 3-8

Mojzis J., et al. Polymorphisms of the XRCC1 and XPD genes and breast cancer risk: a case-control study 2008. *Pathol. Oncol.*

Mu XJ, et al. Analysis of genomic variation in non-coding elements using population-scale sequencing data from the 1000 Genomes Project. *Nucleic Acids Research*, 2011; 7058-7076.

Nakatsura T., et al. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys.* 2001.



Nakakura E.K., et al. Mammalian scratch: a neural-specific snail family transcriptional repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. 98:4010-4015

Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*, 2006; 2463-2472

Qiao Y, et al. miRNA and miRNA target genes in copy number variations occurring in individuals with intellectual disability. *BMC Genomics* 2013; 544-554.

Quellet V., et al. CCN3 impairs osteoblast and stimulates osteoclast differentiation to favor breast cancer metastasis to bone. 2011. *Am. J. Pathol.*

Quintana M., et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. 2001. *Science*.

Pan F., et al. Prognostic and clinicopathological significance of microRNA-21 overexpression in breast cancer: a meta-analysis. 2014. *Int J Clin Exp Pathol*.

Pediconi F, et al. Role of breast MR imaging for predicting malignancy of histologically borderline lesions diagnosed at core needle biopsy: prospective evaluation. *Radiology*. 2010; 653-661

Pierce E.A., et al. Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1991. 22:248-254

Pintens S., et al. Triple negative breast cancer: a study from the point of view of basal CK5/6 and HER-1. 2009. *J. Clin. Pathol.*

P.M. Haverty, et al. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors, *Genes Chromosomes Cancer*, 2008; 530–542

Perou CM, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 747-752
Pérez VM, et al. Diagnóstico histopatológico y factores pronósticos en cancer infiltrante de la glándula mamaria. *Cancerología* 3, 2008; 7-17

Poland K.S., et al. A constitutional balanced t(3;8)(p14;q24.1) translocation results in disruption of the TRC8 gene and predisposition to clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2007. *Genes Chromosomes*.



Porkka K., et al. Amplification and overexpression of Elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays. 2002. *Lab. Invest.*

Primera reunión sobre tratamiento médico del cáncer mamario. GAMO. 2007; 6:

Riemsma R, et al. Systematic review of aromatase inhibitors in the first-line treatment for hormone sensitive advanced or metastatic breast cancer. *Breast Can Res Treat.* 2010; 9-24

Rojas A, et al. Recursos terapéuticos y medicina genómica. 2011; 4-6

Rousseau J., et al. RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. *Biochem. Biophys.* 2002. 293:1544-1549.

Rousseau J., et al. RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. 2002. *Biochem. Biophys.*

Schiffler H., et al. The DEAD box protein Ddx42p modulates the function of ASPP2, a stimulator of apoptosis. 2009. Oncogene.

Schatz N., et al. Diagnostic and therapeutic potential of a human antibody cloned from a cancer patient that binds to a tumor-specific variant of transcription factor TAF15. 2010. *Cancer Res*

Sinn P, et al. Multigene assays for classification, prognosis, and prediction in breast cancer: a critical review on the background and clinical utility. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2013;932-940

Sharma M1., et al. Apoptosis-antagonizing transcription factor (AATF) gene silencing: role in induction of apoptosis and down-regulation of estrogen receptor in breast cancer cells. *Biotechnol Lett.* 2013 Oct;35(10):1561-70.

Shim J.H, et al. 2010. Epigallocatechin gallate suppresses lung cancer cell growth through Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1. Cancer Prev Res (Phila)

Slamon DJ, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER 2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER. *N Engl J Med.* 2001;783-792



Slodkowska EA, et al. MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;417-422

Shen J., et al. Multiple genetic variants in telomere pathway genes and breast cancer risk. 2010. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*

Sobreira N, et al. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. *Genome Research* 2011;1720-1727.

Somyajit K., et al. Distinct roles of FANCO/RAD51C protein in DNA damage signaling and repair: implications for Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. 2012. *J. Biol. Chem.*

Sørli T, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 10869-10874.

S.P. Shah, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers, *Nature*, 2012;395–399.

Stacey S.N., et al. Germline sequence variants in TGM3 and RGS22 confer risk of basal cell carcinoma. *Hum. 2014 Mol. Genet.*

Srinivasan D., et al. Reciprocal regulation of Abl and receptor tyrosine kinases. 2009. *Cell. Signal.*

Sung P., et al. ERCC2 Human Xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature.* 1993. 365:852-855.

Swagemakers S.M.A., et al. The human RAD54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. *J. Biol. Chem.* 1998. 273:28292-28297.

Theisen A, et al. Disorders caused by chromosome abnormalities. *The Application of Clinical Genetics* 2010;159–174.

Rameen B., et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. 2010. *Nature.* 463(7283).



Ramusino C., et al. A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling. *2011. Science*

Tanaka H., et al. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000. 404:42-49

Tanner S.M., et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 98:13901-13906.

Tao S., et al. A genome-wide search for loci interacting with known prostate cancer risk-associated genetic variants. *2012. Carcinogenesis*

Tessari M.A., et al. Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2. *Mol. Cell. Biol.* 2003.23:9104-9116

Tomasetto C.L., et al. Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *1995. Genomics* 28:367-376

Tong Y., et al. Metastasis suppressors Nm23H1 and Nm23H2 differentially regulate neoplastic transformation and tumorigenesis. *2015. Cancer Lett.*

T.L. Naylor, et al. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization, *Breast Cancer Res.*, 2005; 1186–119

Tsuneizumi M., et al. Overrepresentation of the EBAG9 gene at 8q23 associated with early-stage breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 2001

T. Walsh, et al. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell*, 2007;103–105.

Van Binsbergen E, et al. Origins and Breakpoint Analyses of Copy Number Variations: Up Close and Personal. *Cytogenet Genome Res* 2011; 271-276.

Veronesi U, et al. Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomized trial among hysterectomised women. *Lancet.* 1998;93-97



Veronesi U, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 1227

Veronesi U, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003;546-553

Wazir U., et al. The mRNA expression of DAP3 in human breast cancer: correlation with clinicopathological parameters. 2012. *Anticancer Res* 147.

Wholpin B.M., et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pancreatic cancer. 2014. *Nat. Genet.*

Wright Gl., et al. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. 2008. *FASEB J.* 22:3264-3275

Wu Y, et al. Molecular classification and testing of breast carcinoma. 2014; 1337-1342.137. Walker M.G., et al. Prediction of gene function by genome-scale expression analysis: prostate cancer-associated genes. 1999. *Genome Res*

Wu Y., et al. hSWS1.SWSAP1 is an evolutionarily conserved complex required for efficient homologous recombination repair. 2011. *J. Biol. Chem.* 286:41758-41766

Xiang B., et al. Brk is coamplified with ErbB2 to promote proliferation in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. 105:12463-12468

Xu L., et al. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev.* 2000; 14:585-595.

Yamamoto K., et al. A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. 2001. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Yang Z.Q., et al. Multiple interacting oncogenes on the 8p11-p12 amplicon in human breast cancer. 2006. *Cancer Res.*

Yang Z.Q., et al. Transforming properties of 8p11-12 amplified genes in human breast cancer. 2010. *Cancer Res*

Zhang L., et al. Single nucleotide polymorphisms for DNA repair genes in breast cancer patients. 2005. *Clin. Chim.*



Zhang X., et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* 2006. 281:15694-15700.

Zhang J., et al. Investigation of copy-number variations of C8orf4 in hematological malignancies. 2011. *Med. Oncol.*

Zuo T., et al. FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP22007. *J. Clin. Invest.*



Capítulo XIII

Anexos

Anexo 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio	“Análisis de alteraciones genómicas focales y amplias en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante”
Nombre del Investigador Principal	Carlos Córdova Fletes
Institución	“Hospital Universitario “ Dr. José E. González “
Servicio/Departamento	Departamento de Patología
Teléfono de Contacto	(81) 8305 5900
Nombre del Investigador Asociado	Dra. med. Raquel García Guajardo
Institución	Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León”
Servicio/Departamento	Bioquímica y Medicina Molecular
Teléfono de Contacto	(81) 83294173/4 ext. 2580
Persona de Contacto	8115089539

Esta forma de consentimiento informado puede contener palabras que usted no entienda. Por favor pídale a su médico del estudio o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara.

Su participación en este estudio es voluntaria. Es importante que lea y entienda la siguiente explicación de los procedimientos propuestos. Este documento describe el propósito, los procedimientos, beneficios, riesgos conocidos,



molestias, precauciones del estudio incluyendo la duración y la naturaleza de su participación.

También describe las terapias o tratamientos alternativos conocidas que pueden estar disponibles y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. No se pueden dar garantías respecto a los resultados del estudio de investigación.

Para ingresar al estudio, Usted como sujeto debe de firmar y fechar este documento con la presencia de dos testigos y finalmente recibirá una copia del mismo.

1.- PROPOSITO DEL ESTUDIO

El propósito de este estudio será analizar el material genético de tumores malignos mamarios de mujeres mexicanas, para buscar las posibles causas de los tumores e intentar hacer una herramienta de apoyo diagnóstico para nuevas pacientes, al cual Ud. está siendo invitada a participar. El material genético del tumor de mama de Ud. será comparado contra el material genético de su sangre venosa (del brazo), es decir, Ud., y cada paciente serán su propio control.

2.- CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

El médico del estudio verificará que Usted cumpla con los siguientes requisitos antes de considerar su ingreso al estudio de investigación.



1. Que tenga 18 años de edad o más.
2. Que sean candidata para biopsia de tumor mamario maligno y que pueda donar 2 mL de sangre periférica (venosa, del brazo).
3. Que sea mexicana (de cualquier parte de la República).
4. Que cuente con los siguientes datos registrados a la hora de la biopsia, edad, peso, índice de masa corporal (IMC), consumo de hormonas, consumo de alcohol, estadio pre-y postmenopáusico previo a la firma de este consentimiento informado.
5. Si no cuenta con la información mencionada arriba o que las muestras de material genético se encuentren en mal estado para su estudio, o que Ud. quiera retirar sus muestras del estudio, estas serán excluidas de este proyecto.

3.- MEDICAMENTO/DISPOSITIVO DE ESTUDIO

En este estudio Usted No recibirá un medicamento o dispositivo de estudio.

4.- PROCEDIMIENTOS

Se le realizará una toma de muestra única de su tumor, la cual será obtenida por el médico tratante a través de las tomas de biopsias de rutina. El médico tratante dará una porción de dicha biopsia que será utilizada para este estudio al que está Ud. siendo invitada. Además, el médico tratante en coordinación con enfermería, le tomarán muestra de 2.0 mL de sangre periférica (venosa, del brazo), la cual nos dará para el estudio.

5.- TERAPIAS ALTERNATIVOS



En este estudio no se ofrece alguna terapia alternativa a la que recibe/recibirá.

6.- RIESGOS Y MOLESTIAS

Se me ha explicado que mi participación consistirá en dar sólo una muestra de 2.0 ml de sangre del brazo que se usará para los análisis del presente estudio. Declaro que el investigador o el médico genetista responsables me han informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: el procedimiento antes mencionado puede implicar alguna molestia en el sitio de la punción, sin otros riesgos mayores a un moretón, enrojecimiento en el área de punción, o un poco de comezón. La muestra de biopsia es de rutina para el servicio de oncología.

7.- POSIBLES BENEFICIOS

Usted puede verse beneficiado por su participación en este estudio, aunque no hay garantías de que tenga un beneficio directo por participar en este estudio. Ya que los resultados obtenidos y emitidos serán a largo plazo, a partir de la toma de muestras.

En tiempo y forma, algunos pacientes podrán beneficiarse de un apoyo diagnóstico molecular el cual será enviado al médico tratante y permitirá darle un consejo genético apropiado.

8.- NUEVOS HALLAZGOS



El médico del estudio le informará a usted o a su representante legal acerca de cualquier hallazgo significativo que se desarrolle durante el transcurso de este estudio que pudiera afectar el deseo de seguir participando en este estudio. Usted tiene el derecho de conocerla y tomar la decisión si continúa o no en el estudio.

9.- RETIRO Y TERMINACIÓN

Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento. Si elige no participar o retirarse del estudio, su atención médica presente y/o futura no se verá afectada y no incurrirá en sanciones ni perderá los beneficios a los que usted tendría derecho de algún otro modo.

El médico podrá suspender su participación en el estudio, sin su consentimiento, por cualquiera de las siguientes circunstancias:

- 1.- Que el patrocinador del estudio cancele el estudio.
- 2.- Que el médico considere que es lo mejor para Usted.
- 3.- Que necesita algún procedimiento o medicamento que interfiere con esta investigación.
- 4.- Su participación se suspende para cumplir con los requisitos del estudio.
- 5.- Que no ha seguido las indicaciones del médico lo que pudiera traer como consecuencias problemas en Usted.



Se Usted decide retirarse de este estudio, deberá realizar lo siguiente:

- 1.- Notificar a su médico tratante del estudio
- 2.- Deberá de regresar todo el material que su médico le solicite (si en dado caso se le fue otorgado).

Si su participación en el estudio se da por terminada, cualquier que sea la razón, el médico por su seguridad, continuará con seguimientos clínicos, además de podrá utilizar la información médica que se recabó antes de su terminación.

10.- COSTOS, REEMBOLSOS Y PAGOS

Los medicamentos, procedimientos y pruebas relacionadas con el estudio no tendrán ningún costo. Los gastos estarán solventados por el proyecto de investigación mismo.

En este estudio Ud. no recibirá algún tipo de reembolsos ya que no tendrá costo; tampoco recibirá compensación económica o pago por participar.

11.- CONFIDENCIALIDAD/EXPEDIENTE CLINICO

Si acepta participar en la investigación, el médico del estudio recabará y registrará información personal confidencial acerca de su salud y de su tratamiento. Esta información no contendrá su nombre completo ni su domicilio, pero podrá contener otra información acerca de Usted, tal como iniciales y su fecha de nacimiento. Toda esta información tiene como finalidad garantizar la



integridad científica de la investigación. Su nombre no será conocido fuera de la Institución al menos que lo requiera nuestra Ley.

Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La solicitud será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto con la finalidad de proteger la integridad del Estudio.

La Facultad de Medicina perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Hospital Universitario “Dr. José E. González”, así como los investigadores principal y asociado serán los responsables de salvaguardar la información de acuerdo con las regulaciones locales. Usted tiene el derecho de solicitar por escrito al medico un resumen de su expediente clínico.

La información personal acerca de su salud y de su tratamiento del estudio podrá procesarse o transferirse a terceros en otros países para fines de investigación y de reportes de seguridad, incluyendo Agencias reguladoras (Secretaria de Salud (SSA) locales así como a comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra Institución.

Para los propósitos de este estudio, autoridades sanitarias como Secretaria de Salud y Comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra



Institución podrán inspeccionar el expediente clínico, incluso los que fueron recabados antes de su inicio de participación, los cuales pueden incluir su nombre, domicilio y otra información personal. En caso necesario estas auditorías o inspecciones podrán hacer fotocopias de parto o de todo su expediente clínico. La razón de esto es asegurar que el estudio se está llevando a cabo apropiadamente con la finalidad de salvaguardar sus derechos como pacientes en investigación.

Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones o en publicaciones.

La información recabada durante este estudio será recopilada en bases de datos del investigador, los cuales podrán ser usados en otros estudios en el futuro. Estos datos no incluirán información médica personal confidencial. Se mantendrá el anonimato.

Al firmar este documento, Usted así como su representante autorizan el uso y revelaciones de la información acerca de su estado de salud y tratamiento identificado en esta forma de consentimiento. No perderá ninguno de sus derechos legales como sujeto de investigación. Si hay cambios en el uso de su información, su médico le informará.

12.- INTERVENCIÓN DEL MÉDICO FAMILIAR



Se le informará a su médico de cabecera acerca de su participación en este estudio, enviándole la información médica pertinente si lo solicita así como cualquier información médica relevante.

Para que los médicos de la Institución conozcan de su participación en el estudio, los expedientes clínicos cuentan con un identificador para que el médico de cabecera se ponga en contacto con el Investigador.

13.- COMPENSACION Y TRATAMIENTO DE LESIONES

Si se enferma o se lesiona debido a una complicación o adversidad que sea resultado directo del uso del medicamento/dispositivo o procedimiento en estudio, deberá Usted notificar a su Médico para que el proporcione los cuidados necesarios para el tratamiento de dicha complicación. El tratamiento recibido no tendrá ningún costo y será cubierto por la Institución, así como la indemnización a la cual tendría derecho en caso de requerirla.

14.- DECLARACIÓN

Reconozco que me han dado la oportunidad de hacer preguntas relacionadas al estudio de investigación y que todas estas se me han respondido de manera clara y precisa.

Entiendo además si tengo preguntas relacionadas al estudio, así como en el caso de lesiones o complicaciones deberé de notificar de inmediato al investigador con la siguiente información de contacto.



Relación del Primer Testigo con el Sujeto del Estudio Dirección

Fecha Firma del Segundo Testigo Nombre en letra de molde

Relación del Segundo Testigo con el Sujeto del Estudio Dirección

II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

Fecha Firma de la Persona que Obtuvo el Nombre en letra de molde

Consentimiento/Investigador Principal



ANEXO 2

TABLA 11. DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS			DATOS PATOLÓGICOS		
Alcohol	Tabaquismo	Drogas	Tipo histológico del cáncer	Estadio	Inmunohistoquímica

DATOS CLÍNICOS					DATOS GINECO-OBSTÉTRICOS				
Paciente	Edad	Sexo	Peso	IMC	Menarquía (Edad)	Menopausia (presencia)	Anticonceptivos (Si o No)	# de hijos	Eda 1er. embarazo

ANEXO 3

Protocolo extracción de ácidos nucleicos a partir de biopsias en fresco.

AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Part 1

El AllPrep DNA/RNA Mini Kit (cat. no. 80204) debe ser almacenado en seco a temperatura ambiente (15-25°C) y es estable por al menos 9 meses bajo dichas condiciones.

El AllPrep DNA/RNA Mini Kit purifica simultáneamente el ADN genómico y ARN total de una sola muestra. El lisado de células o tejidos homogenizados, es primero pasado a través de una columna de centrifugación Allprep DNA para aislar ADN, después a través de una columna centrifugación RNeasy para aislar ARN.

Notas antes de empezar



- Si purifican ARN de líneas celulares ricas en RNAsas, o de tejidos, adicionar ya sea, 10 μ l de β -mercaptoetanol (β -ME), o 20 μ l 2 M ditioneitol (DTT), a 1 ml de buffer RLT plus antes de usar. Conteniendo el Buffer RLT Plus, ya sea, β -ME o DTT puede ser almacenado a temperatura ambiente por hasta 1 mes.
- Adicionar 4 volúmenes de etanol (96-100 %) al Buffer RPE para una solución de trabajo.
- La formación de espuma puede ser reducida por adición del reactivo DX (cat. no. 19088) a una concentración final de 0.5 % (v/v) antes de la disrupción y homogenización.

Disrupción de la muestra y homogenización de células o tejidos.

1.- Células: Cosecha un máximo de 1×10^7 de células, ya sea como una pastilla de células o por lisis directa en un plato de cultivo celular (por arriba de 10 cm de diámetro). Adicionar un adecuado volumen de Buffer RLT Plus y homogenizar.

Tejidos: No usar más de 30 mg de tejido. Romper el tejido y homogenizar el lisado en el apropiado volumen de Buffer RLT Plus (ver tabla 12). Centrifugar el lisado por 3 minutos a máxima velocidad. Cuidadosamente remover el sobrenadante por pipeteo.



- 2.- Transferir el lisado homogenizado a una columna de centrifugación AllPrep DNA colocado en un tubo colector de 2 ml (sugerido). Cerrar la tapa gentilmente, y centrifugar por 30s a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm).
- 3.- Usar el flujo para la purificación de ARN. (Ver “purificación total del ARN” en la guía rápida del protocolo AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Part 2.)
- 4.- Colocar la columna de centrifugación AllPrep DNA en un nuevo tubo colector (sugerido). Almacenar a temperatura ambiente (15-25°C) o bien, a 4°C para las posterior purificación del ADN. (Ver “purificación genómica del ADN” en la guía rápida del protocolo AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Part 2.)

Nota: No almacenar la columna a temperatura ambiente, o bien a 4 °C por largos periodos. No congelar la columna.

Tabla 12. Volúmenes de Buffer RLT Plus para la disrupción y homogenización de la muestra.

Muestra	Cantidad	Plato	Buffer RLT plus *	Disrupción y homogenización
Células animales	$< 5 \times 10^6$	< 6 cm	350 μ l	Adicionar Buffer RLT, vórtex ($\leq 1 \times 10^5$)
	$\leq 1 \times 10^7$	6-10 cm	600 μ l	
Tejidos animales	< 20 mg	-	350 μ l	
	≤ 30 mg	-	600 μ l	



AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Part 2

El AllPrep DNA/RNA Mini Kit (cat. no. 80204) debe ser almacenado en seco a temperatura ambiente (15-25°C) y es estable por al menos 9 meses bajo dichas condiciones.

El AllPrep DNA/RNA Mini Kit purifica el ADN genómico y ARN total simultáneamente de una sola muestra. El lisado de células homogenizadas o tejidos, es primero pasado a través de una columna de centrifugación Allprep DNA para aislar ADN, después a través de una columna centrifugación RNeasy para aislar ARN.

Purificación del ARN total

1. Adicionar 1 volumen de etanol al 70%, al flujo del paso 2 de la guía rápida del protocolo AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Part 1. Mezclar bien por pipeteo. No centrifugar. Proceder inmediatamente al paso 2.
2. Transferir hasta 700 μ l de la muestra, incluyendo cualquier precipitado, a una columna de centrifugado RNeasy colocado en un tubo colector (sugerido). Centrifugar por 15 s a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Descartar el flujo.

Nota: Reusar este tubo colector a través de los pasos 3, 4, y 5.

3. Adicionar 700 μ l de Buffer RW1 a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa, y centrifugar por 15 s a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Descartar el flujo.



4. Adicionar 500 μ l de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa, y centrifugar por 15 s a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Descartar el flujo.
5. Adicionar 500 μ l de Buffer RPE a la columna de centrifugación RNeasy. Cerrar la tapa, y centrifugar por 2 minutos a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Opcional: Colocar la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo colector de 2 ml (sugerido). Descartar el viejo tubo colector junto con el flujo. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto para secar la membrana de la columna de centrifugación.
6. Colocar la columna de centrifugación RNeasy en un nuevo tubo colector de 1.5 ml (sugerido). Adicionar de 30-50 μ l de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna de centrifugación. Cerrar la tapa gentilmente, y centrifugar por 1 minuto a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) para eluir el ARN. Opcional: Si el rendimiento del ARN esperado es $> 30 \mu$ g, repetir el paso 6 adicionando otros 30-50 μ l de agua libre de RNasa, o usar el eluato del paso 6 (si una alta concentración de ARN es requerida). Reusar el tubo colector del paso 6.

Purificación del ADN genómico.

1. Adicionar 500 μ l de Buffer AW1 a la columna de centrifugación AllPrep DNA (en un tubo colector de 2 ml) desde el paso 4 de la guía rápida del protocolo AllPrep DNA/RNA Mini Kit, Part 1. Cerrar la tapa gentilmente, y



- centrifugar por 15 s a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) para lavar la columna de centrifugación. Descartar el flujo. Reusar el tubo colector en el paso 2.
- Adicionar 500 μl de Buffer AW2 a la columna de centrifugación AllPrep DNA. Cerrar la tapa, y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad para lavar la membrana de la columna de centrifugación.
 - Colocar la columna de centrifugación en un nuevo tubo colector de 1.5 ml (sugerido). Adicionar 50 μl de Buffer EB directamente a la membrana de la columna de centrifugación y cerrar la tapa. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto.

Centrifugar por 1 minuto a $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) para eluir el ADN.

Opcional: Repetir el paso 3 adicionando otros 100 μl de Buffer EB, o usando el eluato del paso 3 (si una alta concentración de ADN es requerida). Reusar el tubo colector del paso 3.

ANEXO 4

Protocolo de microarreglos de Hibridación Genómica Comparativa (aCGH)

Tabla 13. Requerimientos de ADNg.

Formato	ADNg requerido (μg)	Volumen de ADNg (μL)
4-Pack	0.5-1.0	20.2



Digestión por enzimas de restricción (SureTag DNA Labeling Kit).

1. Descongelar BSA y Buffer de enzimas de restricción 10X (10X RE), homogenizar y dar un spin (mantener en hielo).
2. Agregar la cantidad de ADNg a un tubo libre de nucleasas (0.2mL) y agregar agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen indicado en la Tabla 13.
3. Preparar el Master Mix de digestión según la Tabla 14 siguiendo el orden indicado (Mantener en hielo).

Tabla 14. Master Mix de digestión.

Reactivo	μL por reacción	10 Reacciones
Agua libre de nucleasas	2.0	20
10X RE Buffer	2.6	26
BSA	0.2	2
Alu I	0.5	5
Rsa I	0.5	5
Volumen Final	5.8	58

4. Agregar 5.8 μl de Master Mix de digestión a cada tubo de reacción con ADNg para alcanzar un volumen total de 26 μl, homogenizar por pipeteo.
5. Incubar las muestras en termociclador de acuerdo a la Tabla 15:



Tabla 15. Incubación de digestión.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	37°C	2 horas
2	65°C	20 minutos
3	4°C	Mantener

6. Tomar 2 μ l del ADNg digerido y correrlo en un gel de agarosa al 0.8% para confirmar la digestión (Mayor parte del producto digerido entre 200pb y 500pb).
7. Pasar directamente al “Marcaje de muestra” o almacenar el ADNg digerido a -20°C (STOP).

Marcaje de la muestra.

1. Centrifugar los tubos por 1 min a 6,000xg.
2. Agregar 5 μ L de Random Primers a cada tubo de reacción, alcanzando un volumen total de 29 μ L, homogenizar por pipeteo.
3. Incubar en termociclador a 98°C por 3 min y enfriar en hielo inmediatamente.
4. Centrifugar los tubos por 1 min a 6,000xg.
5. Mezclar los componentes de la Tabla 16 manteniendo el orden indicado (Mantener en hielo) preparando una reacción de Master mix para Cy3 y una para Cy5.



Tabla 16. Master Mix de marcaje.

Reactivos		5Reacciones
Agua libre de nucleasas	2.0	10
5X gDNA Buffer	10.0	50
10X dNTP's	5.0	25
Cy3 (Referencia) Cy5 (Muestra)	3.0	15
Exo (-) Klenow	1.0	5
Volumen total	21.0	105

6. Agregar 21µl del Master Mix de marcaje a cada tubo de reacción, alcanzando un volumen de 50µl, homogenizar suavemente por pipeteo.
7. Incubar las muestras en el termociclador siguiendo las indicaciones de la Tabla 17.

Tabla 17. Incubación de marcaje.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	37°C	2 horas
2	65°C	10 minutos
3	4°C	Mantener



8. Pasar directamente a purificación o mantener las muestras refrigeradas a -20°C en oscuridad (STOP).

Segundo punto de control.

Purificación del ADN_g marcado.

1. Añadir $100\mu\text{L}$ de TE a cada tubo de reacción, homogenizar y centrifugar las muestras por 1 min a $6,000\times g$.
2. Pasar todo el contenido de cada tubo de 0.2mL a tubos de 1.5mL .
3. Agregar $330\mu\text{L}$ de TE a cada tubo de reacción y homogenizar.
4. Para cada muestra a purificar, colocar una columna dentro de un tubo de colección de 2ml y cargar cada muestra dentro de la columna.
5. Centrifugar por 10 min a $14,000\times g$ a temperatura ambiente. Desechar el flujo de trabajo del tubo colector y volver a colocar la columna.
6. Agregar $480\mu\text{L}$ de TE a cada columna. Centrifugar por 10 min a $14,000\times g$ a temperatura ambiente. Desechar el flujo de trabajo.
7. Invertir la columna dentro de un tubo colector nuevo de 2ml previamente etiquetado y centrifugar por 1 min a $1,000\times g$ a temperatura ambiente para recuperar la muestra purificada.
*El volumen recuperado aproximado será entre 20 y $32\mu\text{L}$ (Medir volumen).
8. De cada muestra, determinar el rendimiento y la actividad específica en NanoDrop 2000.



Determinación de rendimiento y actividad específica.

1. Utilizar el NanoDrop 2000, en modo de Microarreglos, con tipo de muestra ADN-50, midiendo absorbancia a 260nm (ADN), 550nm (Cy3) y 650nm (Cy5).
2. Utilizar 1.5µL de TE para blanquear el instrumento.
3. Tomar 1.5µL de cada muestra y leer en el NanoDrop, para obtener los datos de concentración y pmol por µL de marcador.
4. Calcular el rendimiento de cada muestra:

Rendimiento(µg)

$$= \frac{\text{Concentración de ADNg} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right) \times \text{Volumen de muestra} (\mu\text{L})}{1000\text{ng}/\mu\text{g}}$$

5. Calcular la actividad específica del ADNg marcado:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{pmol por } \mu\text{L de marcador}}{\mu\text{g por } \mu\text{L de ADNg}}$$

6. Comprobar que se cumplan los parámetros de rendimiento y actividad específica de la Tabla 18.

Tabla 18. Rendimiento y actividad específica esperados.

µg de ADNg inicial	Rendimiento o esperado (µg)	Actividad específica Cy3	Actividad específica Cy5
0.2	3-5	20-25	15-25
0.5	8-11	20-35	20-30



1	9-12	25-40	20-35
---	------	-------	-------

*El ADN marcado puede almacenarse hasta un mes a -20°C en oscuridad (STOP).

Preparación del ADNg marcado para la hibridación.

1. En un tubo de 0.2mL libre de RNAsas, combinar 19.5µL del ADNg de la muestra (Cy5) y 19.5µL de su ADNg de referencia (Cy3), formando un volumen total de 39µL.
2. Preparar el Master Mix de hibridación siguiendo las indicaciones de la Tabla 19.

Tabla 19. Master Mix de hibridación.

Reactivos	µL por hibridación	5 hibridaciones
Cot-1 DNA	5	25
10X aCGH Blocking Agent	11	55
2X HI-RPM Hybridization Buffer	55	275
Volumen final	71	355



3. Agregar 71 μ L de Master Mix de hibridación a cada tubo con muestra, para obtener un volumen total de 110 μ L. Homogenizar por pipeteo cuidadosamente (Burbujas) y dar un spin.
4. Transferir los tubos al termociclador e incubar de acuerdo a la Tabla 20.

Tabla 20. Incubación de hibridación.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	98°C	3 min
2	37°C	30 min

5. Centrifugar 1 min a 6000xg e hibridar inmediatamente 100 μ L de cada muestra en el gasket previamente dentro de la cámara de hibridación*.
*Usar pipeta 10-100 c/puntas amarillas sin filtro.
6. Colocar el microarreglo con el lado activo hacia abajo (Agilent), de manera que el código de barras quede hacía arriba.
7. Cubrir la cámara de hibridación y ensamblar.
8. Cargar la cámara de hibridación dentro del horno rotatorio a 20rpm y 67°C por 24h.

Lavado del microarreglo.

1. El día anterior al lavado del microarreglo, lavar los 3 recipientes de buffer con extran y abundante agua, seguido de 3 lavados con agua mQ y 2 lavados con el buffer respectivo para cada recipiente.



2. Llenar casi por completo el recipiente para buffer 2 y precalentar toda la noche a 37°C en incubadora.
3. El día del lavado llenar los recipientes apropiados para el buffer 1 y mantenerlos a temperatura ambiente.
4. Durante el lavado, justo en el momento de su uso, retirar el buffer 2 de la incubadora y colocarlo sobre una plancha de calentamiento previamente calentada a alrededor de 37°C, prosiguiendo con el lavado como se indica en la Tabla 21.

Tabla 21. Condiciones de lavado.

Lavado	Buffer de lavado	Temperatura	Tiempo
Desmontaje	CGH Buffer 1	Ambiente	
Primer lavado	CGH Buffer 1	Ambiente	5 min
Segundo lavado	CGH Buffer 2	37°C	1 min

5. Colocar la laminilla del microarreglo en un holder con la superficie activa hacia arriba y cerrar la cubierta plástica.
6. Escanear las laminillas inmediatamente para minimizar el impacto de oxidantes ambientales en la intensidad de la señal.

ANEXO 5

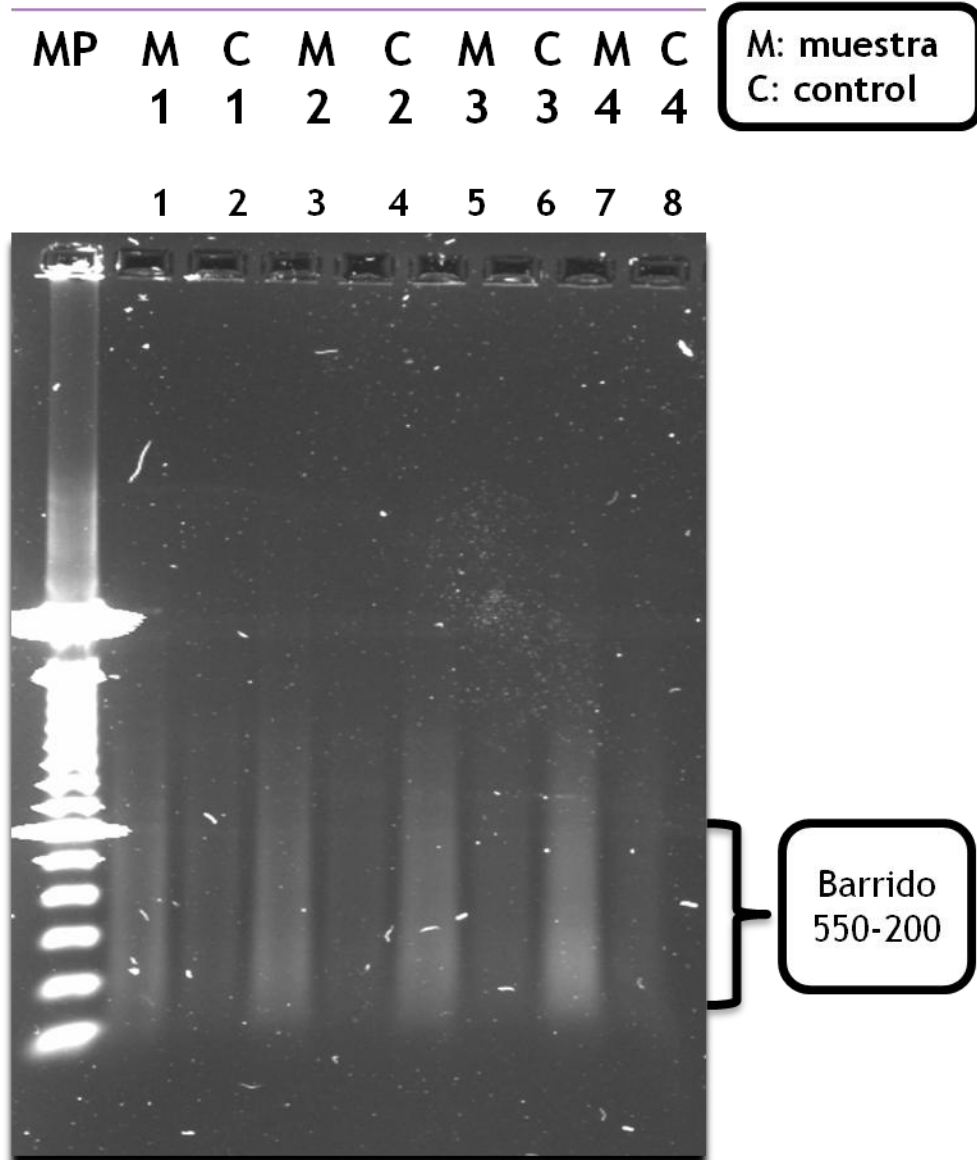


Figura 20. Primer punto de control del aCGH. Digestión enzimática con las enzimas Alu y Rsa. Fragmentos esperados entre 200 y 500 pb.

ANEXO 6

ID	ADN (ng/ μ L)	Pmol/ μ L Cy5	Rendimiento	Actividad Específica
LCM 35	370.4	11.2	8.5	30.2
LCM 46	331.1	9.5	7.7	28.7
LCM 47	349.2	10.7	7.3	30.6
LCM 48	208.1	6.7	6.9	32.2
LCM 49	261.6	6.4	7.8	24.5
LCM 50	297.9	6.6	8.0	22.2
LCM 51	244.2	6.3	7.5	25.8
LCM 52	272.9	7.1	8.1	26.0
LCM 54	391.0	10.4	8.9	26.5
LCM 55	466.7	9.5	11.1	20.4
LCM 56	316.5	6.7	7.9	21.2
LCM 57	407.3	9.1	9.3	23.3
LCM 58	406.0	10.6	9.7	26.1
LCM 59	424.5	8.8	10.7	21.6
LCM 61	379.1	9.2	8.4	20.1
LCM 62	437.3	7.6	9.2	20.1
LCM 63	482.1	10.2	9.8	21.2
LCM 65	376.8	7.3	9.2	19.4
LCM 64	301.4	8.5	7.7	28.2

Tabla 22. Segundo punto de control del aCGH. Rendimiento y actividad específica del fluorocromo Cy5 en las muestras tumorales.

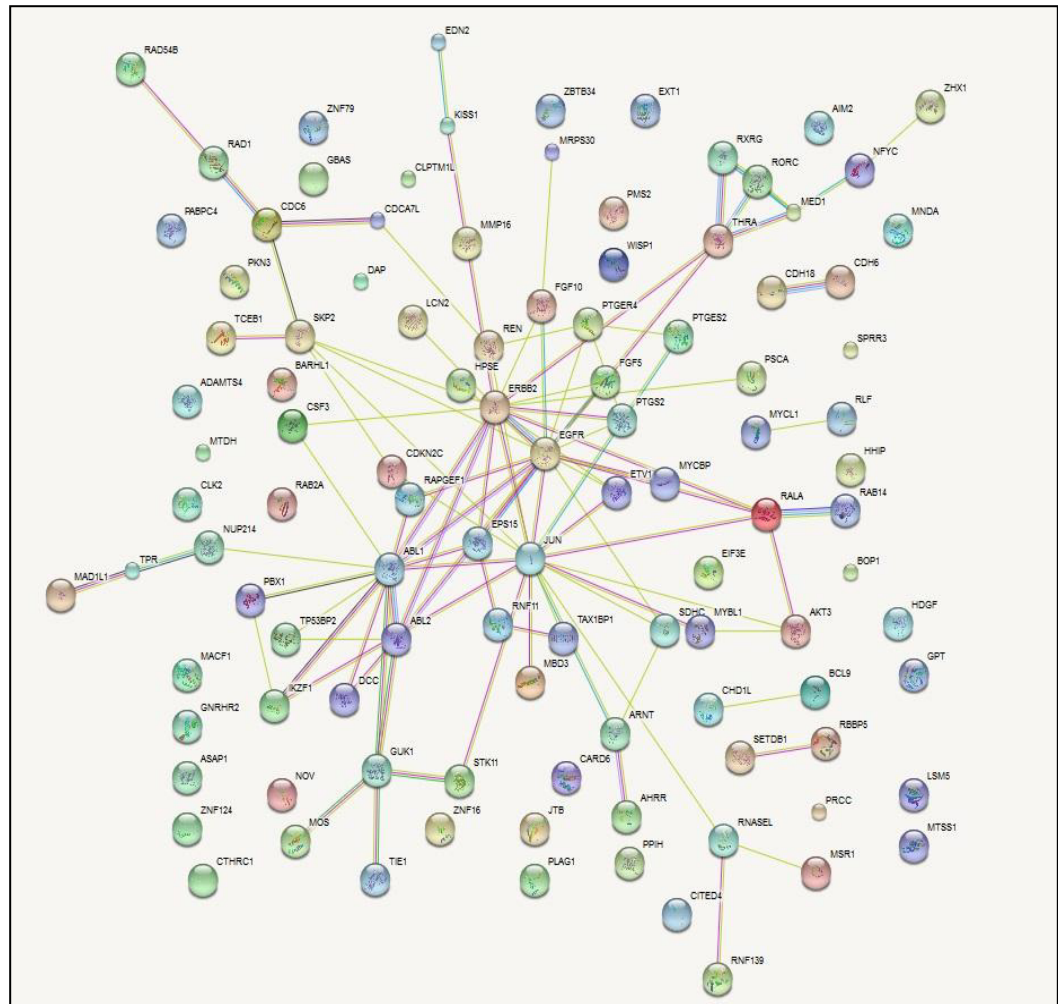


Figura 22. Interacciones entre las principales proteínas alteradas en subtipo HER-2. Se visualiza las principales interacción proteicas presuntivas. Correspondiente a los genes alterados con duplicaciones en las alteraciones amplias. Entre las que se destacan: ERBB2, EGFR, RAPGEF1, ABL1, ABL2, IK2F1, GUK1, STK11, RALA, AKT3, SDHC, MYCBP, THRA, RXRG, CDC6 Y SKP2.

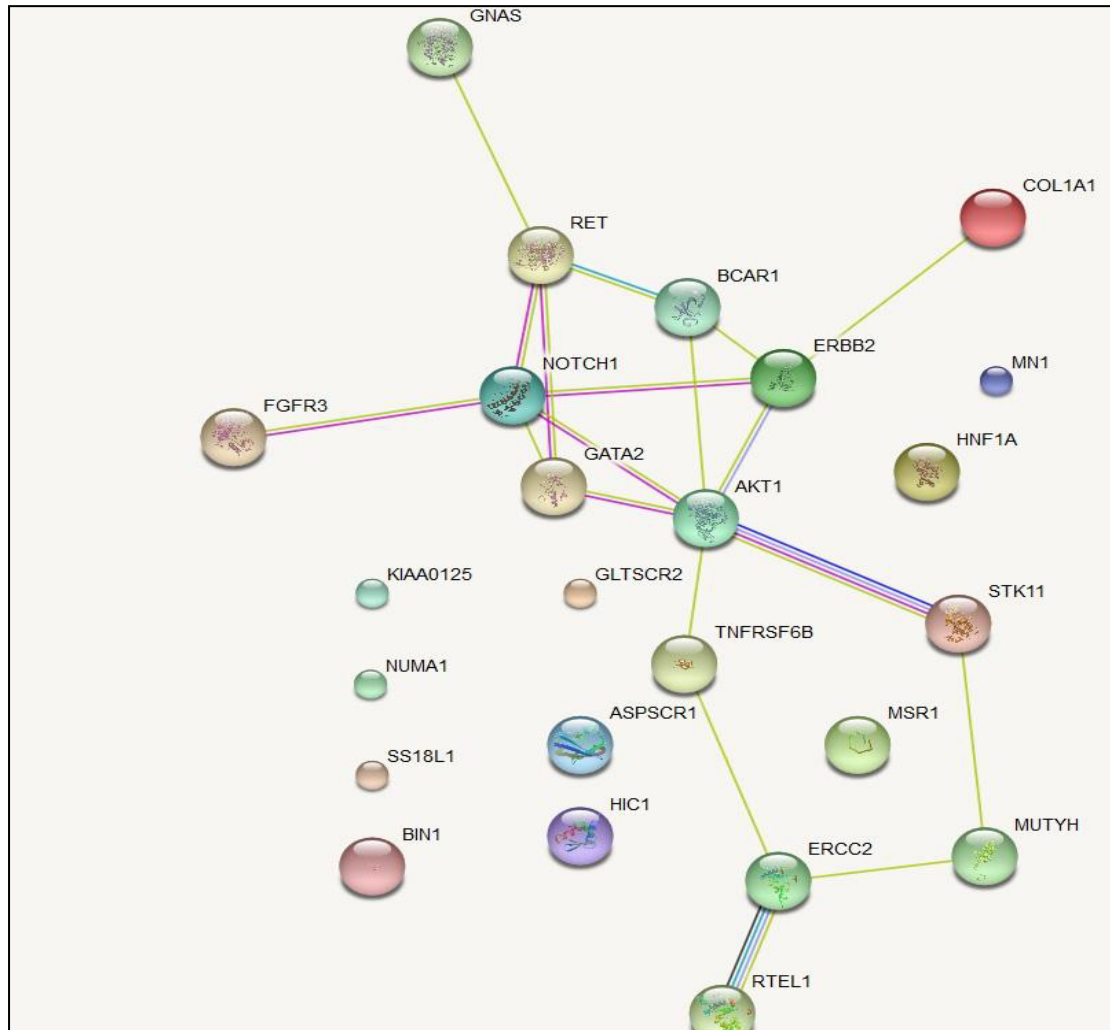


Figura 23. Interacciones entre las principales proteínas alteradas en subtipo HER-2 II. En lo que corresponde a genes duplicados en alteraciones focales, podemos ver la interacción de genes importantes como *NOTCH1*, *ERBB2*, *GATA2*, *BCAR1*, *RET* y *AKT1*. La mayoría de dichos genes, involucrados en funciones celulares como angiogénesis y resistencia a fármacos.

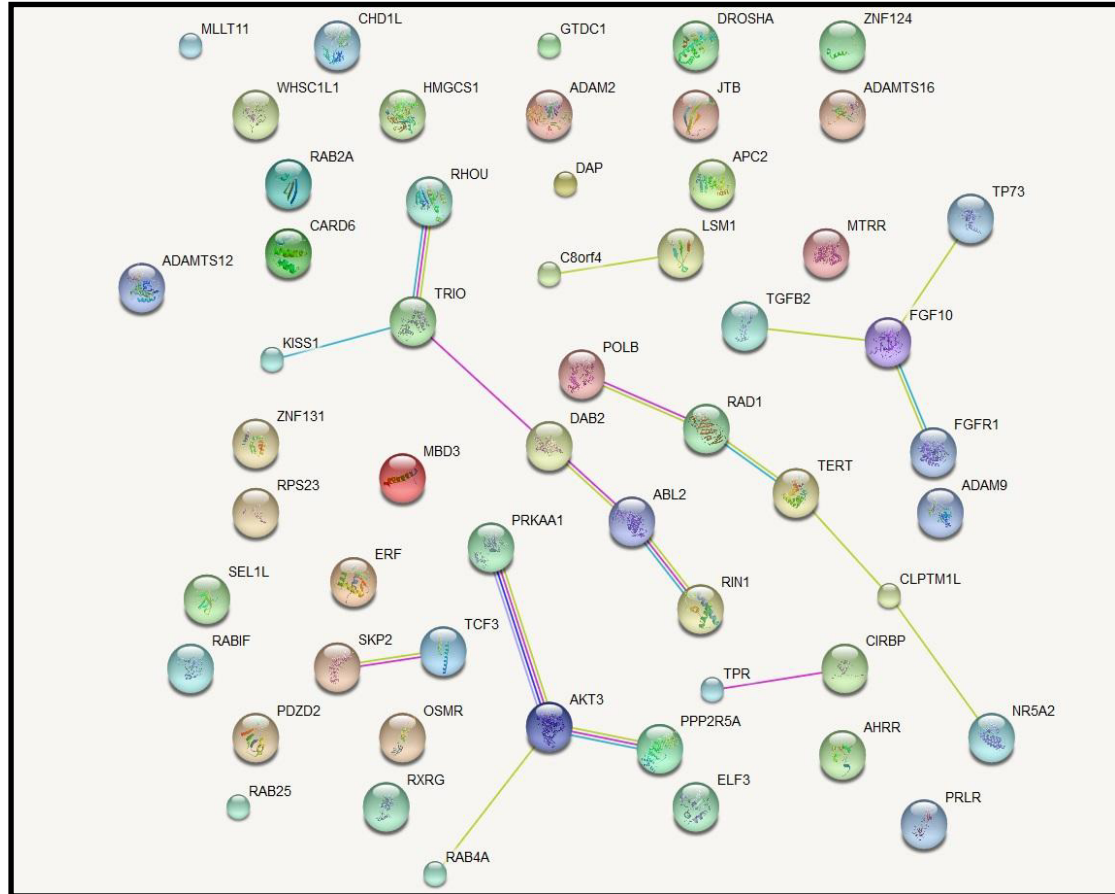


Figura 24. Interacciones entre las principales proteínas alteradas en subtipo TN. Se observa la interacción de los principales genes alterados entre los que se destacan: *TRIO*, *AKT3* y *FGF10* con tres interacciones, seguido de *Abl2*, *Dab2*, con dos interacciones y *RN1*, *RHOU*, *RAB4A*, *TCF3*, *SKP2*, *TGFB2*, *KISS1*, *LSM1* Y *C8ORF4* con una interacción.