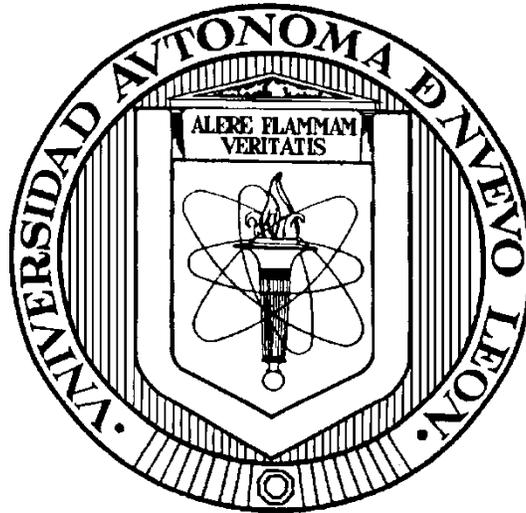


Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina



***“Identificación de vías de señalización afectadas en pacientes con
cáncer de mama mediante perfiles de expresión global y
secuenciación masiva”***

Presentada por:

M.C. Sandra Karina Santuario Facio

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Enero 2014

Monterrey, Nuevo León

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León; bajo la dirección de la Dra. C. Rocío Ortiz López.

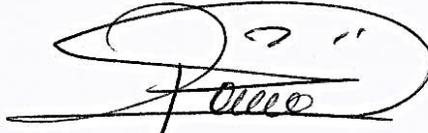
El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo bajo la colaboración del Dr. med. Servando Cardona Huerta y la colaboración del Dr. Jorge Luis Martínez Rodríguez y la Dra. Ana Lorena Vázquez del Ciotto.

El análisis de los datos de microarreglos se llevó a cabo con la colaboración y asesoría del Dr. C. Víctor Manuel Treviño Alvarado de la cátedra de Bioinformática de la Escuela de Medicina del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey.

El análisis de los datos de secuenciación se llevó a cabo con la colaboración y asesoría del M.Res.Bio. José Arcadio Valdés Franco del área de Bioinformática de la Unidad de Biología Molecular Genómica y Secuenciación del Centro de Investigación, Desarrollo y Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Identificación de vías de señalización afectadas en pacientes con cáncer de mama mediante perfiles de expresión global y secuenciación masiva.

Aprobación de la tesis:



Dra. C. Rocío Ortiz López
Directora de tesis



Dr. med. Servando Cardona Huerta
Co-Director de tesis



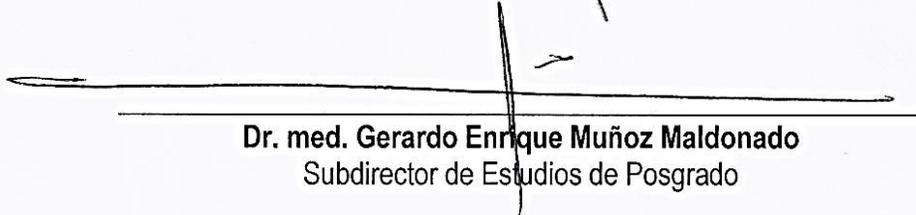
Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Comisión de Tesis



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Comisión de Tesis



Dr. C. Gerardo Raymundo Padilla Rivas
Comisión de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Aspectos generales del cáncer de mama.....	1
1.2. Abordaje molecular y genómico en cáncer de mama.....	12
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1. Materiales.....	23
4.2. Lugar donde se realiza el estudio.....	26
4.3. Diseño del estudio.....	26
4.4. Población de estudio.....	27
4.5. Método de muestreo y definición variables.....	28

4.6. Tipos de muestras.....	29
4.7. Descripción del diseño.....	30
4.8. Esquema general del estudio.....	32
4.9. Metodología experimental.....	33
4.10. Análisis estadístico.....	36
5. RESULTADOS	39
5.1. Características generales de la población estudiada.....	39
5.2. Análisis de qPCR tiempo real EGFR, BRCA1, PTPN12 y TP53.....	41
5.3. Perfiles de expresión y clasificación molecular de los tumores.....	43
5.4. Respuesta al tratamiento.....	48
5.5. Detección de mutaciones del panel de cáncer en tumores triple negativos por secuenciación.....	49
5.6. Vías de señalización identificadas.....	52
6. DISCUSIÓN	55
6.1. Análisis de qPCR tiempo real EGFR, BRCA1, PTPN12 y TP53.....	55
6.2. Perfiles de expresión y clasificación molecular de los tumores.....	56
6.3. Detección de mutaciones del panel de cáncer en tumores triple negativos por secuenciación.....	57
6.4. Vías de señalización identificadas	67
7. CONCLUSIONES	68
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69

9. ANEXOS	75
9.1. Carta comité ética.....	75
9.2. Carta de consentimiento informado.....	76
9.3. Cuestionario.....	81

AGRADECIMIENTOS

Dios, gracias por permitirme llegar a este punto de mi vida y concederme salud y bienestar para terminar este camino. Te agradezco por cada cosa y persona en mi vida, por cada experiencia, buena o mala, y por enseñarme a creer que la felicidad es la actitud que uno toma frente a la vida, no solo un estado emocional y por enseñarme a vivir con tu compañía y voluntad.

David Jesús Romero Aguilar, mi amado esposo y compañero de vida, gracias por cada segundo a mi lado, por tu apoyo incondicional y por ser en tu imperfección humana el hombre perfecto para mí, te amo.

Lorenza Facio Estrella, mi madre querida, cada parte de mi vida es debida a usted, a su perseverancia y ejemplo de grandeza, gracias por cada cosa, palabra y acto que ha hecho por mí, la quiero mucho.

Familia Facio, desde mis abuelitos, Socorro y Octaviano, mis tíos y tías, primos y primas, mi hermano Marco Tulio, su esposa Carmen y mis hermosos sobrinos Marco y Caro, a los niños de mis primos y todos los que forman parte de mi hermosa familia, incluyendo mi familia política, gracias por su apoyo y cariño incondicional.

Dra. Rocío, Dr. Augusto y Dr. Servando, les agradezco por su confianza en mí para desarrollar este trabajo de tesis, por su apoyo y tutoría, sus consejos y guía durante este viaje, por mostrar su calidad humana hacia mí, así como darme algún regaño oportuno cuando lo he necesitado.

Compañeros de laboratorio UBMGyS, Laura, Yadira, Allyson, Geovana, Adriana, Liz, Ramsés, Carlos, Arturo, Paty, Juany, Ramiro y Arcadio, además a quienes han pasado por este laboratorio, Babis, Montufar y Marcela, gracias por la convivencia, compañía y amistad que me han brindado y que ha hecho esta experiencia mucho más amena e inigualable.

Compañeros y personal del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, gracias a Juany, Ariadna, Normita, Ruth, Irasema, Cecy y cada miembro administrativo y auxiliares del departamento quienes siempre estuvieron con disposición a ayudarme y quienes crean un verdadero ambiente familiar.

CONACyT, gracias por el apoyo económico, sin el cual no hubiera sido posible realizar mi doctorado ni el proyecto de tesis.

Pacientes, a cada mujer que acepto a participar en este trabajo donando sus muestras y su tiempo, aun cuando las invadía el miedo, coraje y tristeza por su condición de salud, muchas gracias, sin su participación este trabajo no se hubiera realizado.

...Maktub.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a las dos personas más importantes en mi vida...

...Primero, a la mujer que me dio más que la vida, a la Señora *Lorenza Facio Estrella*.

Mamá, usted es el motivo principal de cada uno de mis logros, pues fue usted quien me enseñó a soñar, quien alimentó esos sueños con confianza, apoyo y fe incondicional en mí, usted me dio las alas que me han llevado hasta este lugar y este momento. Cada logro que he tenido se debe a usted, pues sin la vida, ejemplo y apoyo que me ha brindado, yo no sería quien soy. Gracias por cada palabra de apoyo, por cada regaño, por cada café en mis noches de desvelos, no solo en el doctorado, sino en cada etapa académica, gracias por sus desvelos, por su preocupación, por sus sacrificios, por no darse por vencida con esta niña suya, que a veces, entre caprichos, terquedad y rebeldía no podía ver ni entender el amor incondicional de una madre excepcional como lo es usted.

Esta tesis, así como el camino recorrido hasta ahora, se lo dedico a usted, pues usted es la creadora e inspiración de esta persona a la que enseñé que todo sueño es posible si se trabaja lo suficientemente duro para conseguirlo, he aquí mami, el fruto de 30 años de su esfuerzo y dedicación. La quiero y amo mucho.

...Segundo, a mi compañero y amor de mi vida, a *David Jesús Romero Aguilar*.

Amor, eres mi motor cada día, el motivo de seguir luchando por un mejor futuro, gracias a ti he podido terminar esta hermosa y difícil etapa. Gracias por el apoyo que me has dado, por entenderme y ayudarme a cumplir mis sueños, por compartir los tuyos y por los sueños nuevos que hemos creado. La vida a tu lado ha cambiado mi visión del mundo y me ha hecho plantearme nuevas metas, que a tu lado sé que cumpliré. Te agradezco cada noche de trabajo compartido, por tu compañía y ánimo cuando flaqueaba, cuando pensaba en renunciar, gracias por no dejarme caer y sujetarme entre tus brazos cuando mi cansancio era tanto que no podía seguir, gracias por tus cuidados y tu dedicación, y sobre todo por todo el amor que me ayuda a seguir cada día.

Te dedico este escrito amor, ya que sin ti, sin tu amor, este trabajo no hubiera sido la realidad que es hoy. Te amo!

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Anticonceptivos orales
Ala	Alanina
aRNA	Ácido ribonucleico amplificado
ASCO	Asociación Estadounidense de Oncología Clínica
ATP	Adenosín trifosfato
BRCA1	Gen cáncer de mama 1, inicio temprano
BRCA2	Gen cáncer de mama 2, inicio temprano
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CDS	Región codificante
C-KIT	Homólogo del oncogén viral del sarcoma felino 4 V-Kit Hardy Zuckerman
CKs	Citoqueratinas
CM	Cáncer de Mama
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
dbSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido de doble cadena
DEL	Delección
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ePCR	Reacción en cadena de la polimerasa en emulsión
FAC	Fluorouracilo/Doxorrubicina(Adriamicina)/Ciclofosfamida
FFPE	Fijado en formol y embebido en parafina

gDNA	Acido desoxirribonucleico genómico
Glu	Ácido Glutámico
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
IC	Intervalos de confianza
Indel	Inserciones/deleciones
INS	Inserción
IPA	Análisis en el Inguenuity pathways
Ki67	Antígeno identificado por el anticuerpo Ki-67
Leu	Leucina
Lys	Lisina
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng	Nanogramos
NR	No respuesta
P63	Proteína tumoral p63
PAM50	Algoritmo compuesto por la expresión de 50 genes para la clasificación molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGM	Personal Genome Machine
Pro	Prolina
PTPN12	Proteína 12 tirosina-fosfatasa, no del tipo receptor
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RCP	Respuesta clínica parcial
RE	Receptor de Estrógeno

RMA	Roboust Multi-array Average
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de Progesterona
RPC	Respuesta patológica completa
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TEM	Transición epitelio mesenquimal
Thr	Treonina
TP53	Proteína tumoral P53
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
Val	Valina
VNR	Variantes no reportadas
µg	Microgramos

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Tasa de mortalidad observada de la población de 20 años y más.....	3
2	Características de las pacientes y tumores analizados (Grupo 1).....	40
3	Características histopatológicas de los tumores del grupo 2.....	41
4	Lista de 59 genes del perfil de expresión genética diferencial.....	44
5	Respuesta al tratamiento de cada paciente y subtipo molecular.....	48
6	Variantes encontradas en las 32 muestras analizadas.....	49
7	Variantes frecuentes y efecto en la proteína.....	52
8	Vías de señalización afectadas.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria.....	2
2	Esquema general del estudio.....	33
3	Graficas de expresión de BRCA1, EGFR, PTPN12 y TP53.....	42
4	Perfil de expresión genética diferencial.....	45
5	Clasificación Molecular de tumores usando PAM50.....	47
6	Variantes frecuentes por gen indicando posición en el cromosoma.....	50
7	Variantes por muestra mostrando el gen afectado	51
8	Mecanismos moleculares del cáncer.....	54
9	Gen ATM y su proteína.....	61
10	Gen FGFR2 y su proteína.....	64
11	Gen PIK3CA y su proteína.....	66

RESUMEN

M. en C. Sandra Karina Santuario Facio

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de graduación: Enero 2014

Título del estudio: "Identificación de vías de señalización afectadas en pacientes con cáncer de mama mediante perfiles de expresión global y secuenciación masiva"

Introducción: En cáncer de mama (CM) la selección de la terapia depende en gran parte del estado de receptor de estrógenos, progesterona y HER2, sin embargo el CM triple negativo (CMTN) carece de la expresión de estos tres receptores. **Objetivo:** Realizar un análisis genómico y de expresión global en muestras de tejido de pacientes con CM antes y después del tratamiento neoadyuvante y asociar los hallazgos con la respuesta al tratamiento. **Material y Métodos:** Se realizó un análisis de genes candidatos y de expresión global en muestras de 28 mujeres (Grupo 1) con CM de tejido de biopsia y cirugía (antes y después de quimioterapia neoadyuvante con Adriamicina/Ciclofosfamida). Análisis de expresión de genes candidatos y global fueron realizados en este grupo a partir del RNA total que fue obtenido de las muestras de tejido. La expresión de los genes BRCA1, EGFR, PTPN12 y TP53 fue realizada usando sondas tipo TaqMan usando los genes B-ACT y GAPDH, el análisis estadístico fue realizado con el programa DataAssist v3 para obtener los valores de cuantificación relativa de la expresión génica mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los perfiles de expresión se llevaron a cabo usando la metodología de Affymetrix. La respuesta al tratamiento fue evaluada tomando en cuenta la disminución o aumento en el tamaño del tumor después del tratamiento neoadyuvante. En el grupo 2 de pacientes se incluyeron 32 muestras de tejido fijado en formol y embebido en parafina que fueron analizadas mediante un panel de genes relacionados con cáncer y secuenciación masiva. A partir de gDNA fueron construidas las librerías, PCR en emulsión, enriquecimiento y secuenciación siguiendo el protocolo del fabricante. El análisis bioinformático se realizó en el servidor de Ion Torrent y para la identificación de las variantes fue utilizado el plugin "Variant Caller". **Resultados:** En el grupo 1, en el análisis de genes candidatos se encontraron cinco pacientes que cambiaron significativamente de expresión en BRCA1 ($p=0.05$, t student), cinco pacientes en EGFR, ocho pacientes en PTPN12 y solo tres pacientes en TP53. Ocho pacientes (38%) tuvieron cambio en la expresión de al menos uno de los genes analizados, tres de estos presentaron RPC y cinco RCP. En el análisis de expresión global se obtuvieron 59 genes diferencialmente expresados. En la clasificación molecular se mostraron cambios en el subtipo molecular entre la muestra de antes y después de tratamiento en el 42% (10/24) de las muestras. Solo el 16.7% de las pacientes presentaron una respuesta patológica completa (RPC), mientras que la mayoría (58%) presentaron una respuesta clínica parcial (RCP). En el grupo 2, se obtuvieron un total de 168 diferentes variantes que se encontraron en las 32 muestras, en 32 de los 46 genes analizados. La mayoría de las variantes (95.8%) fueron SNP, mientras que 4.2% fueron inserciones (3/168) o deleciones (4/168). El casi 30% (49/168) de las variantes ya habían sido reportadas previamente, sin embargo el 70% son variantes no reportadas. Nueve genes presentaron variantes en más de 5 muestras, pero solo los genes ATM, FGFR2 y PIK3CA mostraron variantes no reportadas con efecto en sus respectivas proteínas. **Conclusiones:** El presente trabajo abre el panorama a la detección de nuevas firmas genómicas relacionadas a la respuesta al tratamiento neoadyuvante y a la presencia de probables mutaciones propias de nuestra población.

Dra en C. Rocío Ortiz López

Director de tesis

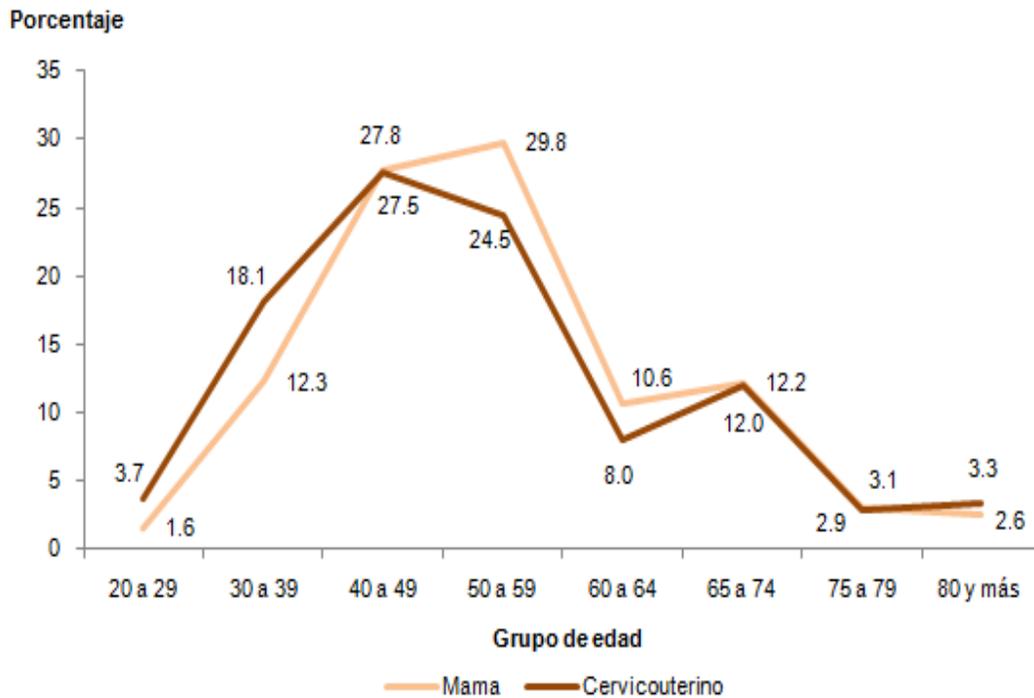
1. MARCO TEÓRICO

1.1. Aspectos Generales del Cáncer de Mama

A nivel mundial, el cáncer más frecuente entre mujeres es el cáncer de mama (CM) con 1.38 millones de nuevos casos diagnosticados para el 2008[2]. Este tipo de cáncer es frecuente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, con tasas de incidencia que van desde 19.3 (por cada 100,000 mujeres) en el este de África, hasta 89.7 (por cada 100,000 mujeres) en el oeste de Europa [2]. En cuanto a mortalidad, este rango es menor (aproximadamente de 6 a 19 por cada 100,000 mujeres), sin embargo ocupa el quinto lugar en causa de muerte por cáncer en población general y el primer lugar en causa de muerte por cáncer en mujeres alrededor del mundo[2].

En México, el CM es el principal tipo de tumor maligno en mujeres adultas (20 años en adelante) con un 24.3% de los casos reportados para el año 2010[1]. La morbilidad del CM es mayor entre mujeres de 40 a 60 años, observándose que el mayor porcentaje de casos (29.8%) se encuentra entre las mujeres de 50 a 59 años, y el segundo más alto (27.8%) entre mujeres de 40 a 49 años (Figura 1)[1] indicando que la presencia de casos en mujeres jóvenes es de importancia en nuestra población. En cuanto a la mortalidad, para el 2011 el CM fue la principal causa de muertes por cáncer entre mujeres mayores de 20 años con un 13.8%, seguida por el cáncer cervicouterino con 10.4% en nuestro país[1]. Es importante señalar que entre las tasas de mortalidad en grupos de edades jóvenes (en ambos sexos) las tasas más altas en mujeres corresponden a casos de CM, observándose que entre mujeres de 30 a 39 y de 40 a 49 años las tasas de mortalidad son 4.46 y 14.55 por cada 100,000 habitantes respectivamente, mientras que en hombres las tasas más altas corresponden al cáncer de estómago en estos mismos

grupos de edad donde tenemos 1.51 (30 a 39 años) y 3.91 (40 a 49 años) por cada 100,000 habitantes (Tabla 1)[1].



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos C34, C50, C53 y C61.

Fuente: SSA (2011). Base de egresos hospitalarios 2010. Procesó INEGI.

Figura 1. Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria de la población femenina de 20 años y más por tumores malignos seleccionados según grupo de edad 2010 [1]

Tabla 1. Tasa de mortalidad observada de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según grupo de edad y sexo 2011[1].

Por 100 mil habitantes de cada grupo de edad y sexo

Principales tumores malignos	Grupo de edad							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y más
Hombres								
Bronquios y pulmón	0.35	0.80	2.98	11.98	30.18	67.18	115.27	131.00
Estómago	0.41	1.51	3.91	10.34	20.87	36.16	61.72	81.22
Hígado y de las vías biliares intrahepáticas	0.18	0.41	1.29	5.58	12.15	25.79	41.80	61.89
Colon	0.35	1.05	2.71	6.75	13.76	20.31	35.76	47.03
Mama	0.01	0.04	0.09	0.09	0.00	0.39	0.65	1.44
Próstata	0.02	0.06	0.55	5.69	22.36	68.75	180.09	361.69
Mujeres								
Bronquios y pulmón	0.10	0.67	2.07	7.98	14.32	28.30	47.14	62.28
Estómago	0.44	1.59	3.83	9.12	14.09	24.80	43.39	67.21
Hígado y de las vías biliares intrahepáticas	0.16	0.45	1.57	6.69	12.80	26.19	41.72	50.18
Colon	0.24	0.90	2.13	4.45	11.23	16.98	25.73	40.55
Mama	0.40	4.46	14.55	26.74	35.55	38.07	43.39	65.64
Cervicouterino	0.79	3.78	10.44	17.40	22.22	30.25	42.83	54.66

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos C16, C18, C22, C34, C50, C53 y C61.

Fuente: INEGI (2012). *Estadísticas de Mortalidad. Cubos dinámicos*; y CONAPO (2012). *Proyecciones de la Población de México 2010-2050*. Proceso INEGI.

La muerte en pacientes tan jóvenes por CM en nuestro país puede indicar una creciente frecuencia de casos agresivos de esta enfermedad y/o con poca o nula respuesta al tratamiento por parte de las pacientes, quienes en lugar de obtener el mayor beneficio de terapias agresivas, como lo son la quimioterapia no dirigida, terminan sufriendo los estragos de los efectos adversos que en muchas ocasiones deterioran más de lo que ayudan su estado de salud. Lo anterior indica la necesidad de nuevas estrategias de tratamiento, así como la búsqueda de biomarcadores que ayuden a personalizar las opciones de terapias personalizadas para las mujeres mexicanas que padecen CM.

Paradójicamente, el incremento que se está observando en la mortalidad por CM en los últimos años a nivel mundial contrasta con la gran cantidad de información y el manejo de terapias que de esta neoplasia se ha obtenido. Pues el CM ha sido una de las patologías en las que más inversión y más investigaciones se han realizado sobre su caracterización molecular y

manejo vanguardista de terapias dirigidas, desde el siglo pasado. Otro aspecto alarmante sobre el CM, es que la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas de la enfermedad (III y IV) dejando como decisión terapéutica por parte de los médicos, tratamientos con agentes quimioterapéuticos.

Diagnóstico y clasificación del CM.

Anatómicamente, la glándula mamaria está compuesta de ácinos (o glándulas) y de ductos y la mayoría de tumores mamarios surgen en estas últimas estructuras. Los ductos mamarios consisten de dos capas celulares principales; una interna con una capa epitelial luminal bien diferenciada, y una externa a lo largo de la membrana basal. Estas poblaciones pueden ser bien distinguidas por la expresión de ciertos marcadores proteicos utilizando técnicas inmunohistoquímicas e histológicas. Utilizando estos métodos histopatológicos se pueden distinguir diferencias entre tumores mamarios observándose principalmente dos grupos: 1) por un lado el grupo de **CM- luminal** el cual expresa marcadores para citoqueratinas (CK) de bajo peso molecular incluyendo a CK7, CK8, CK18, CK19, MUC1a-6 integrina, BCL2, RE, RP, GATA3 y moléculas epiteliales de adhesión, 2) por otro lado el grupo de **CM-basal** que se caracteriza por la presencia de células mioepiteliales que expresan CK5, CK6, CK14, CK17, Integrina 4, Laminina, Vimentina, EGFR y tiene un índice de proliferación elevada. Típicamente, este último grupo carece de CKs presentes en el grupo luminal y frecuentemente es RE y RP negativo [3]. Esta clasificación histopatológica ha permitido entender mejor el desarrollo del CM y sentar las bases para la clasificación molecular de los tumores de mama, que fue posible hasta la realización de los estudios de microarreglos de expresión.

Los estudios pioneros para la clasificación molecular de los tumores de mama de Perou, Sorlie y cols.[4] en el 2000 y de Abd El-Rehim y cols.[5] en el 2005 distinguen cinco subtipos de CM distintos, cada uno de los cuales tiene un fenotipo definido con respecto al origen y tipo del epitelio celular: luminal y basal. Los subtipos incluyen a dos grupos RE(+) definidos como: **i)** luminal A/RE(+) y **ii)** luminal B/RE(+) y otros tres grupos con receptor de hormonas negativo: **iii)** con sobreexpresión de HER2, **iv)** normal-like y **v)** basal-like. Otros estudios como el de Yu y cols.[6] en el 2004 reprodujeron la clasificación en dos grupos étnicos diferentes observando que la mayoría de los grupos descritos se conservaban entre población asiática y caucásica [6]. Sin embargo, no fue hasta el 2009 cuando Parker y cols [7] publicaron el desarrollo de un conjunto de 50 genes que actúa como un indicador para clasificar los tumores de mama en los cinco subtipos descritos por Perou y cols. [4], este conjunto de 50 genes fueron comparados de acuerdo a su reproducibilidad por tres métodos de predicción de los cuales el método PAM (Prediction Analysis of Microarray) fue el mejor algoritmo según la reproducibilidad en la clasificación de subtipos moleculares, de ahí que el algoritmo PAM50 es hoy en día uno de los métodos más usados para la clasificación molecular de tumores de mama.

Desde que se estableció esta clasificación molecular, se han realizado varios estudios para tratar de correlacionar los subtipos moleculares o firmas genómicas derivadas de análisis de microarreglos con el buen o mal pronóstico del cáncer [8-13] y para estudiar la respuesta o no al tratamiento [12, 14-19]. Sin embargo, la concordancia de la clasificación tradicional por histopatología y la nueva clasificación molecular, no han arrojado resultados satisfactorios y en cambio, han generado controversia; aunque ambos métodos hacen una clara distinción entre los tumores que sobre-expresan HER2, los RE(+) y los RP(+). Estos tres marcadores son críticos para la elección del tratamiento adecuado, dándosele terapia hormonal (tamoxifeno y en ocasiones con quimioterapia) a pacientes positivos para RE y RP y terapia específica

(trastuzumab) para los tumores HER2(+). Estos tratamientos han demostrado mejor efectividad y han impactado en mejorar los periodos libres de enfermedad y la supervivencia [20, 21]. Esta caracterización implica la existencia de un subtipo de cáncer que carece de la expresión de cualquiera de estos tres marcadores y que se ha clasificado como negativo para RE, RP y HER2, denominado por eso, CM triple negativo (**CMTN**) [22-24], para el cual las opciones terapéuticas están limitadas y el pronóstico es pobre. Este subtipo es actualmente objeto de una intensa investigación.

Cáncer de Mama Triple Negativo (CMTN).

Según se describió en el párrafo anterior, los CMTN se definen por la falta de expresión de RE, RP y HER2/neu. Este subtipo representa aproximadamente el 15-30% de todos los tipos de cáncer mamario en diversos estudios retrospectivos. Este subtipo de neoplasia parece ser más frecuente en mujeres premenopáusicas jóvenes, en mujeres con ancestro africano y en mujeres latinoamericanas [25]. Un estudio retrospectivo en México con 110 pacientes reportó 15% de los casos de cáncer mamario precoz en la categoría triple negativo y señaló mayor marcación tumoral para Ki67 [26]. Otro estudio retrospectivo realizado en Arabia Saudita de 113 casos reportó que la edad mediana fue 42 años, 76% eran pre-menopáusicas y 21% tenían historia familiar de cáncer mamario. Los autores observaron que todos los tumores tuvieron una evolución agresiva, aunque la naturaleza retrospectiva y la correlación clínica desfavorable dificultan la interpretación [27]. Sin embargo, los dos estudios anteriores contrastan notablemente con los del trabajo realizado por un grupo italiano, con más de 3,500 pacientes con cáncer mamario precoz, que halló solamente 4% de casos CMTN, e identificó una proporción casi doble de tumores de alto grado (63%) [28]. Debido a la ausencia de conductas de tratamiento sistemáticas específicas, este subgrupo de pacientes suele recibir terapia estándar, aunque

presentan una alta tasa de remisión tumoral y metástasis. Histológicamente, estos tumores son pobremente diferenciados y generalmente se ubican dentro del grupo basal, siendo positivos para las CKs 5 y 6.

Los análisis de expresión global en tejido muestran que estos tumores forman un grupo homogéneo en términos de transcripción de genes, y exhiben similitudes con los cánceres mamarios asociados a mutaciones en el gen BRCA-1. En la búsqueda de marcadores moleculares para este tipo de cáncer, se han observado mutaciones que conducen a la expresión alterada de genes como EGFR, TP53, BRCA1, C-KIT y trastornos en vías metabólicas como apoptosis dirigida por caspasas y BCL. Estos trabajos aislados aún no han sido validados en otros grupos o en otras poblaciones, pero han generado enormes expectativas, pues estos genes podrían ser candidatos, no solo como biomarcadores moleculares, sino como blancos terapéuticos [29-31].

Tratamiento del CM.

El tratamiento a nivel mundial y con énfasis en Estados Unidos de América está basado en guías desarrolladas por expertos, como la asociación estadounidense de oncología clínica (ASCO por sus siglas en inglés), en las cuales se les explica a las pacientes el panorama general del tratamiento disponible para cada caso, dependiendo de las características histopatológicas del tumor, así como las características clínicas de las pacientes. Las opciones del tratamiento, de acuerdo a estas guías, dependen de varios factores entre los que se mencionan:

1. Estadio y grado del tumor.
2. Estado de receptores hormonales (RE, RP) y estado de HER2.

3. Edad de la paciente, estado de salud general y preferencias en la elección del tratamiento.
4. Estado de menopausia de la paciente.
5. Presencia de mutaciones conocidas en los genes hereditarios implicados en el CM (BRCA1 y BRCA2).[32]

En México las decisiones sobre el tratamiento de casos con CM se basan en la norma oficial mexicana *NOM-041-SSA2-2002, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama* [33], la cual describe lo siguiente:

Cirugía: es la extirpación del tumor y del tejido circundante durante una operación. La cirugía también se utiliza para evaluar ganglios linfáticos cercanos axilares. En general, cuanto más pequeño es el tumor, más opciones quirúrgicas tienen las pacientes. Los tipos de cirugía incluyen: 1) Tumorectomía (extirpación del tumor y un pequeño margen de tejido normal “limpio” (sin cáncer) alrededor del tumor) y 2) Mastectomía (extirpación quirúrgica de toda la mama). Los tratamientos quirúrgicos se pueden nombrar como conservador, radical curativo, radical paliativo y reconstructivo según sus características[33]. En los casos de carcinomas in situ, los procedimientos a emplear son la escisión local amplia, escisión local más radioterapia más hormonoterapia, y mastectomía total, mientras que para los tumores con estadios I y II la cirugía es el tratamiento inicial de elección y puede ser radical (mastectomía radical modificada) o conservadora (escisión amplia con márgenes adecuados, disección axilar y radioterapia postoperatoria al tejido mamario). En el caso de tumores de estadio III el tratamiento de inicio es sistémico, seguido de un procedimiento locoregional (cirugía y radioterapia) para posteriormente consolidar con quimioterapia. Finalmente, en tumores de estadio IV, enfermedad diseminada, la

cirugía es únicamente paliativa ya sea en el tumor primario, en los sitios de metástasis, o en ambas[33].

Los procedimientos quirúrgicos iniciales requieren en ocasiones de la combinación de esquemas terapéuticos sistémicos y/o locorregionales complementarios como: la radioterapia (complementaria o paliativa), quimioterapia (neoadyuvante, adyuvante o paliativa) y terapia hormonal (adyuvante o paliativa)[33].

Radioterapia: El uso de radioterapia en carcinomas in situ es un tratamiento conservador que consiste en radioterapia postoperatoria al tejido mamario. Las indicaciones de la radioterapia postoperatoria en estadios I y II se deben utilizar como complemento de cirugía conservadora. En estadio III, el tratamiento de inicio es sistémico, seguido de un procedimiento locorregional (cirugía y radioterapia) para posteriormente consolidar con quimioterapia y en los tumores de estadio IV la radioterapia es paliativa en metástasis óseas y en sistema nervioso central.[33].

Quimioterapia: En estadios tempranos (I y II) el tratamiento es sistémico con quimio y/o hormonoterapia, posterior a tratamiento quirúrgico. Este tratamiento (adyuvante) se aplica a la paciente que fue tratada inicialmente con cirugía, y en la cual existe la posibilidad de recurrencia o recaída local o enfermedad metastásica a distancia (esto determinado por factores pronóstico). La quimioterapia, en términos generales, se debe recomendar en las mujeres menores de 50 años. En pacientes mayores de 50 años con una alta posibilidad de recurrencia, se recomienda el uso de quimio y hormonoterapia secuencial. En estadio III, el tratamiento de inicio es sistémico, seguido de un procedimiento locorregional (cirugía y radioterapia) para posteriormente consolidar con quimioterapia. En enfermedad diseminada (estadio IV) el tratamiento inicial es sistémico, la

quimioterapia si el tumor no posee receptores hormonales, un gran volumen tumoral, hay enfermedad visceral y el crecimiento tumoral es rápido[33].

Terapia dirigida: Terapia hormonal: Este tratamiento se debe recomendar cuando existen receptores hormonales positivos en el tumor independientemente de la edad[33]. La terapia hormonal es otra forma de terapia sistémica. Se usa con más frecuencia como terapia adyuvante para ayudar a reducir el riesgo de que el cáncer regrese después de la cirugía, aunque también puede ser usada como tratamiento neoadyuvante. También se usa para tratar el cáncer que se ha propagado o ha regresado después del tratamiento. Un ejemplo de terapia hormonal es el uso de tamoxifeno, el cual bloquea los receptores de estrógeno en las células cancerosas del seno. Esto evita que el estrógeno se adhiera a las células y le indique que crezcan y se dividan. Aunque el tamoxifeno actúa como un antiestrógeno en las células de mama, actúa como un estrógeno en otros tejidos, como el útero y los huesos. Otro ejemplo de terapia hormonal es el uso de inhibidores de la aromatasa que consiste en tres medicamentos que detienen la producción de estrógeno en las mujeres posmenopáusicas, han sido aprobados para tratar el cáncer de mama tanto avanzado como en etapa inicial: el letrozol (Femara) y anastrozol (Arimidex) y exemestano (Aromasin). Estos medicamentos bloquean una enzima (aromatasa) en el tejido adiposo que es responsable de producir pequeñas cantidades de estrógeno en las mujeres que han pasado por la menopausia. Los inhibidores de la aromatasa no pueden detener la producción de estrógeno por parte de los ovarios, por lo que sólo son eficaces en mujeres cuyos ovarios no están funcionando (como después de la menopausia). Hasta el momento, cada uno de estos medicamentos parece ser tan eficaz como los otros medicamentos en el tratamiento del CM[34].

La elección del tratamiento la hace el médico con consentimiento del paciente. En los casos de CM de estadio temprano como el carcinoma ductal in situ (CDIS) o el CM invasivo de estadio temprano, la elección general es recomendar la ***cirugía*** para extirpar el tumor, extrayéndose además una pequeña área de tejido normal que rodea al tumor para asegurarse de extirpar todo el tumor, sin embargo pueden quedar células cancerígenas en la mama o en otra parte del organismo.

En el caso del CMTN, la norma oficial mexicana *NOM-041-SSA2-2002*, menciona que en los casos de tumores con receptores hormonales negativos, un gran volumen tumoral, hay enfermedad visceral o el crecimiento tumoral es rápido, la elección a tratamiento es quimioterapia sistémica, ya sea adyuvante o neoadyuvante. Está descrito que los tumores triple negativos son más sensibles a regímenes de quimioterapia, sin embargo tienen periodos más cortos de recurrencia y sobrevida, lo que los caracteriza como tumores agresivos y de mal pronóstico. Dado lo anterior, el desarrollo de metodologías que permitan identificar blancos terapéuticos en estos tumores es de gran importancia, así como encontrar firmas genéticas que permitan predecir la buena o mala respuesta al tratamiento sistémico con quimioterapia.

1.2. Abordaje molecular y genómico en cáncer de mama

El primer abordaje molecular en CM fue a partir del descubrimiento de los genes BRCA1 y BRCA2, los cuales han sido asociados al CM hereditario y/o familiar como los genes de alta penetrancia. La penetrancia es el riesgo que cada mutación confiere de desarrollar CM y/u ovario. Basados en los datos de múltiples casos familiares, The Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC) ha estimado que las mujeres portadoras de mutaciones en BRCA1 tienen un riesgo acumulado para CM de 87% y de ovario del 44% a la edad de 70 años[35]. El riesgo estimado para mujeres portadoras de mutaciones en BRCA2 es de 84% para CM y de 27% para cáncer de ovario [36]. El gen BRCA1 está compuesto de aproximadamente 100 kb de DNA genómico y tiene 24 exones de los que 22 son transcritos. Su estructura es inusual, con la mayoría de los exones en el rango esperado de 100-500 pb, pero con el exón 11 constituyendo aproximadamente el 60% (alrededor de 3500 pb) de la región codificante. Origina un RNAm de 7.8 kb de longitud del cual se traducen 5592 nucleótidos, produciendo una proteína de 1863 aminoácidos [37]. Después del descubrimiento del gen BRCA1, se observó que muchas de las familias con un patrón claramente hereditario no presentaban mutaciones en este gen, por lo que se sospechó la existencia de un segundo gen o más genes de susceptibilidad al CM. Progresos iniciales para la identificación de ese segundo gen siguieron al análisis de ligamiento de 22 familias con múltiples casos de aparición temprana de CM y al menos un caso de cáncer de ovario, pero que no presentaban ligamiento con marcadores en el gen BRCA1 [38]. Esos estudios dieron como resultado la localización de este segundo gen, en el cromosoma 13 en las bandas 13q12-13; más específicamente en una región flanqueada por los marcadores D13S289 y D13S267 [39]. El gen BRCA2 está compuesto de aproximadamente 70 kb de DNA genómico y tiene 27 exones, de los cuales 26 son transcritos. Al igual que para BRCA1, la mayoría de los

exones están en el rango esperado de 100-500 pb, pero con un exón 11 constituyendo aproximadamente la mitad de la región codificante. Origina un RNAm de 14.5 kb de longitud que es traducido en una proteína de 3418 aminoácidos [40]. Además de estos genes existen otros genes de baja penetrancia que han sido asociados al CM como son: CHEK2, ATM, BRIP1, PALB2, CASP8, TGFB1, RAD51 y Abraxas. [41]

La estrategia de buscar genes candidatos en alguna enfermedad tiene la ventaja de ser una estrategia rápida y barata para detectar mutaciones en genes de los cuales se sospecha sean la principal causa genética de una enfermedad, sin embargo en enfermedades complejas y multigénicas, como es el cáncer, el analizar un solo gen puede perder la perspectiva general de lo que pasa en el microambiente del tumor. A pesar de esto, la búsqueda de mutaciones o de patrones de expresión modificados en genes candidatos nos puede ayudar a encontrar biomarcadores con valor diagnóstico, pronóstico y/o de respuesta a tratamiento.

La importancia del gen BRCA1 ya se ha mencionado en párrafos anteriores, además de este gen, existen otros genes importantes como EGFR, TP53 y PTPN12 que participan en procesos celulares claves para el desarrollo del tumor como es la proliferación, diferenciación y arresto del ciclo celular. La expresión de estos genes solo han sido analizados de manera aislada y en ocasiones en otros tipos de tumor y no en CM. Este conjunto de cuatro genes nos puede indicar la respuesta al tratamiento neoadyuvante en pacientes con CM. Por esta razón, en este estudio se analizó la expresión de estos cuatro genes mediante PCR en tiempo real en muestras de tejido de CM antes y después del tratamiento.

BRCA1

El gen BRCA1 codifica para una fosfoproteína con importancia en la estabilidad genómica, es considerado un gen supresor de tumores. La proteína codificada por BRCA1 participa también en la transcripción, reparación de DNA en roturas de doble cadena, y en la recombinación. Las mutaciones en este gen son responsables de aproximadamente 40% de los tumores de mama hereditarios y más del 80% de los tumores de mama y ovario hereditarios.

A pesar de que el gen BRCA1 ha sido relacionado con la presencia de CM hereditario, no se encuentran estudios sobre la expresión del mRNA en tumores de mama. Recientemente, en muestras de cáncer de esófago, Gao y colaboradores[42] analizaron la expresión de este gen y la correlacionaron con tasas de respuesta a tratamiento de quimioterapia o quimio-radioterapia basadas en cisplatino o docetaxel, encontrando que la expresión del mRNA de BRCA1 puede ser un marcador predictivo y pronóstico en pacientes con cáncer de esófago que pasen por tratamiento de primera línea basados en estos medicamentos[42]. En otro estudio, pero de cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico, Santarpia y colaboradores, evaluaron la expresión de once genes entre los cuales incluían a BRCA1 en muestras de pacientes con resultados de quimioterapia basada en platino, encontrando que la combinación de la expresión de BRCA1 y el gen AEG-1 (astrocyte elevated gene-1) como un probable modelo pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico [43].

EGFR

El gen EGFR codifica para una glicoproteína transmembranal miembro de una superfamilia de proteín-quinasas. Dicha proteína es un receptor de membrana de la familia de factores de crecimiento epidérmico, que al unirse a su ligando induce la dimerización del receptor y la

autofosforilación de la parte tirosina de la proteína y desencadena la proliferación celular. Las mutaciones en este gen han sido asociadas principalmente a cáncer de pulmón, sin embargo al ser miembro de la superfamilia de factores de crecimiento epidermal, y sabiendo que el miembro 2 de dicha familia (HER2) es un blanco terapéutico en tumores de mama, es importante evaluar la expresión del gen EGFR en tumores de mama.

La expresión del mRNA del gen EGFR en tumores de mama ha sido reportado previamente por Meseure y colaboradores[44] reportando una baja expresión en los tumores de mama en general, pero al agrupar dichos tumores de acuerdo a su estado de RE, RP y HER2, se reveló que los tumores triple negativos tienen una sobre expresión de este gen, mientras los tumores que no son CMTN tienen una expresión baja[44]. Sin embargo es necesario validar estos resultados en nuestra población.

PTPN12

La proteína codificada por el gen PTPN12 es miembro de la familia tirosina- fosfato y regulan una gran variedad de procesas celulares como el crecimiento celular, diferenciación celular y ciclo mitótico, así como la transformación oncogénica. Esta proteína se ha descrito que se une y desfosforila el producto del oncogen c-ABL y por lo tanto puede tener un papel en la oncogénesis. Además este gen ha sido descrito como un gen supresor de tumores en el CMTN[45].

El gen PTPN12 se ha descrito con bajos niveles de expresión (tanto de mRNA como de proteína) en tumores de mama provenientes de China, no solo en los tumores triple negativos, Además la baja expresión de PTPN12 ha sido correlacionada con el tamaño tumoral, la metástasis a nódulos linfáticos, metástasis a distancia, el grado histológico y el tiempo de sobrevida[46]. Xunyi

y colaboradores también encontraron hipermetilación en islas CpG en el promotor del gen que ocurría más frecuentemente en casos de CM, así como en líneas celulares de CM con baja expresión del mismo gen[46]. La baja expresión de la proteína también ha sido confirmada por Wu y colaboradores[47] pero en tumores de CMTN, en la misma población.

TP53

Este gen es un gen supresor de tumores cuya proteína responde al estrés celular para regular la expresión de genes blanco, induciendo el arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del DNA o cambios en el metabolismo celular. Las mutaciones en este gen están asociadas con una gran variedad de tipos de cáncer

En CM recientemente se ha reportado sobre expresión de la proteína de p53 en población de Japón. Además la sobre expresión de esta proteína fue asociada a una buena respuesta a la terapia neoadyuvante con antraciclinas y taxanos, esto medido en muestra de biopsia con aguja gruesa antes del tratamiento[48]

Perfiles de expresión genómica, firmas genéticas y CM.

La gran variabilidad que existe entre cada tumor en las pacientes con CM se refiere a menudo a la **heterogeneidad intertumoral** se reconoce clásicamente a través de diferentes tipos de morfología, subtipos de expresión, o clases de patrones de número de copias genómicas, entre otras diferencias. La variación dentro de un solo tumor, **heterogeneidad intratumoral**, ha sido durante mucho tiempo observado por histopatólogos como sectores de diferente morfología o comportamiento de tinción dentro del mismo tumor y más recientemente ha sido definida a nivel molecular por las diferencias genéticas observadas en las subpoblaciones de tumores e incluso entre células malignas individuales. A medida que empezamos a entrar en la era del genoma

completo de secuenciación de ADN, una gran cantidad de datos está comenzando a emerger a arrojar luz sobre la evolución del cáncer.

El primer trabajo que hizo el análisis de expresión considerando paneles de genes en lugar de genes individuales fue el trabajo de Perou y colaboradores [4], en donde con la ayuda de perfiles moleculares (utilizando microarrays de DNA complementarios que representaban 8.102 genes humanos) se logró clasificar los tumores de mama, generando un retrato molecular distintivo de cada tumor. Después de este trabajo, han surgido una serie de aproximaciones que tratan de correlacionar los perfiles de expresión genómica con factores pronósticos, y el primer estudio que tuvo éxito en esto fue el trabajo de van de Vijver y colaboradores [9], el cual describió una firma genética de 70 genes que predicen el buen o mal pronóstico en mujeres jóvenes con CM, mientras el estudio realizado por Paik y colaboradores [49] analizó 21 genes que predicen la recurrencia del CM en pacientes con tratamiento con Tamoxifeno, ambos trabajos han puesto las bases para el uso de firmas genéticas con valor pronóstico para la enfermedad y tratamiento en la práctica clínica diaria, siendo ambas firmas las únicas hasta el momento comercializadas como MammaPrint y OncotypeDX respectivamente.

En cuanto a la predicción de la respuesta al tratamiento con quimioterapia (muy común en nuestro país) existen dos trabajos que evalúan la respuesta a tratamiento neoadyuvante, abordaje que permite evaluar muestra de tejido en el momento de la biopsia y después del tratamiento con quimioterapia en el momento de la cirugía, lo que nos ayuda a realizar un análisis en el tejido de la expresión diferencial causada por el tratamiento aplicado. El estudio de Gonzalez-Angulo y colaboradores [50] evaluó 21 pacientes con muestras pareadas de antes y después del tratamiento neoadyuvante encontrando que en algunas pacientes entre las muestras de biopsia y cirugía había diferente subtipo molecular, causado probablemente por los cambios

en el porcentaje de celularidad de una muestra y otra, además describió algunas vías de señalización enriquecidas en las muestras después del tratamiento (metabolismo y biosíntesis de energía) y otras empobrecidas (células inmunes y vía Sonic hedgehog). Por otro lado, Vera-Ramirez y colaboradores evaluaron 33 pacientes con muestras pareadas de tejido antes y después del tratamiento (el mismo tratamiento neoadyuvante en todos los casos) y entre sus hallazgos principales tenemos un conjunto de 30 genes que describen con un cambio positivo en la respuesta a la quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos en pacientes con buena respuesta patológica al tratamiento, estos genes están en común pero con diferente expresión entre un grupo de buena respuesta y mala respuesta. Además incluyen análisis de redes de los genes relacionados quimiorresistencia, supervivencia, invasión y migración. El análisis de vías reveló que las redes del transcriptoma se centran en dos genes: CTNNB1 y HIF1.

En nuestro país los estudios de perfiles de expresión se han limitado a dos trabajos (García y cols. 2005 y Valladares y cols. en el 2006) en los cuales se han descrito la expresión genómica con microarreglos que comparan entre tejido tumoral y tejido normal de mama, sin evaluar el tratamiento[51, 52]. García y cols., encontraron sobre expresado el gen bik/NBK en 14 de 15 muestras, sugiriendo el probable papel de éste como un factor pronóstico y/o posible objetivo terapéutico en el tratamiento de CM, mientras que Valladares y cols., en su estudio, sugieren la utilidad de la estrategia utilizada por ellos para identificar nuevas regiones cromosómicas y genes involucrados con el desarrollo de procesos neoclásicos y objetivos terapéuticos. En este trabajo se realizó un análisis de expresión diferencial en muestras de tejido antes y después del tratamiento para identificar firmas genómicas que puedan predecir el pronóstico en las pacientes.

Secuenciación masiva como una alternativa en el estudio de CM.

Desde el estudio de genes candidatos de alta penetrancia para el CM (BRCA1/2) se ha utilizado la metodología de secuenciación de Sanger para encontrar o confirmar probables mutaciones en estos genes o en los de baja penetrancia, sin embargo a partir del primer borrador del proyecto del genoma humano se ha observado un fuerte adelanto tecnológico en los últimos años en el área de la secuenciación, lo que ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías para la secuenciación masiva, con la cual es posible secuenciar no solo una parte del gen o un solo gen por completo, sino evaluar la secuencia de múltiples genes y muestras de manera simultánea de manera más factible física y económicamente. Sin embargo, se encuentran actualmente disponibles sólo para un puñado de casos de alta resolución de datos de secuencias de ADN, y en el nivel actual de la tecnología, la incorporación de la secuenciación del genoma completo en los ensayos clínicos es muy problemático. El reto es hacer el mejor uso del gran cuerpo de conocimiento que se ha adquirido utilizando métodos de resolución más baja para dirigir los estudios de NGS para tener el mayor impacto en el manejo clínico de la enfermedad. Uno de los abordajes actuales, en lugar de la secuenciación del genoma completo es la secuenciación en paralelo de grupos de genes candidatos mediante NGS. Existen varias casas comerciales que han lanzado sus plataformas para NGS y a la vez han diseñado estuches que permiten secuenciar paneles de genes para determinadas características clínicas, entre ellas están los paneles de genes para cáncer. Estos estuches incluyen los reactivos necesarios para la amplificación y generación de librerías de secuencias de genes asociados a cáncer, y de esta manera en ensayos rápidos y no muy costosos se obtienen las secuencias de los genes seleccionados en varias muestras de tumores, en una sola corrida.

Una de estas plataformas es la secuenciación por semiconductores (Ion Torrent) que ha tenido auge en los últimos años. Esta plataforma se basa en la detección de cambios en el pH definidos por la liberación de iones de hidrogeno al unirse un nuevo nucleótido en la cadena de DNA en proceso de síntesis. El uso de plataformas de secuenciación de nueva generación, como Ion Torrent, se ha aplicado en investigaciones sobre cáncer en muestras difíciles como lo son: ácidos nucleicos circulantes aislados de plasma[53], muestras de aspiración de aguja fina de tumores sólidos (frescos o de bloques de células) y biopsias de tejido fijado en formol y embebido en parafina (FFPE)[54]. En el caso de DNA genómico (gDNA) proveniente de muestras de tejido FFPE, el desarrollo de metodologías que parten de una cantidad muy pequeña de DNA para la construcción de librerías como AmpliSeq ha ayudado a evaluar la secuencia en regiones de interés de un gran número de genes de manera simultánea en muestras con baja concentración[55] y calidad del DNA. Mediante la amplificación simultánea de productos de PCR múltiples y su posterior secuenciación, la metodología de AmpliSeq-IonTorrent tiene gran utilidad en la búsqueda de conjuntos de mutaciones en un mayor número de muestras[56]. La combinación de la metodología de AmpliSeq con la secuenciación basada en semiconductores permite una manera rápida de genotipificar muestras de cáncer usando un panel de genes relacionados con cáncer con una profundidad de lecturas promedio de 2000X en corto tiempo[57]. Esta metodología ha sido aplicada ya en varios estudios, por ejemplo el trabajo de Lu y cols. [58] en el cual utilizan un panel de genes relacionados con enfermedades hereditarias (Inherited Disease Panel) que es capaz de amplificar las regiones codificantes de 328 genes (FBN1, TGFBR1 y TGFBR2), en este caso se buscaba analizar mutaciones en pacientes con el síndrome de Marfan, usando muestras de DNA de sangre periférica logrando identificar mutaciones patogénicas en el gen FBN1, validando todas las mutaciones con secuenciación de Sanger[58]. Otros estudios han validado ya sea el Cancer Panel (utilizado en el presente trabajo)

o paneles personalizados en distintos tipos de cáncer como es el cáncer de pulmón de células no pequeñas [59, 60]. La validación de esta metodología también ha sido evidenciada en varias ocasiones, por ejemplo en el estudio de Singh y cols.[61], en el cual se analizaron 70 muestras de tejido FFPE cuyo DNA fue utilizado para amplificar regiones incluidas en el Cancer Panel. De estas 70 muestras se conocía mutaciones en 22 especímenes y se secuenciaron al mismo tiempo 48 especímenes en otras plataformas de secuenciación (Sequenom MassArray System y secuenciación de Sanger). Las variantes encontradas fueron confirmadas con plataformas alternas a excepción de una (una sustitución de un solo nucleótido)[61]. Por otra parte, Beadling y cols.[57] validaron también el Cancer Panel usando 45 muestras de tejido tumoral FFPE, de las cuales de 29 ya conocía la presencia de 53 mutaciones puntuales y 19 indels detectados usando genotipificación por espectrofotometría de masas (Sequenom MassArray)[62], teniendo una sensibilidad del 100% (95% IC=97.3-100%) y una especificidad del 95.1% (95% IC=91.8-98%), esto en la detección de mutaciones puntuales.

En este trabajo utilizaremos esta metodología (análisis de paneles de genes mediante NGS) en un grupo de muestras embebidas en parafina. La ventaja del uso de paneles de genes como el AmpliSeq radica en la capacidad de analizar si no el genoma completo o un gen completo, si puntos calientes de mutaciones o “hot spots” de genes de interés, usando muestras valiosas pero con dificultad para obtener DNA de buena calidad y cantidad como exigen protocolos de secuenciación de Sanger o tradicional, como lo son muestras de tejido FFPE. En el caso de los tumores de CMTN, al ser poco frecuentes, es difícil recolectar una muestra grande de pacientes en forma prospectiva, por lo que el uso de muestras de tejido FFPE de tumores de CMTN puede facilitar el análisis y la búsqueda de probables blancos terapéuticos en estos tumores que carecen de terapia dirigida.

2. JUSTIFICACIÓN

El CM es un problema de salud a nivel mundial, en nuestro país es frecuente el diagnóstico de tumores de mama en etapas avanzadas, donde la terapia dirigida no es viable, por lo que gran parte de las pacientes atraviesan por un proceso de quimioterapia sistémica con una respuesta al tratamiento adyuvante o neoadyuvante muy variado. A pesar de la gran cantidad de trabajos de investigación que se publican cada año aun es necesaria la búsqueda de biomarcadores y blancos terapéuticos para personalizar el tratamiento oncológico, así como el desarrollo de indicadores predictivos de la buena o mala respuesta al tratamiento de quimioterapia sistémica. La búsqueda masiva de dichos biomarcadores se ha incrementado gracias al uso de microarreglos de expresión, así como de secuenciación masiva; metodologías que permiten analizar los cambios en perfiles de expresión y además la presencia de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que pueden ser responsables de la agresividad del tumor y/o de la variabilidad en la respuesta de las pacientes al tratamiento. Por lo que el desarrollo de firmas genéticas con valor predictivo que ayuden a la conocer *a priori* la respuesta al tratamiento, así como la identificación de nuevos blancos terapéuticos en CMTN es una prioridad en nuestro país.

En este trabajo se utilizaron métodos moleculares y plataformas genómicas para identificar biomarcadores de valor pronóstico y de respuesta a tratamiento, en un grupo de muestras provenientes de pacientes con CM, antes y después del tratamiento.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar vías de señalización afectadas en pacientes con CM mediante perfiles de expresión global, expresión de genes candidatos y secuenciación masiva que permitan la identificación de biomarcadores, firmas genéticas con valor pronóstico y blancos terapéuticos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar los perfiles de expresión global mediante microarreglos de expresión en pacientes con CM antes y después del tratamiento *.
2. Analizar y comparar la expresión de los genes BRCA1, EGFR, PTPN12 y TP53 *.
3. Evaluar la presencia de mutaciones de un panel de genes relacionados con cáncer en un grupo de pacientes con CM por secuenciación de nueva generación.
4. Identificar y seleccionar blancos moleculares o rutas de señalización que determinan la naturaleza del tumor para proponerlos como marcadores en la decisión terapéutica.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Materiales

Consumibles

Material requerido para la toma de muestras: agujas y tubos con anticoagulante EDTA de BD Vacutainer (Franklin Lakes, NJ), aguja de TruCut número 14 Gauge de Bard® (Tempe, AZ), tubos de plástico de 2 mL de Corning (Corning, NY).

Material requerido para la extracción de ácidos nucleicos: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), hojas de bisturí de Hergom (México, D.F.), cajas Petri de SyM laboratorios (Puebla, Puebla), puntillas de 10, 20, 100, 200, 1000 uL, tubos de 15 mL y criotubos de 2 mL de Corning (Corning, NY) y perlas de acero de 5 mm (Satinless Steel Beads 5mm) de Qiagen (Maryland, USA).

Material requerido para análisis qPCR Tiempo Real: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), puntillas de 10, 20, 100, 200, 1000 uL de Corning (Corning, NY), placas y films para termociclador ABI PRISM 7000 de Life Technologies (Carlsbad, CA).

Material requerido para microarreglos: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y puntillas de 10, 20, 100, 200, 1000 uL de Corning (Corning, NY).

Material requerido para secuenciación tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), puntillas de 10, 20, 100, 200, 1000 uL y kit para filtración de 500 mL de Corning (Corning, NY), placas y films para termociclador ABI PRISM 7000 de Life Technologies (Carlsbad, CA).

Reactivos

Reactivos requeridos para la toma de muestras: RNAlater de Qiagen (Maryland, USA) y etanol de J.T. Baker (USA).

Reactivos requeridos para la extracción de ácidos nucleicos: Xilol y Etanol de J.T. Baker (USA), Histopaque, y PBS de Sigma-Aldrich (Seelze, Alemania), RNeasy Fibrous tissue mini kit, DNeasy Blood and Tissue kit, QIAamp DNA FFPE Tissue kit de Qiagen (Maryland USA), Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit de Invitrogen (Carlsbad, CA), Experion RNA Analysis Kits, Agarosa, TRIS, EDTA, buffer de carga, marcador de peso molecular 100-1000 y Bromuro de Etidio de Bio-Rad (Hercules, CA) y ácido bórico de Amresco (Solon, OH).

Reactivos requeridos para análisis qPCR Tiempo Real: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Sondas TaqMan (EGFR: Hs01076078_m1, PTPN12: Hs00184747_m1, BRCA1: Hs01556193_m1, PT53: Hs01034249_m1) y TaqMan Universal Master Mix de Life Technologies (Carlsbad, CA) y Agua grado molecular Accugene (Walkersville, Maryland).

Reactivos requeridos para microarreglos: GeneChip 3'IVT Express Kit y GeneChip Hybridation, Wash and Stain kit de Affymetrix (Santa Clara, CA), Experion RNA Analysis Kits de Bio-Rad (Hercules, CA) y etanol de J.T. Baker (USA).

Reactivos requeridos para secuenciación: kit Ion AmpliSeq™ Cancer Panel v1 (primer pool), Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0, Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit, kit Ion Library Quantitation Kit, Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL, Ion Sphere™ Quality Control Kit, Ion PGM™ 200 Sequencing Kit y Ion 316™ Chip Kit de Life Technologies (Carlsbad, CA), etanol de J.T. Baker (USA) y Agencourt AMPure XP de Beckman Coulter (Pasadena, CA).

Material Biológico

Muestras: Tejido fresco de mama (biopsia y cirugía), tejido de mama embebido en parafina, sangre periférica con EDTA y ácidos nucleicos: DNA genómico (gDNA), RNA total (RNA), DNA complementario (cDNA), RNA amplificado (aRNA).

Equipo

Equipo utilizado para la toma de muestras: Centrifuga para tubos 2 mL y 15 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York).

Equipo utilizado para la extracción de ácidos nucleicos: Centrifuga tubos 2 mL, Thermomixer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), TissuLyser de Qiagen (Maryland, USA), Experion™ Automated Electrophoresis Station, cámara electroforesis, transiluminador GelDoc XR fuente poder PowerPac HC de Bio-Rad (Hercules, CA), Qubit fluorometer de Life Technologies (Carlsbad, CA), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York) y Nanodrop de Thermo Scientific (Willminton, DE).

Equipo utilizado para análisis de PCR en Tiempo Real (qPCR): Termociclador veriti y ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System de Life Technologies (Carlsbad, CA), Campana de PCR de UVP (Upland, CA), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York) y centrifuga minispin de Labnet (Edison, NJ).

Equipo utilizado para microarreglos: Termociclador GenAmp de Pelkin Elmer (Waltham, Massachusetts), thermomixer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Nanodrop de Thermo Scientific (Willminton, DE), Experion™ Automated Electrophoresis Station de Bio-Rad (Hercules, CA), GeneChip Hybridation Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450 y GeneChip Scanner 3000

7G de Affymetrix (Santa Clara, CA), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York) y minispin de Labnet (Edison, NJ).

Equipo utilizado para secuenciación: Termociclador y Experion™ Automated Electrophoresis Station de Bio-Rad (Hercules, CA), Campana PCR de UVP (Upland, CA), vortex de Scientific industries (Bohemia, New York), minispin de Labnet (Edison, NJ), ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System, Qubit fluorometer, Ion OneTouch™, Ion OneTouch™ ES y Ion PGM™ System de Life Technologies (Carlsbad, CA).

Programas computacionales

GeneChip Command Console Software (AGCC) y GeneChip Console Software de Affymetrix (Santa Clara, CA), DataAssist v3 y Software Partek de Life Technologies (Carlsbad, CA), CLC Sequence Viewer 6 y Ingenuity Pathways Analysis de Qiagen (Maryland, USA).

4.2. Lugar donde se realizó el estudio.

Este proyecto se llevó a cabo en el departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación de esta misma Universidad. Las muestras fueron recolectadas del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de esta Universidad.

4.3. Diseño del estudio.

Se trató de un estudio basado en dos grupos independientes de pacientes, el primero fue una cohorte (análisis de perfiles de expresión y genes candidatos) de tipo prospectiva, longitudinal, comparativa y observacional en la que se utilizó sangre y muestras de tejidos frescos, mientras la

segunda fue un estudio transversal (análisis de paneles de genes mediante secuenciación de nueva generación) de tipo retrospectivo y observacional en muestras embebidas en parafina.

4.4. Población de estudio.

Características de la población:

- a) Grupo 1: Se evaluaron pacientes que acudieron con un nódulo mamario, por sospecha de malignidad. Se incluyeron únicamente las pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma ductal invasor de glándula mamaria, con base a criterios clínicos e histopatológicos realizados por médicos oncólogos y patólogos del hospital participante, que reunieron los criterios de inclusión y que fueron sometidas a cirugía.
- b) Grupo 2: se recolectaron muestras de tejido embebido en parafina (FFPE) de pacientes con CMTN atendidas en el Hospital Universitario “Dr José Eleuterio González” durante el año 2004-2009, basándose en los criterios de selección.

Criterios de selección:

- a) Grupo 1: **Criterios de inclusión:** a) Sexo femenino, b) mayor de 18 años, c) programada a tratamiento neoadyuvante de Adriamicina y Cliclofosfamida, d) con tumor residual posterior a la biopsia percutánea, e) tumores >5 cm, f) ganglios clínicamente positivos y g) que acepte entrar al estudio. **Criterios de no inclusión:** a) Historia o presencia de otra neoplasia, b) que no acepte entrar al estudio, c) que no vaya a ser sometida a cirugía, d) que tenga tratamiento diferente y/o e) paciente embarazada. **Criterios de eliminación:** a) Información incompleta, b) material escaso de muestras para el análisis y/o c) muestras degradadas.

- b) Grupo 2: Criterios de inclusión: a) sexo femenino, b) mayor de 18 años, c) con CMTN confirmado por histopatología e inmunohistoquímicas. Criterios de eliminación: a) Información incompleta, b) material escaso de muestras para el análisis y/o c) muestras degradadas.

4.5. Método de muestreo y definición de variables.

El método de muestreo utilizado es no probabilístico por conveniencia y las variables del estudio son las siguientes:

Variable dependiente: Respuesta al tratamiento. Evaluada por el médico, disminución/desaparición del tumor, no presencia de metástasis. Tipo de variable: categórica. Respuesta Patológica Completa (RPC), cuando el tumor ha desaparecido y en la muestra de cirugía no se presentan células tumorales en el estudio histopatológico. Respuesta Clínica Parcial (RCP), cuando hay una disminución en el tumor pero aún existe tejido tumoral residual en la muestra de cirugía al evaluarlo histopatológicamente. No Respuesta (NR), cuando el tamaño del tumor no ha disminuido o incluso aumenta después del tratamiento, evaluado clínica e histopatológicamente.

Variable independiente: Perfiles de expresión genómica; analizada por microarreglos para evaluar la expresión de genes que estén involucrados con la respuesta al tratamiento. El análisis bioestadístico nos mostrará que genes están sobre expresados o sub expresados. Tipo de variable: binomial, sobre-expresado o sub-expresado. Presencia de mutaciones, analizada por secuenciación masiva en genes relacionados con cáncer, tipo de variable: binomial, presencia o no de variante o mutación.

4.6. Tipos de muestras.

- A. Tejido: 1) Biopsia: Se procedió a realizar la biopsia confirmatoria, realizándose en forma convencional por parte del médico tratante en forma percutánea con aguja de True Cut número 14 Gauge (Bard®). Los seis a ocho especímenes se enviaron a estudio histopatológico y de inmunohistoquímica en forma rutinaria por el laboratorio de patología. Dos muestras son reservadas en fresco conservadas en RNA later y colocadas en refrigerador a -80 °C para extracción posterior de DNA y RNA. 2) Cirugía: Después del tratamiento con quimioterapia se sometió a las pacientes a cirugía donde el médico cirujano extrajo tejido del tumor residual si existía, o tomó una muestra de tejido en el lugar donde se realizó la biopsia (lugar marcado en la biopsia).
- B. Sangre: Una vez confirmado el diagnóstico de CM, fue solicitado a la paciente que donara una muestra de 5ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA, al mismo tiempo que se le toman las muestras para los estudios de rutina antes de iniciar el tratamiento, de esta manera no se hizo punción adicional. Además en el momento de la cirugía después del tratamiento de quimioterapia también fue tomada una segunda muestra de sangre periférica de 5 ml en un tubo con anticoagulante EDTA. De las muestras de sangre fue separado el plasma que se almacenó a -80°C para uso posterior (no incluido en este proyecto) y de las células DNA y RNA fueron extraídos.
- C. Tejido embebido en parafina: Se realizó la selección de expedientes de pacientes con CM que contaran con resultados de patología en el hospital participante del año 2004-2009, y cuyos resultados de inmunohistoquímica indicaran tumores triples negativos. Se seleccionaron aquellas muestras en las que se pudo confirmar el diagnóstico y los resultados de inmunohistoquímica y se tomaron dos cortes con microtomo (8 micras) de

cada bloque del tejido embebido en parafina y fijado en formol. De cada corte se realizó extracción de DNA.

4.7. Descripción del Diseño:

1. Se identificaron a las pacientes que cumplían con los criterios de inclusión para este estudio y se les tomó muestra de tejido por medio de biopsia programada por su médico, además se solicitó una muestra de sangre periférica.
2. El diagnóstico histopatológico se realizó junto con la clasificación de las muestras con marcadores de receptor de estrógenos, receptor de progesterona y la amplificación del gen HER2-neu.
3. Las pacientes con CM fueron sometidas a un tratamiento de Adriamicina/Ciclofosfamida y después de concluido el tratamiento fueron sometidas a cirugía.
4. Se tomaron dos muestras de tejido y sangre periférica, una antes y una después del tratamiento indicado.
5. En el caso de las muestras de tejido embebido en parafina se realizó una búsqueda retrospectiva de los tumores triple negativos y los que llenaron los criterios de selección fueron muestreados a partir de bloques de parafina.
6. A partir de las muestras de tejido se llevaron a cabo extracciones de RNA y DNA, y de las muestras de sangre se realizaron extracciones de DNA. Todas las muestras de RNA y DNA obtenidas fueron almacenadas en un bio-banco de ácidos nucleicos.
7. El RNA del tejido fue utilizado para obtener los perfiles de expresión globales por microarreglos y de genes candidatos (BRCA1, EGFR, TP53 y PTPN12) mediante PCR en tiempo real.

8. Con el DNA proveniente del tumor embebido en parafina se realizó la búsqueda de mutaciones usando un panel de genes relacionados con cáncer, mediante secuenciación por semiconductores.
9. Los datos obtenidos fueron analizados para obtener los perfiles de expresión y por otra parte la presencia de variantes o mutaciones importantes.
10. Se compararon los resultados de expresión y se correlacionaron con la respuesta o no al tratamiento por parte de la paciente. Mientras que de las muestras analizadas por secuenciación se realizó una búsqueda exhaustiva de las mutaciones más comunes entre las pacientes, su efecto en la proteína y su existencia en otras bases de datos.
11. Se obtuvieron genes claves en la respuesta al tratamiento en pacientes con CM, así como vías de señalización que concuerdan entre los resultados de perfiles de expresión y secuenciación masiva.

4.8. Esquema general del estudio



Figura 2 Esquema general del estudio. Representación gráfica de la manera en que se realizó el

4.9. Metodología experimental

La metodología utilizada en este proyecto se describe a continuación:

Extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos;

La sangre fue dividida en 2 alícuotas. Estas fueron usadas para extracción de DNA y RNA usando estuches de Qiagen.

La extracción de DNA y RNA fue hecha a partir del tejido congelado, 30 mg máximo de tejido fueron utilizados y después de homogenizarse en el Tissulyser la extracción de RNA total fue realizada. El método de digestión con proteinasa K fue utilizado, así como la purificación por columnas de Qiagen DNeasy en el caso de gDNA. Para la extracción de RNA de las biopsias fue usado el kit de Qiagen RNeasy que permite la obtención de RNA de excelente calidad en biopsias pequeñas de tejido. En todos los casos, se siguieron las instrucciones de las casas comerciales. La calidad del DNA y RNA fue determinada mediante electroforesis convencional utilizando geles de agarosa al 1% (DNA) y electroforesis capilar utilizando el Experion™ Automated Electrophoresis Station (RNA) y la cuantificación fue determinada mediante el equipo NanoDrop ND8000.

A partir de aproximadamente 30 mg de cortes de tejido embebido en parafina la extracción de gDNA fue realizada usando el kit QIAamp DNA FFPE Tissue siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cuantificación del gDNA se realizó usando el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit, obteniéndose al menos 10 ng de gDNA.

Análisis de qPCR tiempo real EGFR, BRCA1, PTPN12 y TP53

Se analizaron muestras de mujeres con CM antes y después del tratamiento mediante tiempo real (qPCR) y sondas TaqMan. Para realizar este ensayo, se utilizó RNA total extraído a partir de tejido de biopsia y cirugía de las pacientes. Se realizó una reacción de retro-transcripción con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, y a partir del cDNA se realizaron los análisis de cuantificación mediante amplificación por sondas TaqMan para cada gen (EGFR: Hs01076078_m1, PTPN12: Hs00184747_m1, BRCA1: Hs01556193_m1, PT53: Hs01034249_m1). La plataforma ABI PRISM® 7000 Sequence Detection fue usada, además b-actina y GAPDH fueron utilizados como genes reporteros para la cuantificación relativa de la expresión.

Perfiles de expresión y clasificación molecular de los tumores

Los perfiles de expresión genómica fueron definidos con el uso de microarreglos utilizando el protocolo de Affymetrix GeneChip 3'IVT Express Kit como se describe a continuación: A partir de 28 pacientes seleccionadas se obtuvieron muestras de RNA total, y se realizó la preparación de controles poly A y su agregado al RNA total, posteriormente se sintetizó la primera y segunda cadena de cDNA, para a partir del cDNA realizar la transcripción in vitro (IVT) y generar aRNA (RNA amplificado) marcado. El aRNA marcado fue purificado usando perlas magnéticas, las cuales se unieron en primera instancia al aRNA y usando un magneto fueron retenidas mientras fueron lavadas con etanol y soluciones de lavado, y finalmente se eluyeron en una solución de elución donde obtuvimos aRNA marcado purificado. El aRNA marcado y purificado fue evaluado por NanoDrop ND8000 para saber si se obtuvo suficiente cantidad para proseguir con la fragmentación (mínimo 15 ug). La fragmentación fue realizada usando un buffer de fragmentación y una buena fragmentación fue analizada mediante un chip de Experion™ Automated

Electrophoresis Station (RNA standard), posteriormente la hibridación fue realizada, colocando la muestra en una mezcla de hibridación dentro de un cartucho o chip Affymetrix HU-U133 Plus 2.0 GeneChip, y dejando hibridar en el horno de hibridación por 16 horas a 45°C a una velocidad de rotación de 60 rpm usando el GeneChip Hybridation, wash and stain kit. Cuando la hibridación fue terminada, la muestra y la mezcla de hibridación fue retirada del cartucho, este fue rellenado con solución Holding buffer y fue lavado en la estación de fluidos 450 de la plataforma de Affymetrix, el programa para el tipo de cartucho indicado fue seleccionado y en este proceso incluyó lavados con buffers de lavado incluidos en el kit, así como el uso de soluciones de tinción para poder ser detectada la señal en el escáner. Al finalizar la estación de fluidos, el cartucho fue llenado con holding buffer y evitando que se hubieran generado burbujas, se coloca en el escáner de Affymetrix donde fue escaneado y fue generado tanto la imagen como los archivos necesarios para su posterior análisis usando el software Affymetrix Microarray Suite versión 5.0.0.032.

Detección de mutaciones del panel de cáncer en tumores triple negativos por secuenciación

La secuenciación con semiconductores fue utilizada para secuenciar un panel donde se evaluaron regiones “hot spot” de 46 oncogenes y genes supresores de tumor (entre ellos ATM, BRAF, EGFR, FGFR2 y 3, HRAS, KRAS, PTEN, TP53). Este panel contenía 190 pares de primers que amplificaron fragmentos de ≈ 119 pb en donde se evaluaron 739 mutaciones en 604 loci. La construcción de librerías fue realizada usando 20ng de gDNA mediante el kit Ion AmpliSeq™ Cancer Panel v1 (primer pool), Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 y códigos de barras (Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit) fueron usados para diferenciar entre las muestras en el análisis de bioinformática. La cuantificación de cada librería fue llevada a cabo por qPCR usando el kit Ion Library Quantitation Kit, además por medio del uso de la plataforma de microfluidos Bioanalyzer

2100. De acuerdo a la cuantificación de cada librería el cálculo del factor de dilución fue realizado para que cada librería estuviera entre 18 y 20pM para realizar la PCR en emulsión (ePCR) usando el sistema Ion OneTouch™, la reacciones fueron hechas usando una mezcla equimolar de cuatro librerías por reacción mediante el Ion OneTouch™ 200 Template Kit v2 DL, fue en esta etapa en la cual las perlas fueron tapizadas con amplicones ya sea un solo amplicón (perlas monoclonales) o más de un amplicón (perlas policlonales), deseándose un mayor porcentaje de perlas monoclonales. Una vez que la ePCR fue realizada se prosiguió al enriquecimiento de las perlas en el equipo Ion OneTouch™ ES (enrichment system). La cantidad de perlas policlonales fue verificada antes y después del enriquecimiento mediante el Ion Sphere™ Quality Control Kit, esperándose un porcentaje del 10 - 30%, si el porcentaje hubiera sido mayor indicaría un alto porcentaje de perlas policlonales en la secuenciación. Finalmente, la secuenciación de las librerías amplificadas y enriquecidas en perlas fue llevada a cabo con el equipo Ion PGM™ System usando Ion PGM™ 200 Sequencing Kit y Ion 316™ Chip Kit.

4.10. Análisis estadístico

Datos clínicos: Los datos clínicos se sometieron a estadística descriptiva y de tendencia central.

Perfiles de expresión por microarreglos: La información sonda-nivel fue normalizada y los resúmenes de la expresión genética fueron calculados para cada conjunto de sondas usando un análisis multichip robusto RMA (Roboust Multi-array Average). Se utilizó el programa Expression Console de Affymetrix para el tratamiento estándar de los datos (normalización global, detección de ausencia-presencia) previo al análisis además del programa Partek. Se realizaron agrupamientos (clustering) no-supervisado y supervisado para identificar posibles nuevos sub-grupos de pacientes y construir nuevos clasificadores, respectivamente. Se utilizó un agrupamiento jerárquico para el análisis no-supervisado.

Análisis de qPCR tiempo real: En el caso del análisis de resultados de tiempo real, en los que solamente se comparan dos medias, se realizó la prueba de t-student. Se mantuvo el nivel global de todas las comparaciones en 0.05. Se realizaron análisis de estimación de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de las muestras examinadas para analizar estadísticamente la diferencia en la expresión de los genes analizados entre las muestras de tejido de CM, antes y después de tratamiento.

Secuenciación masiva por semiconductores: El análisis bioinformático se realizó en el servidor de Ion Torrent (TSS ver.3.6.1), en donde para la programación del plan de cada corrida se utilizó el genoma hg19 para realizar el mapeado de las variantes, especificando las regiones de interés con el archivo .bed puesto a disposición como parte del kit Ion AmpliSeq Cancer Panel V1. Para la identificación de las variantes se utilizó el plugin "Variant Caller" (TVC ver.3.6-30), con parámetros "Somatic - High Stringency (PGM)", con la finalidad de encontrar variantes poco frecuentes y pocos falsos-positivos. Se definieron como variantes significativas aquellas que fueron reportadas con un valor de calidad Q mayor de 50. Al generar la tabla de variantes para cada muestra se realizó un listado de las variantes más comunes entre las 32 muestras analizadas, definiendo éstas por su presencia en al menos 5 muestras. Las variantes más frecuentes se investigaron por el tipo que eran (SNP, delección, inserción) y fueron posteriormente localizadas en el gen, y su implicación en el producto del gen fue analizado, con la ayuda de la base de datos dbSNP del NCBI.

Vías de señalización: Se utilizó el software Ingenuity pathway analysis (IPA) para determinar las vías que fueron reguladas significativamente en los datos de expresión genética de los tumores. El score será indicado por la probabilidad de que los genes en una vía sean encontrados juntos al azar.

5. RESULTADOS

5.1. Características generales de la población estudiada

Grupo 1 de pacientes: Genes candidatos, perfiles de expresión y respuesta al tratamiento

Muestras de biopsias obtenidas mediante aguja gruesa (true cut) fueron obtenidas de pacientes quienes accedieron a participar en el estudio, previo firma de consentimiento informado, las pacientes incluidas fueron las que acudieron a consulta con un nódulo mamario por sospecha de malignidad (Julio 2011 - Agosto 2012) y que después de la confirmación histopatológica fueron sometidas a tratamiento cuyos regímenes fueron: quimioterapia neoadyuvante de 4 ciclos esquema FAC, un ciclo cada 21 días, Fluorouracilo(F)500mg/m²., Doxorubicina(A)50mg/m²; Ciclofosfamida(C)500mg/m²; quimioterapia adyuvante de 12 sesiones de Paclitaxel(P)80mg/m². La paciente continuó en tratamiento sistémico hasta el momento en que se realizó el tratamiento local (cirugía), donde se tomó otra muestra del mismo lugar donde se tomó la biopsia de aguja gruesa, esto gracias a que se utilizó un marcaje con carbón en el momento de la biopsia. Un total de 52 pacientes fueron captadas durante Julio 2011 y Agosto 2012, de las cuales solo se obtuvo muestra pareada de biopsia y cirugía de 30 pacientes, sin embargo solo 28 de ellas tuvieron el material suficiente para realizarse los microarreglos y solo 24 fueron incluidas en el análisis de datos, ya que de 4 pacientes los datos de microarreglos no se comportaban de manera normal, es decir, eran atípicos al momento de la normalización de los datos. La tabla 2 resume las características de las pacientes y de los tumores analizados.

Tabla 2. Características de las pacientes y tumores analizados (Grupo 1)

Características de las pacientes (n=24)			Características de los tumores (n=24)		
	Media	Rango		n	%
Edad	46	26 a 60	Localización tumor		
Estado civil			Izquierdo	13	54%
Casada	16		Derecho	11	46%
Separada	1		Ganglios linfáticos		
Soltera	5		Positivos	20	83%
Unión libre	2		Negativos	4	17%
Antecedentes cáncer			RE		
No	12		Positivos	13	54%
Si	12		Negativos	11	46%
Tabaquismo			RP		
No	16		Positivos	14	58%
Si	8		Negativos	10	42%
Alcohol			HER2		
No	20		Positivos	5	20.8%
Si	4		Negativos	17	70.8%
Edad menarca	12.8	10 a 15	Indefinido	2	8.4%
Número de hijos			CMTN		
Nulípara	2		Si	7	29%
1 hijo	1		No	17	71%
2 hijos	5		KI67		
3 hijos	3		Positivo	19	79%
>3 hijos	13		Negativo	5	21%
Lactancia			P63		
Si	14		Positivo	9	38%
No	10		Negativo	15	62%
Uso de ACO/Terapia de reemplazo					
No	15				
Si	9				

Grupo 2 de pacientes: Secuenciación en CMTN

La media de edad de las 32 pacientes participantes en el estudio fue de 52.31 años (rango 31-70 años). La tabla 3 describe las características principales de los tumores incluidos en el estudio, donde podemos observar que la mayoría de ellos (68.8%) fueron adenocarcinomas de tipo ductal infiltrante, de grados histológicos avanzados y por tanto poco o moderadamente diferenciados. Además, a estos tumores se les realizaron pruebas inmunohistoquímicas para la presencia de proteínas EGFR, p63 y CK5/6, que nos ayudó a clasificar estos tumores entre tipo basal o no. Solo a una de las muestras no se le pudo realizar dichas tinciones.

Tabla 3 Características histopatológicas de los tumores del grupo 2.

Característica del tumor	n=32 (%)	Característica del tumor	n=32 (%)
Subtipo histológico:		Infiltrado linfoplasmocítico	
Adenocarcinoma ductal infiltrante	22 (68.8)	Presente	24 (75)
Metaplásico (adenoescamoso)	6 (18.8)	Ausente	8 (25)
Papilar	2 (6.2)	EGFR	
Carcinoma lobulillar atípico	1 (3.1)	+ (una cruz)	8 (25)
Carcinoma medular atípico	1 (3.1)	++ (dos cruces)	11 (34.4)
Grado histológico		+++ (tres cruces)	3 (9.3)
Bien diferenciado	0 (0)	Ausente	9 (28.1)
Moderadamente diferenciado.	6 (18.8)	No evaluable	1 (3.1)
Poco diferenciado	26 (81.2)	p63	
Bordes		Positivo	12 (37.5)
Infiltrante	13 (40.6)	Negativo	19 (59.4)
Expansivo	18 (56.3)	No evaluable	1 (3.1)
No evaluable	1 (3.1)	CK5/6	
Zonas acelulares		Positivo	13 (40.6)
Presente	16 (50)	Negativo	18 (56.3)
Ausente	16 (50)	No evaluable	1 (3.1)
Necrosis			
Presente	23 (71.9)		
Ausente	9 (28.1)		

5.2. Análisis de qPCR tiempo real EGFR, BRCA1, PTPN12 y TP53

Se incluyeron 24 mujeres con CM en el análisis de expresión de genes candidatos, sin embargo solo 21 pacientes tuvieron resultados de calidad para analizarlos. Cinco pacientes cambiaron significativamente de expresión de BRCA1 ($p=0.05$, t student). En EGFR 5 pacientes cambiaron la expresión. Para PTPN12, 8 pacientes cambiaron su expresión (4 disminuyó, 4 aumentó). Solo 3 pacientes tuvieron un cambio de expresión evaluando el gen TP53. Ocho pacientes (38%) tuvieron cambio en la expresión de al menos uno de los genes analizados, tres de estos presentaron RPC y cinco RCP.

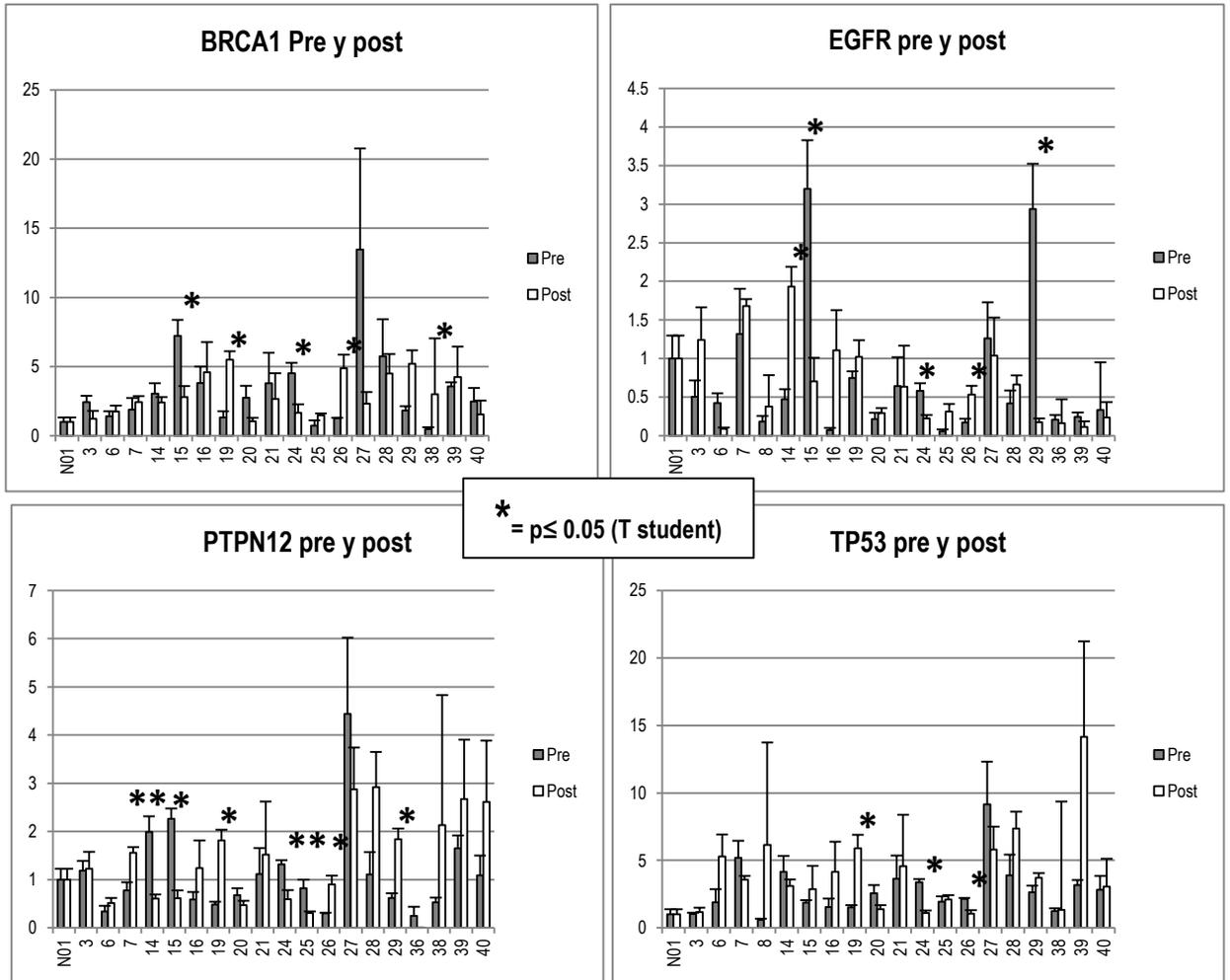


Figura 3 Graficas de expresión de BRCA1, EGFR, PTPN12 y TP53. Representación de la expresión de los genes BRCA1, EGFR, PTPN12 y TP53 obtenidas por qPCR en tiempo real, se grafica en el eje de las y los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ o fold change y en el eje de las x las muestras analizadas. De color gris se observan los resultados de la muestra de biopsia (pre tratamiento) y en de blanco los resultados de la muestra de cirugía (post tratamiento), se muestran los valores de cada pacientes con ambas muestras (pre y post) continuas para observar cambio en la expresión de cada paciente. Pruebas de t de student se realizaron para notar diferencias significativas entre las muestras de pre y post tratamiento en cada paciente, mostrando con un * las muestras con valores de significancia $p \leq 0.05$.

5.3. Perfiles de expresión y clasificación molecular de los tumores

Perfil de expresión genética diferencial

De las 30 pacientes incluidas en el estudio, únicamente se pudieron analizar por microarreglos 28 pacientes, de los cuales se eliminaron 4 por tener datos atípicos en una o ambas muestras (biopsia y/o cirugía), contándose finalmente con muestras pareadas (biopsia/antes y cirugía/después) de 24 pacientes. Después de realizarse la normalización correspondiente mediante el método RMA (Roboust Multi-array Average), los datos obtenidos por microarreglos se usaron para obtener un perfil de expresión genética diferencial entre el conjunto de muestras de biopsia (antes del tratamiento) y el conjunto de muestras de cirugía (después de tratamiento), esto utilizando los datos del conjunto de sondas con una media de expresión mayor a 4 (fold change) y que además fueran estadísticamente significativos (prueba t student y de Kolmogorov con una $p < 0.001$). Se obtuvo un perfil de 59 genes, los cuales tienen funciones involucradas en la estructura, adhesión y metabolismo celular. Entre estos 59 genes (cuya lista completa se encuentra en la tabla 4) están incluidos algunos genes relacionados con procesos cancerígenos como TNFSF12 (ligando miembro 12 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral), TNF (factor de necrosis tumoral) y JUN (proto-oncogen jun).

En la Figura 4 se ejemplifica un mapa de calor que muestra los resultados del perfil de expresión genética diferencial obtenido al comparar entre el conjunto de muestras de antes y después del tratamiento. En esta figura observamos el agrupamiento jerárquico supervisado que nos separa entre las muestras de antes y después del tratamiento, este mapa de calor nos representa los 59 genes que conforman el perfil de expresión genética diferencial.

Tabla 4. Lista de 59 genes del perfil de expresión genética diferencial

Símbolo	Nombre	min.test	mean
ANXA1	Annexina A1	2.34E-05	5.50688
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	2.43E-05	10.75531
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	3.72E-05	4.29461
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	4.12E-05	7.49558
RGS1	Regulator of G-protein signaling 1	4.44E-05	10.05051
RGS1	Regulator of G-protein signaling 1	6.39E-05	7.13193
ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	8.29E-05	7.5647
SCARNA17	Small Cajal body-specific RNA 17	9.04E-05	5.61903
FOLR2	Folate receptor 2 (fetal)	0.00010401	7.02661
TRIM25	Tripartite motif containing 25	0.00012466	8.10116
ZFP36	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)	0.00015222	9.3524
KLF6	Kruppel-like factor 6	0.00025297	10.78428
CPXM1	Carboxypeptidase X (M14 family), member 1	0.00028985	7.01592
APOLD1	Apolipoprotein L domain containing 1	0.00031246	6.79048
FBLN1	Fibulin 1	0.00040566	8.37634
USP46	Ubiquitin specific peptidase 46	0.00040566	6.90067
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	0.00040566	9.14417
TNFSF12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	0.00040566	6.18169
ZNF253	Zinc finger protein 253	0.00040566	5.46386
TNF	Tumor necrosis factor	0.00040566	4.64215
ZDHHC17	Zinc finger, DHHC-type containing 17	0.00040566	8.16972
CAPRN2	Caprin family member 2	0.00040566	7.01552
SPTBN1	Spectrin, beta, non-erythrocytic 1	0.00040566	7.37844
DST	Dystonin	0.00040566	6.93026
PCMTD1	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1	0.00040566	4.61787
FLRT2	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	0.00040566	4.03272
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	0.00040566	6.39426
EMP1	Epithelial membrane protein 1	0.00040722	4.31268
BACH2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2	0.00042197	4.76819
CNIH4	Comichon homolog 4 (Drosophila)	0.00042204	10.67868
CLK3	CDC-like kinase 3	0.0004562	4.27935
TRA2B	Transformer 2 beta homolog (Drosophila)	0.00047848	6.42319
PER1	Period homolog 1 (Drosophila)	0.00048986	6.41667
YPEL4	Yippee-like 4 (Drosophila)	0.00051438	4.14275
TAF10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 30kda	0.00052725	4.50684
KERA	Keratocan	0.00053506	4.32512
KLF6	Kruppel-like factor 6	0.00054596	10.38638
KCNMB4	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily Meta member 4	0.00058172	6.43542
ADAMTS1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	0.00062029	4.84715
JUN	Jun proto-oncogene	0.00064375	10.85263
C1QTNF7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	0.00067971	4.64043
FLRT2	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	0.00070589	7.42359
Hs.455493	Vimentin	0.00073041	5.72403
FBLN1	Fibulin 1	0.00083577	9.83676
UBQLN4	Ubiquilin 4	0.00092604	7.94675
SGK1	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1	0.00094547	10.29134
AGPAT4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)	0.00094983	5.33397
PPP1R3D	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D	0.00098005	7.13372

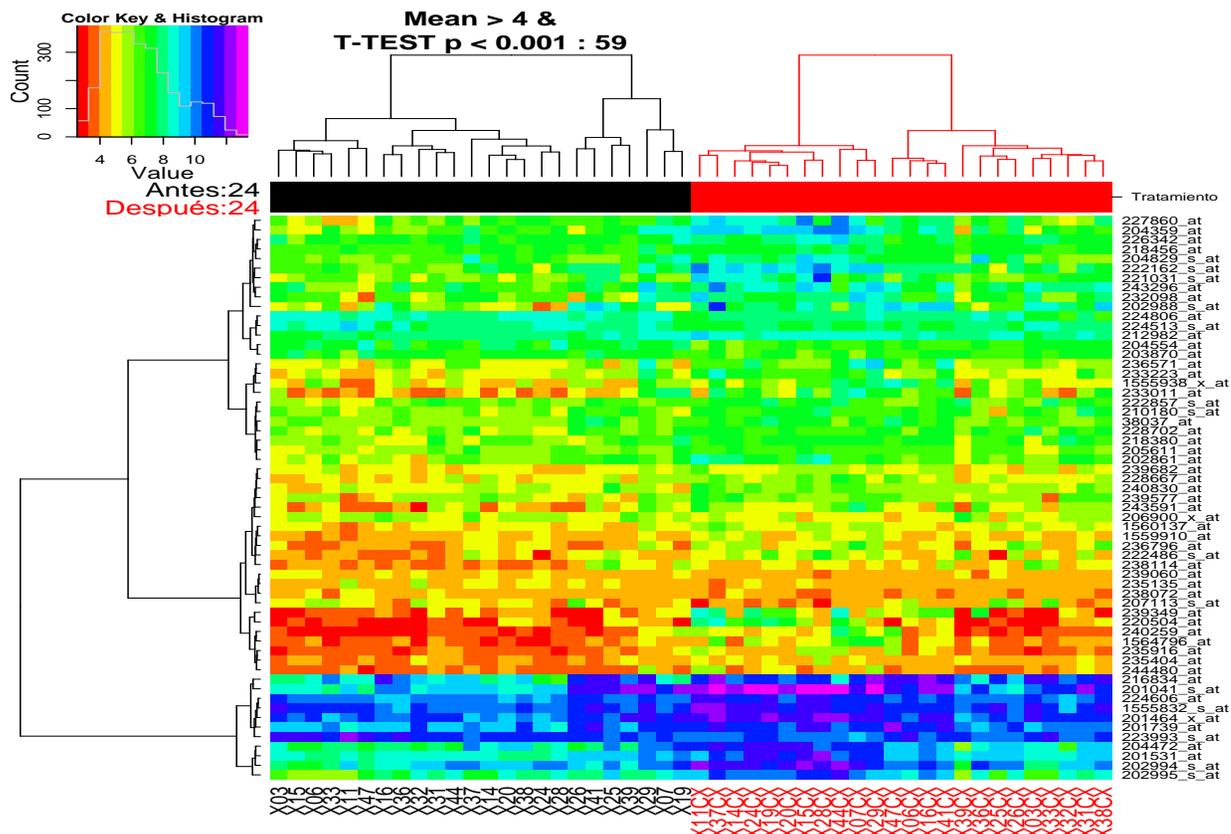


Figura 4 Perfil de expresión genética diferencial. Mapa de calor de las muestras pareadas (antes y después de tratamiento) de 24 pacientes con CM analizados por agrupamiento jerárquico supervisado. Se muestran en la parte superior de negro el conjunto de muestras tomadas en la biopsia (antes del tratamiento) y de rojo el conjunto de muestras tomadas en la cirugía (después del tratamiento). Cada fila del mapa de calor indica un conjunto de sondas que en el microarreglo representa un gen, mientras que cada columna representa una muestra, indicando en la parte inferior del mapa de calor el número de paciente a la que corresponde la muestra. En la parte superior izquierda de la figura se muestra el código de colores de los valores de fold change representados en el mapa de calor, siendo los colores rojizos los que tienen al menos un fold change de 4 y los de color morado los que tienen un fold change de más de 10. Xn= muestra de biopsia, XnC= muestra de cirugía, donde n= al número de paciente.

Clasificación molecular de tumores usando PAM50

La clasificación molecular de los tumores se realizó según lo reportado por Parker [7], usando el algoritmo PAM50, el cual usa los patrones de expresión de 50 genes para realizar la clasificación en los cinco subtipos más descritos: Luminal A, Luminal B, Normal-like, Basal-like y HER2 enriquecido. Al evaluar este algoritmo con nuestras muestras (48 muestras pareadas de 24 pacientes) encontramos que el subtipo más frecuente fue el Luminal B con el 29% (14/48), seguido por el Normal-like con 23% (11/48), Basal-like con el 19% (9/48), Luminal A con 17% (8/48) y el menos frecuente el HER2 enriquecido con 12% (6/48), frecuencias mostradas en la Figura 5. Además encontramos que el 42% (10/24) de las pacientes presentó un cambio de subtipo molecular entre la muestra de biopsia (antes del tratamiento) y la muestra de cirugía (después del tratamiento). Interesantemente, cinco de estas pacientes cambiaron a un subtipo Normal-like en la muestra de cirugía y tres de estos cinco tuvieron una respuesta patológica completa (RPC).

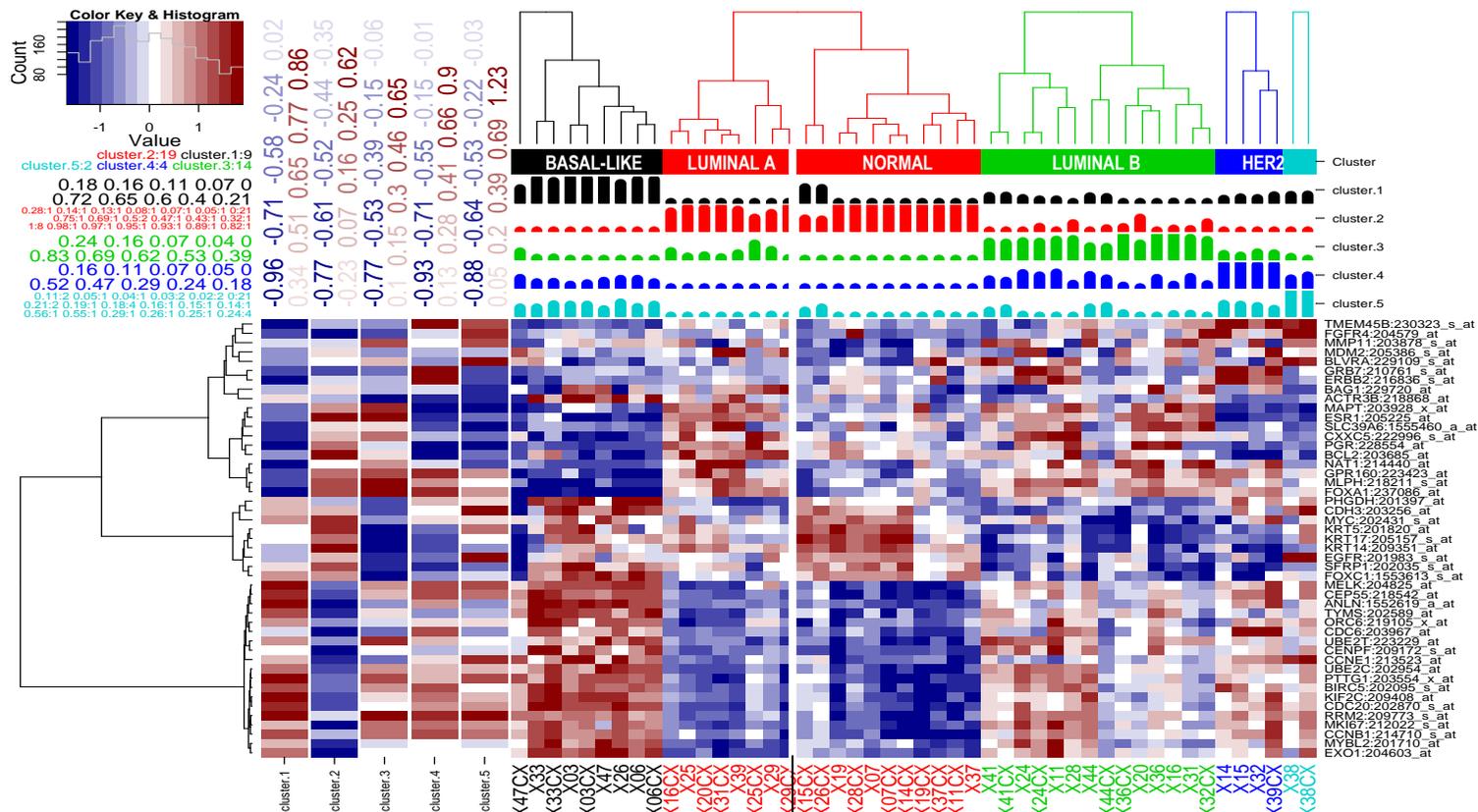


Figura 5. Clasificación Molecular de tumores usando PAM50. Mapa de calor que representa los cinco subtipos moleculares evaluados con el algoritmo PAM50. En la parte superior de la imagen se muestra el agrupamiento jerárquico que define los cinco subtipos, así como el nombre asignado a cada agrupamiento (cluster), debajo de estos, se muestran los niveles de similitud de cada cluster con la muestra. Las filas que componen el mapa de calor representan los 50 genes evaluados por el algoritmo PAM50, mientras que las columnas representan cada muestra analizada, en la parte inferior del mapa de calor se observa la identificación de cada muestra compuesta por una "X", seguida del número del paciente y en el caso de ser muestra de cirugía el número del paciente es seguido por las letras CX. En la parte superior izquierda se muestra el código de colores, así como los valores de expresión que conforma cada cluster (números de azul a rojo en posición vertical) y los valores de similitud asignados a cada muestra (números en negro, rojo, verde, azul y celeste en posición horizontal). Xn= muestra de biopsia, XnCX= muestra de cirugía, donde n= al número de paciente.

5.4. Respuesta al tratamiento

La respuesta al tratamiento fue evaluada clínica e histopatológicamente. Clínicamente se evaluó la disminución o total desaparición de tumor después del tratamiento neoadyuvante. Histopatológicamente fue evaluado el tejido residual en el momento de la cirugía tomando en cuenta la presencia o no de células tumorales. De esta manera se asignaron tres categorías de respuesta al tratamiento: RPC (respuesta patológica completa), aquellos tumores que desaparecieron y que en el análisis histopatológico no se encontraron más células tumorales; RCP (respuesta clínica parcial), aquellos tumores que disminuyeron, pero aún estaban presentes en el momento de la cirugía y cuya evaluación histopatológica confirma su presencia; NR (no respuesta), en esta categoría encontramos los tumores que no respondieron al tratamiento, es decir que no disminuyeron de tamaño y que en algunos casos incluso aumentaron de tamaño, lo anterior confirmado por el análisis histopatológico en la muestra de cirugía. La mayoría de las pacientes 58% (14/24) tuvieron una RCP, 25% (6/24) presentaron NR y solo el 17% (4/24) fueron RPC. En la tabla 5 se presenta la respuesta al tratamiento de cada paciente, así como la clasificación molecular antes y después del tratamiento.

Tabla 5 Respuesta al tratamiento de cada paciente y subtipo molecular

Muestra Id	Respuesta	Subtipo molecular antes	Subtipo molecular después	Muestra Id	Respuesta	Subtipo molecular antes	Subtipo molecular después
3	NR	Basal-like	Basal-like	28	RCP	Luminal B	Normal-like
6	RCP	Basal-like	Basal-like	29	RCP	Luminal A	Luminal A
7	RPC	Normal-like	Normal-like	31	RCP	Luminal B	Luminal A
11	RPC	Luminal B	Normal-like	32	RCP	HER2	Luminal B
14	RPC	HER2	Normal-like	33	NR	Basal-like	Basal-like
15	RPC	HER2	Normal-like	36	RCP	Luminal B	Luminal B
16	NR	Luminal B	Luminal A	37	RCP	Normal-like	Normal-like
19	RCP	Normal-like	Normal-like	38	NR	HER2	HER2
20	RCP	Luminal B	Luminal A	39	RCP	Luminal A	HER2
24	RCP	Luminal B	Luminal B	41	NR	Luminal B	Luminal B
25	RCP	Luminal B	Luminal B	44	NR	Luminal B	Luminal B
26	RCP	Basal-like	Normal-like	47	RCP	Basal-like	Basal-like

RPC=Respuesta Patológica Completa, RCP=Respuesta Clínica Parcial, NR= No Respuesta

5.5. Detección de mutaciones del panel de cáncer en tumores triple negativos por secuenciación

El número de variantes detectadas se muestran en la Tabla 6, y se encontraron con la ayuda del Variant Caller, una aplicación del servidor del Ion Torrent, estas variantes tienen una cobertura de al menos 23X. Un total de 168 diferentes variantes se encontraron en las 32 muestras en regiones de 32 de los 46 genes analizados. La mayoría de las variantes (95.8%) fueron SNP, mientras que 4.2% fueron inserciones (3/168) o deleciones (4/168). El casi 30% (49/168) de las variantes ya habían sido reportadas previamente, sin embargo el 70% fueron variantes no reportadas (VNR), y de ellas hay algunas que se presentan en muchas de las muestras analizadas, como el caso del gen APC que presenta la misma VNR en 28 pacientes, FGFR2 con 26 pacientes en una VNR y FGFR3 con 25 pacientes con una VNR.

Tabla 6. Variantes encontradas en las 32 muestras analizadas.

Gen	Variantes encontradas	Tipo	# Muestras afectadas	Gen	Variantes encontradas	Tipo	# Muestras afectadas
ABL	2	SNP	2	KIT	2	SNP	3
AKT1	1	SNP	2	MET	4	SNP	1
APC	15	SNP	28	NOTCH	2	SNP	1
ATM	4	SNP	13	NRAS	1	SNP	1
BRAF	7	SNP	2	PDGFRA	7	SNP	28
CDH1	2	SNP	1	PIK3CA	7	SNP	18
CDKN2A	8	SNP	6	PTPN11	2	SNP	1
CTNNB1	2	SNP	1	RB1	4	SNP	5
EGFR	7	SNP	23	RET	1	SNP	22
ERBB2	4	SNP	4	SMAD4	4	SNP	4
ERBB4	3	SNP	2	SMARCB1	2	SNP	1
FBXW7	2	SNP	3	SMO	3	SNP	3
FGFR2	9	SNP	27	STK11	4	SNP	3
FGFR3	1	INS	1		1	DEL	1
	20	SNP	27	TP53	19	SNP	17
FLT3	4	SNP	3		3	DEL	3
HRAS	1	SNP	1		2	INS	2
KDR	7	SNP	6	VHL	1	SNP	1

SNP= Single Nucleotide Polymorphism, INS= Inserción, DEL=Delección

En la Figura 6 se presentan las variantes de los genes que se presentan en al menos 5 muestras, en donde se puede observar que las variantes más frecuente en los genes APC y ATM no han sido reportadas, así como las dos más frecuentes en el gen FGFR2, pero además parecen tener un efecto en sus proteínas. También podemos observar en esta figura que a pesar de haber variantes no reportadas en otros genes como en el gen FGFR3 o CDKN2A estas variantes resultan no modificar el producto del gen.

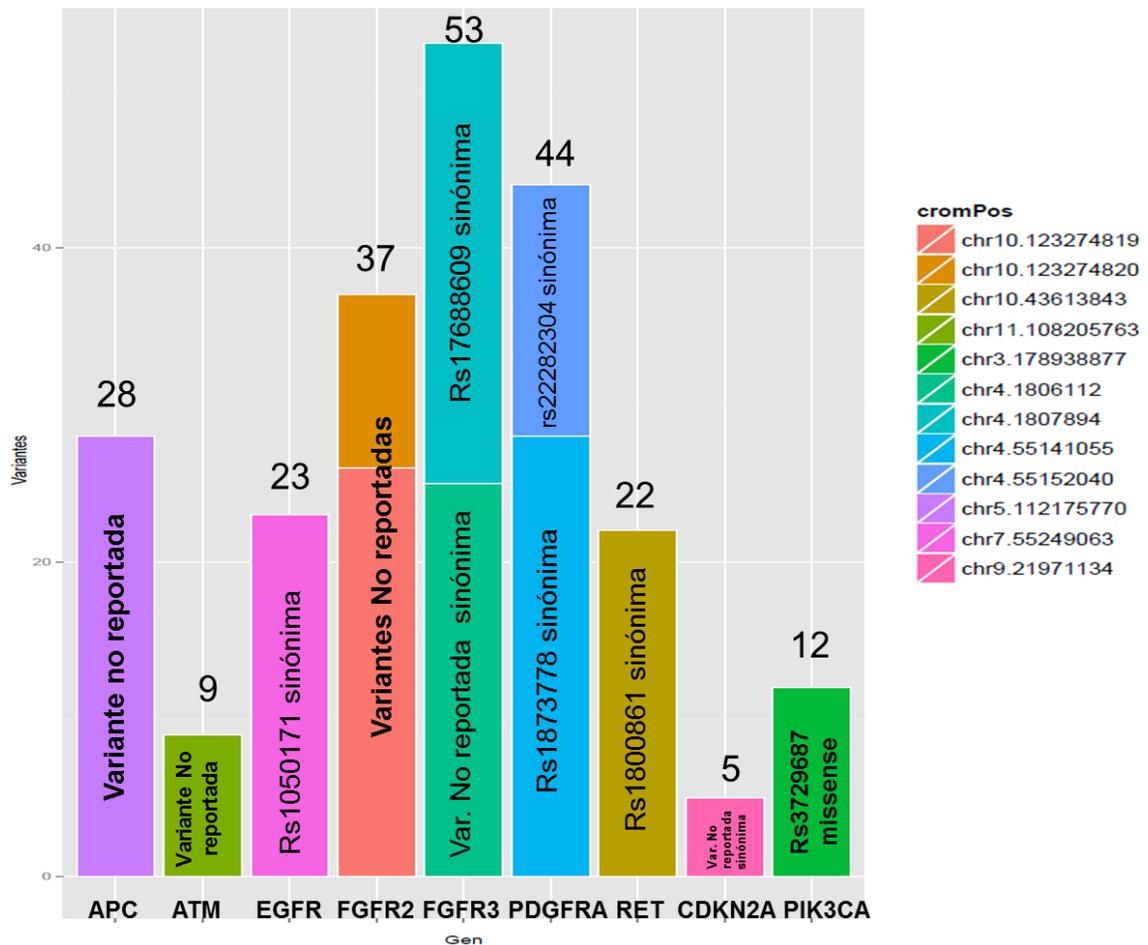


Figura 6. Variantes frecuentes por gen indicando posición en el cromosoma. Se representan los genes (eje de las X) con variantes (eje de las Y) más frecuentes (al menos presentes en 5 pacientes). De colores se muestra la posición en el cromosoma de cada gen y en cada barra se señala la variante con su número de rs cuando ya ha sido reportada o como variante no reportada, y el significado de la variante, además sobre cada barra se encuentra el número de variantes presentadas entre las 32 pacientes.

La frecuencia de mutaciones en cada una de las muestras pareciera ser similar en todas las pacientes siendo esta de menos de 20 mutaciones por muestra, sin embargo, como se observa en la Figura 7, una de las pacientes muestra más de 80 mutaciones, correspondiendo este tumor al único caso de carcinoma medular atípico en la muestra de nuestro estudio.

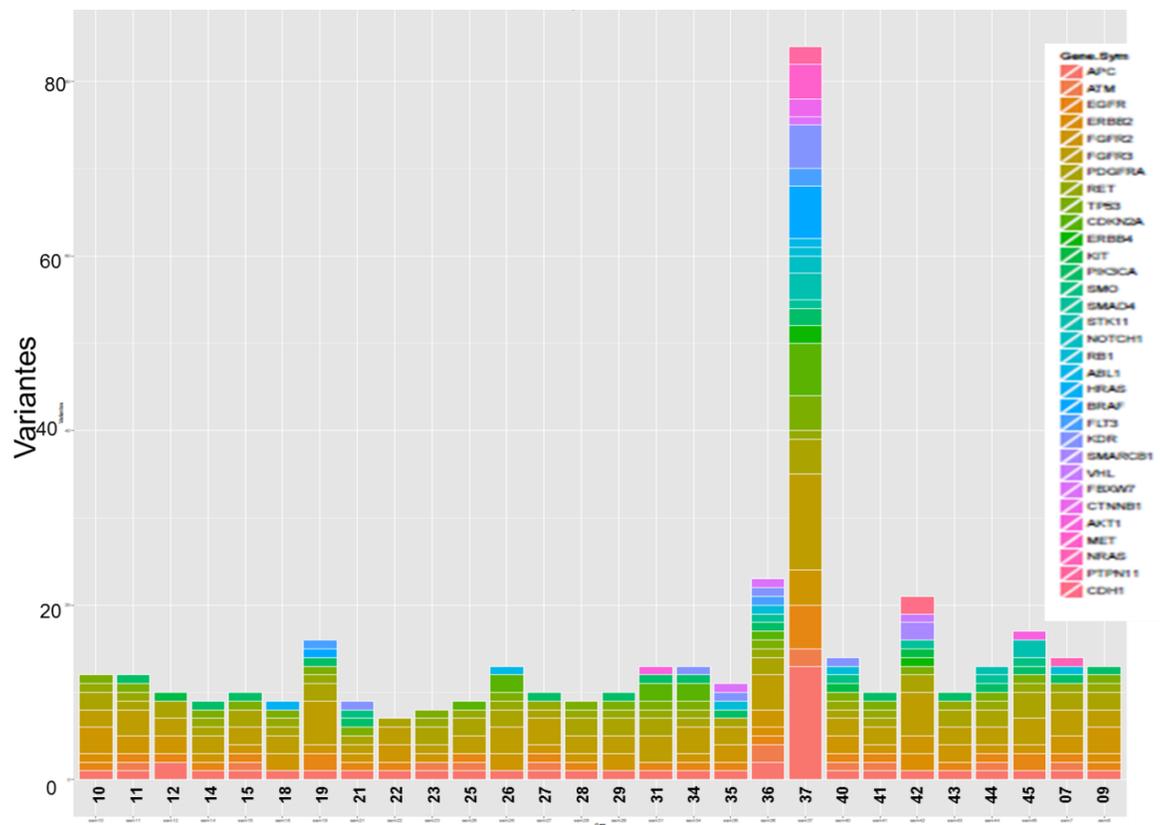


Figura 7. Variantes por muestra mostrando el gen afectado. En el eje de las X se encuentra el número asignado a cada paciente y en el eje de las Y el número de variantes presentadas por cada muestra, con código de colores (mostrado en la parte superior derecha) se identifican cada uno de los genes en donde se presenta la(s) variantes.

Los genes que presentaron variantes en más de 5 muestras fueron los siguientes: APC, ATM, EGFR, FGFR2, FGFR3, PDGFRA, RET, CDKN2A y PIK3CA, de estos solo los genes ATM, FGFR2 y PIK3CA mostraron VNR con efecto en sus respectivas proteínas (Tabla 7).

Tabla 7. Variantes frecuentes y efecto en la proteína.

Posición en el cromosoma	Variante reportada	Gen	# de muestras afectadas	Cambio	Posición mRNA	Efecto en la proteína	Cambio de aminoácido	Posición en la proteína
chr5.112175770	rs41115	APC	28	G/A	4859	Sinónima	Thr/Thr	1493
chr11.108205763	--	ATM	9	C/T	8463	No sinónima	Ala/Val	2693
chr7.55249063	rs1050171	EGFR	23	G/A	2607	Sinónima	Gln/Gln	787
chr10.123274819	--	FGFR2	26	T/C	1403 (isoforma 8)	No sinónima	Lys/Glu	252
chr10.123274820	--	FGFR2	11	T/C	1400 (isoforma 8)	Sinónima	Glu/Glu	251
chr41806112	--	FGFR3	25	C/T	1393 (Isoforma 3)	Sinónima	Leu/leu	379
chr4.1807894	rs7688609	FGFR3	28	G/A		Región no codificante		
chr4.55141055	rs1873778	PDGFRA	28	A/G	2032	Sinónima	Pro/Pro	567
chr4.55152040	rs2228230	PDGFRA	16	C/T	2803	Sinónima	Val/Val	824
chr10.43613843	rs1800861	RET	22	G/T		Región no codificante		
chr9.21971134	--	CDKN2A	5	G/A	427/ 530	Sinónima	Pro/Pro / Pro/Leu	89/75
chr3.178938877	rs3729687	PIK3CA	12	G/A	2276	Sin sentido	Glu/Lys	707

5.6. Vías de señalización identificadas

Con los datos de microarreglos y con la ayuda del programa Inguenuity pathways se creó una base de datos filtrada (Especie: humano, tejido: glándula mamaria, enfermedades: cáncer, moléculas: todas), la base de datos fue utilizada para llevar a cabo un análisis de vías de señalización alteradas en las muestras (Fuente: Human Genome U133 Plus 2.0 Array, relación: directa entre genes, incluir: químicos endógenos (por ejemplo hormonas), especie: humana, tejido: glándula mamaria, corte del valor de fold change: 4). Los resultados mostraron cuatro vías de señalización principales: Mecanismos moleculares del cáncer, Señalización de la enfermedad de Huntington, Vías de Ubiquitinación de proteínas, Señalización PTEN y Disfunción mitocondrial (Tabla 8).

Tabla 8 Vías de señalización afectadas.

Nombre	Valor de p	Ratio*
Mecanismos moleculares del cáncer	6.75 e-04	155/156 (0.994)
Señalización de la enfermedad de Huntington	1.8 e-03	102/103 (0.99)
Vías de Ubiquitinación de proteínas	7.3 e-03	141/144 (0.979)
Señalización PTEN	2.05 e-02	63/63 (1)
Disfunción Mitocondrial	2.46 e-02	90/91 (0.989)

*Ratio=Numero de moléculas (genes) en la muestra (s) presentes en la vía de señalización entre el número de moléculas (genes) que conforman la vía de señalización.

Al observar la vía de señalización más significativa encontramos a los tres genes cuyas variantes fueron encontradas en el estudio de secuenciación (ATM, FGFR2 y PIK3CA) y aunque dos de estos genes (FGFR2 y PICK3CA) no fueron encontrados sobreexpresados en el estudio de microarreglos el gen ATM si se encontró sobre expresado (Figura 8).

6. DISCUSIÓN

6.1. Análisis de qPCR tiempo real EGFR, BRCA1, TP53 Y PTPN12

Las diferencias en la expresión de genes descritos como candidatos para biomarcadores para el CM (BRCA1, EGFR, PTPN12 y TP53) en muestras de biopsia y cirugía no mostraron cambios constantes en las pacientes, es decir mientras en algunas muestras la tendencia era a disminuir la expresión entre la muestra de antes y después de tratamiento, en otras muestras la tendencia era en aumentar la expresión. En el caso de BRCA1 observamos que dos pacientes disminuyeron la expresión del gen y tres aumentaron la expresión, y aunque lo previamente descrito indica que la expresión de BRCA1 es baja en muestras de tejido normal[91] solo una de las dos pacientes en la que hubo disminución de BRCA1 tuvo RPC, la otra paciente tuvo RCP. Mientras que de las tres pacientes con aumento en la expresión en el tejido después del tratamiento una tuvo NR y las otras dos RCP, como se puede observar el tamaño de muestra pequeño nos evita predecir una tendencia real en los resultados. Hablando de EGFR, se observa algo parecido, dos pacientes con aumento a la expresión del gen y tres con disminución, de estas cinco dos presentaron RPC, una con disminución en la expresión y otra con aumento en la expresión en la muestra después del tratamiento. Según lo reportado los tumores de mama suelen tener una baja expresión de EGFR, excepto los tumores triple negativo que tienen una sobre expresión de este gen[71], sin embargo en las pacientes evaluadas las cuales incluía seis tumores triple negativo, solo uno presento una sobre expresión significativa entre la muestra de antes y después del tratamiento, y contemplando únicamente las muestras de antes del tratamiento se observa una baja expresión en general del gen EGFR. Por otro lado, en el gen PTPN12 se encontraron cuatro pacientes con disminución en la expresión después del tratamiento y cuatro con aumento en la expresión después del tratamiento, lo reportado anteriormente es una baja expresión en los tumores de mama en general (en especial en

CMTN)[6, 73], sin embargo entre las pacientes que disminuyeron la expresión después del tratamiento solo tenemos dos con RPC e incluso una paciente con RPC incremento la expresión del gen después del tratamiento. Finalmente en los datos del gen TP53, se encontraron solo tres cambios significativos, dos disminuciones de la expresión y un aumento después del tratamiento, lo reportado anteriormente es la sobre expresión de este gen en población japonesa[75] y donde la sobre expresión además es asociada con una buena respuesta a la misma terapia que se utilizó en este estudio (neoadyuvancia basada en antraciclinas y taxanos) sin embargo las tres pacientes con diferencias significativas presentaron una RCP.

Es claro entonces que las inconsistencias en los resultados de expresión de estos cuatro genes dificultan la asociación con la respuesta al tratamiento, además que el tamaño de muestra es menor al reportado en otros estudios y las poblaciones de referencia son en su mayoría orientales (China y Japón). Es necesario entonces aumentar el número de muestra para encontrar tendencias más significativas.

6.2. Perfiles de expresión y clasificación molecular de los tumores

Se encontró un perfil de expresión de 59 genes (factores de transcripción, genes relacionados con el metabolismo y estructura celular) diferencialmente expresados entre tejido de biopsia y de cirugía de 24 pacientes con CM que siguieron la misma terapia neoadyuvante.

En estudios previos en nuestro país se han observado un perfil de expresión de 10 genes (García 2005)[52] y 17 genes (Valladares 2006)[51], sin embargo en dichos estudios solo se comparaban entre el tejido tumoral y el tejido sano, no evaluando el tratamiento neoadyuvante como en el presente trabajo. Además cabe destacar que los estudios previos utilizaban otra metodología experimental con chips de menor número de sondas y menor número de genes a investigar.

La clasificación molecular de los tumores mostró que hubo cambios moleculares que permitieron cambiar de subtipo molecular entre la muestra de biopsia y de cirugía de la misma paciente, evento previamente reportado por Gonzalez-Angulo y colaboradores[50], esto puede deberse a la efectividad del tratamiento o a la diferencia en proporciones de células tumorales presentes en la muestra de biopsia y cirugía. La frecuencia del evento fue mayor en nuestro estudio que en el reportados (42% vs 38%). El cambio de subtipo molecular puede estar afectado por el método de muestreo y el porcentaje de celularidad en el tejido de cirugía dada la quimioterapia, y esto puede mostrar variabilidad en la predicción del subtipo molecular[63].

6.3. Detección de mutaciones del panel de cáncer en tumores triple negativos por secuenciación

En CM se han reportado un par de trabajos donde utilizan la tecnología de Ion Torrent para evaluar genes relacionados con CM, como es el estudio de Chan y cols.[64] en el cual evaluaron en 20 pacientes la secuencia de los genes BRCA1 y BRCA2, usando la plataforma de Ion Torrent PGM, la construcción de las librerías y amplificación por PCR se realizó utilizando primers de PCR sintetizados de manera personalizada o ya reportados anteriormente. Las regiones codificantes de los genes BRCA1 y BRCA2 fueron amplificados para secuenciarse por el método de Sanger, y estos amplicones de PCR fueron usados para generar las librerías para la secuenciación con Ion Torrent, obteniendo una sensibilidad de 98.7% (IC 95%= 96.3-100%) y especificidad de 99.8% (IC 95%= 99.5-100%)[64]. De manera similar, se realizó el estudio de Trabeux y cols.[65] quienes analizaron también los genes BRCA1 y BRCA2 en 30 pacientes con CM familiar, utilizando un método alternativo al AmpliSeq para realizar la PCR multiplex, el enriquecimiento y preparación de librerías, este método (BRCA MASTRassay v2.0 (Multiplicom, Nieln Belgium) y Library Builder (Life Technologies)) se realizó para preparar fragmentos de PCR

de 300 pb flanqueados por los adaptadores y barcodes necesarios para la secuenciación en el PGM. Todas las variantes detectadas por métodos tradicionales fueron identificadas en el PGM[65].

En el presente trabajo y usando el Cancer Panel, el cual nos permitió analizar regiones hot spot de 46 genes, se encontró que 32 de ellos presentaron al menos una variante en nuestra muestra de 32 tumores de mama triple negativos. Estos 32 genes presentaron en total 168 variantes siendo el 95.8% del tipo SNP y el 4.2% deleciones e inserciones, cabe mencionar que el gen con más variantes presentadas fue el gen TP53 (19 SNPs, 3 deleciones y 2 inserciones), sin embargo este presento variantes diversas en muestras diferentes. Por otro lado de las 168 variantes el 70% correspondía a VNR y en algunos genes fueron muy frecuentes. En estudios similares al presente, como es el publicado por Horvath y cols.[66] en el que se realizó la secuenciación del RNA de 17 tumores de CM, entre los cuales 6 eran CMTN, encontrando variantes ya reportadas y de novo, entre las ya reportadas cabe resaltar tres variantes con efecto en su proteína del gen ATM, del cual en el presente trabajo se encontró una VNR en 9 de las 32 muestras analizadas. Además entre las variantes de novo encontradas validaron aquellas en genes relacionados con cáncer más prevalentes en bases de datos de población abierta y de cáncer, los genes donde se encontraron dichas variantes fueron: ESRP2, GBP1, TPP1, MAD2L1BP, GLUD2 y SLC30A8. A pesar que estos genes no se encontraron afectados en nuestras muestras cabe resaltar que Horvath y cols. demostraron, mediante ensayos mutagenésis dirigida en el sitio de la mutación y posterior transfección en líneas celulares de CM, que una sustitución rara en el gen ESRP2 (p.R353Q) deja a la proteína sin habilidad de unirse a su sustrato el cual es un pre-mRNA del gen FGFR2 y que está involucrado en la transición epitelio mesenquimal (TEM)[66], en este gen fue frecuentemente (26/32) encontrada una VNR en nuestra muestra.

Variante en el gen ATM

El gen ATM se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22-q23) y la proteína producida por este gen es una quinasa importante en el control del ciclo celular ya que regula algunas proteínas supresoras de tumores como p53 y BRCA1, además está involucrada en la reparación de DNA. Mutaciones en este gen están relacionadas con el desorden autosómico recesivo de Ataxia Telangiectasia, sin embargo ha sido descrito también como un gen de baja penetrancia en tumores de mama de tipo familiar, describiéndose que portadores de mutaciones heterocigotos en este gen tienen de dos a cinco veces más riesgo a padecer CM[67, 68]. En tejido de tumores TN se ha reportado la baja expresión de la proteína ATM, proponiéndose este hallazgo como una característica compartida en este tipo de tumores que además presentan mutaciones en BRCA1/2[69]. En nuestra muestra de 32 tumores se presentó una variante en 9 de las 32 (18.13%) pacientes que es un cambio de T por C que se localizaría en la posición 117, 205 del gen perteneciente al exón 55 y en la posición 2693 de la proteína produciendo un cambio del aminoácido Alanina a una Valina (Ala2693Val). En la Figura 9 se muestra la posición en el gen y la proteína de la variante descrita, en esta última se observa como la variante cae en un sitio de unión a ATP y de interacción con otras proteínas de la familia PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases). Esta región es importante porque al no existir una unión eficiente del ATM con el ATP disminuirá o se eliminará la posibilidad de fosforilación de ATM, evitando así la cascada de reacciones como la reparación del daño al DNA por el complejo Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) el cual depende de la unión a ATP al igual que ATM para su funcionamiento[70]. En otros estudios de secuenciación masiva se han encontrado también mutaciones en este gen en muestras de cáncer, por ejemplo en el trabajo de Beltran y cols. [71] donde se analizaron muestras de tejido FFPE de 45 pacientes con cáncer de próstata avanzado en la plataforma de Illumina HiSeq 2000 previa captura de híbridos, analizándose 3320 exones en 182 genes

asociados previamente a cáncer (incluyendo todos los analizados en el Cancer Panel, excepto CSF1R y HNF1A), encontrando entre los genes que presentaban una baja frecuencia de mutaciones al gen ATM y PIK3CA (8% y 4% respectivamente)[71], esto contrario a lo que en el presente trabajo se encontró siendo estos genes dos de los que mayor frecuencia reportaron en nuestras muestras (ATM 18.13% y PIK3CA 37.5%), que aunque difieren en el tipo de tumor, la metodología utilizada en ambos trabajos fue similar, por lo que podríamos sugerir que mutaciones en ATM y PIK3CA son más frecuentes en CMTN que en cáncer de próstata avanzado. Sin embargo, es necesario señalar que las mutaciones encontradas en el gen ATM en el trabajo de Beltran y cols. son mutaciones que producen una proteína truncada (mutaciones nonsense), mientras la mutación más frecuente en nuestro trabajo es una variante no sinónima (mutación missense) con posible impacto en la fosforilación de la proteína y por tanto en su función, además se ha reportado que las mutaciones missense en este gen evitan la actividad quinasa inducida por la radiación de la proteína ATM en células control normales y esto reduce la viabilidad celular, mientras las variantes missense neutrales no lo hacen[72]. Por otro lado, esta variante no ha sido descrita previamente, siendo desconocida hasta ahora su importancia clínica, por lo que es necesario demostrar el verdadero impacto de esta variante en el gen ATM en el desarrollo y biología del CMTN. En otro estudio, Bhattacharya y cols[73] describen que la presencia de deleciones en el gen ATM y MCPH1 (estos se unen cuando ATM esta fosforilado para reparar rupturas de DNA de doble cadena) reducen la expresión transcripcional y de las correspondientes proteínas, esto más frecuentemente observado en tumores con RE y RP negativos[73], lo cual es relevante, ya que en nuestra muestra, la cual está conformada por tumores triple negativos, la presencia de la variante encontrada está en 12 de 32 pacientes y esto puede estar afectando la fosforilación de ATM impidiendo la unión con MCPH1 y por lo tanto evitar la reparación de DNA.

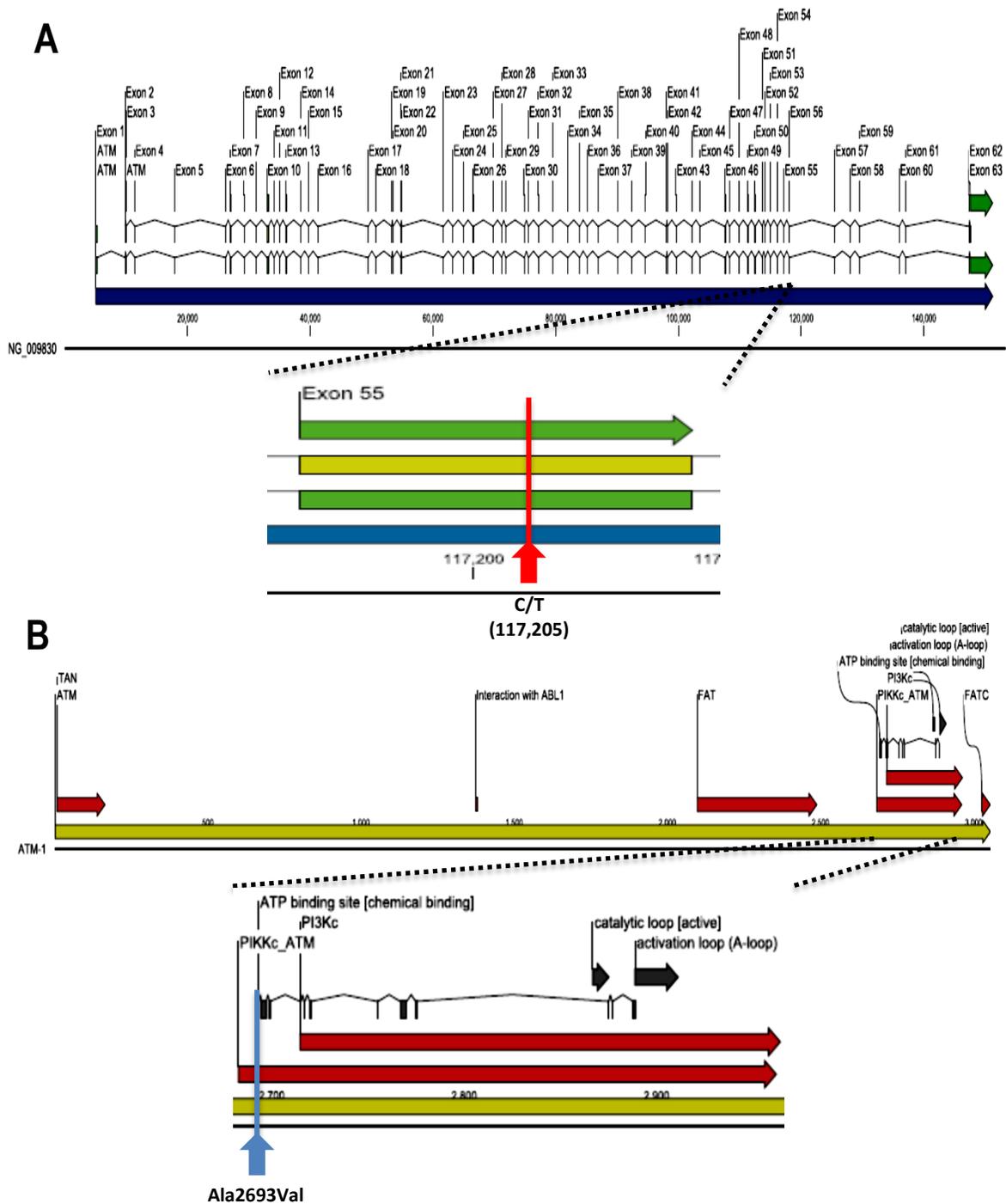


Figura 9. Gen ATM y su proteína. A. El gen ATM constituido por sus 63 exones, se muestra de azul el gen y de líneas negras con recuadros o flechas verdes se muestra las dos regiones codificantes del gen (CDS), las líneas representan los intrones y los recuadros o flechas verdes los exones. La posición de la variante se señala con una flecha roja. B. La proteína producto de gen ATM, se muestra en amarillo la proteína completa y en flechas rojas las regiones de interacción con otras proteínas, de flechas negras se señalan los sitios de activación y catalítico del loop y de líneas y recuadros negros se muestran los sitios de unión al ATP (unión química), de flecha azul se señala la localización de la variante encontrada en el presente estudio, siendo una mutación no sinónima.

Variante en el gen FGFR2

El gen FGFR2 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 en la banda 10q25.3-q26. Este gen codifica para una proteína miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento de fibroblastos, la estructura de la proteína consta de un sitio extracelular que contiene 3 dominios parecidos a los de las inmunoglobulinas (Ig-like D1, Ig-like D2 e Ig-like D3), un único segmento que abarca la membrana hidrofóbica y de un dominio citoplasmático del tipo tirosina quinasa. Esta proteína actúa como un receptor extracelular de factores de crecimiento de fibroblastos y es esencial para la regulación de la proliferación, diferenciación y migración celular, así como para la apoptosis, por lo que mutaciones en el gen que produzcan una sobreexpresión de la proteína podría incrementar la proliferación celular desencadenando procesos cancerígenos. En el CMTN se ha propuesto que una de las características de estos tumores es la amplificación y activación de proteínas del tipo tirosina quinasa, productos de genes como EGFR, HER2 y FGFR2 [74]. Existen varios ensayos clínicos de fármacos dirigidos a varios genes/proteínas tirosina quinasa, en pacientes con CM, sin embargo como la amplificación del gen FGFR2 se ha reportado en baja frecuencia en tumores triple negativos, es poco probable que se evalúen en dichos ensayos clínicos pacientes con CMTN y amplificación en FGFR2 [75]. En el presente trabajo se ha encontrado dos variantes en el gen FGFR2, una de ellas produce un cambio en la proteína, específicamente en la posición 367, habiendo un cambio del aminoácido de lisina por ácido glutámico (Lys367Glu), dicho cambio se encuentra localizado en una región extracelular de la proteína y en un sitio de corte y empalme (Figura 10), al presentarse en el 81% de las muestras (26/32), es muy probable que este cambio produzca ya sea una variante de la proteína más activa o más afín a su ligando (FGF), ya se ha reportado que la mayoría de las mutaciones en este gen que representan un cambio en la región extracelular causan activación del receptor ya

que facilitan la dimerización necesaria para que la proteína desencadene sus funciones intracelulares, ejemplos de esta situación se han descrito en el síndrome de Crouzon [76] y en el síndrome de Apert [77]. En este último ejemplo dos mutaciones son frecuentes en los pacientes con el síndrome de Apert en el exón 8 y representan cambios en la proteína (Ser252Trp y Pro253Arg) justo entre los dominios Ig-like 2 y Ig-like 3, al parecer estas mutaciones causan una disminución en la tasa de asociación entre el FGFR2 y el FGF2 [78, 79] y por tanto una activación del FGFR2 dependiente de su ligando [79, 80], además Ibrahim y cols proponen que la presencia de estas mutaciones aumentan la interacción y la afinidad de unión de estas proteínas [77, 81]. A pesar de la posible relevancia de la variante encontrada en el presente trabajo, cabe la posibilidad que esta variable sea propia de nuestra población, por lo que es necesario tamizarla en población abierta. El efecto exacto de la variante encontrada en su respectiva proteína es aún desconocido, y falta determinar los niveles de expresión de esta en el tejido, ya que la sobreexpresión se ha adjudicado a tumores de mama con receptores hormonales positivos pensándose en una dependencia hormonal de esta proteína[82-85], y al tratarse nuestras muestras de CMTN no se esperaría la sobreexpresión de FGFR2 en el tejido tumoral. Por otro lado, la presencia de polimorfismos en este gen relacionados con la presencia de CM en mujeres se ha descrito en diversas poblaciones incluyendo población caucásica [86] e hispana [86], así como población china y alemana[87], pero también en hombres con CM se ha descrito la asociación de un polimorfismo del FGFR2 (rs2981582), esto en un estudio en población italiana[88].

Variante en el gen PIK3CA

El gen PIK3CA se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 3 en la banda 3q26.32, es un gen cuyo producto proteínico es el de una subunidad catalítica esencial para fosforilar PtdIns (Phosphatidylinositol), PtdIns4P (Phosphatidylinositol 4-phosphate) y PtdIns(4,5)P2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) para generar phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3), el cual activa cascadas de señalización que incluyen procesos de crecimiento, sobrevivencia y proliferación celular. Las mutaciones de este gen que se han descrito son más comunes en los exones 2 y 9, en los cuales se encuentran dominios helicoidales y de tipo quinasa, y según lo reportado ocurren en una tercera parte de los tumores de mama[89]. En el presente reporte se encontró una variante en 12 de las 32 muestras analizadas (37%), variante reportada previamente, la cual se describe como un SNP (rs3729687) localizado en el exón 14 del gen con un cambio en la posición G77567A y que provoca un cambio en la proteína de Glu707Lys, este cambio se encuentra en una región que es el dominio catalítico para la isoforma alfa clase IA de la proteína, sin embargo este SNP no cuenta con reportes que lo relacionen con el CM. Cabe mencionar que las mutaciones que se han descrito en este gen se han encontrado más frecuentemente en tumores de mama con RE positivos y/o HER2 positivos[90], de manera contraria a nuestra muestra de estudio que incluyó únicamente tumores con RE negativos, también es importante señalar que, la frecuencia de mutaciones en el gen PIK3CA en nuestra muestra fue mayor a lo reportado para tumores de mama triple negativos (37% vs 8%)[90, 91].

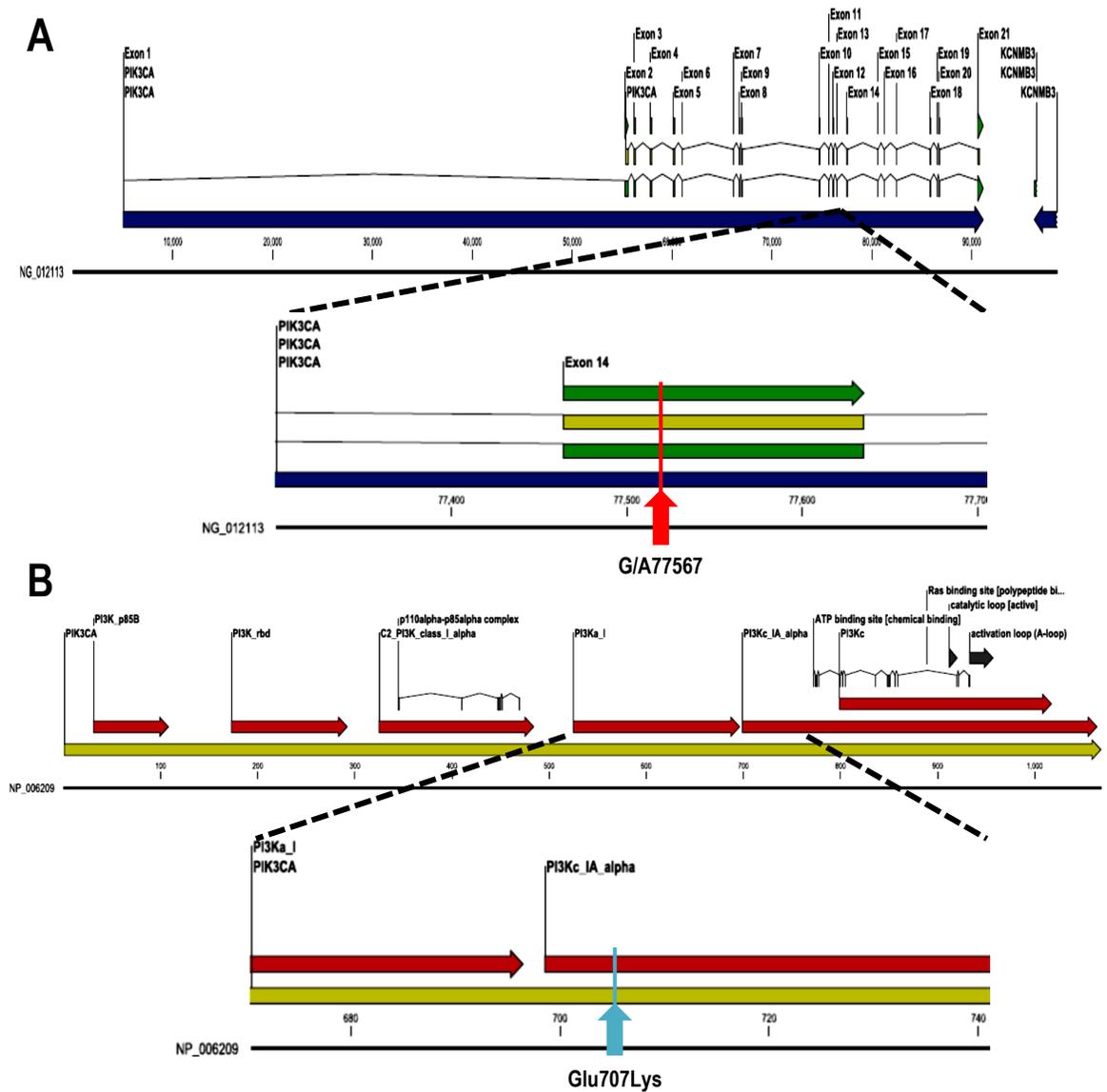


Figura 11.- Estructura del gen y de la proteína PIK3CA. A: Estructura del gen PIK3CA, de recuadros y flechas verdes los exones y de líneas negras los intrones, se muestra 3 variantes de mRNAs del gen, abajo se delimita el exón 14, en el cual se marca de línea y flecha roja la posición de la variante encontrada en el presente estudio (G/A 77567). B: Estructura lineal de la proteína PIK3CA, de amarillo la proteína lineal, de flechas rojas los dominios más importantes de la proteína, abajo se delimita el área de modificación del aminoácido afectado por la variante, la línea y flecha azul marcan la posición del cambio de aminoácido (Glu707Lys).

6.4. Vías de señalización identificadas

Se encontraron cinco vías de señalización en las que los resultados de microarreglos eran significativos (Tabla 8), sin embargo de estas únicamente la vía de Mecanismos moleculares del cáncer (Figura 8), fue la que además contenía los tres genes que en los resultados de secuenciación presentaron las variantes que a nuestro parecer son las más importantes, ya que son variantes no sinónimas y tienen efecto en la proteína. En un estudio similar a este, Vera-Ramírez y cols [92] donde se analizaron tumores de CM antes y después del tratamiento neoadyuvante se analizaron también las vías de señalización afectadas y las redes de genes de un conjunto de 30 genes (relacionados con quimioresistencia según resultados de los autores), sin embargo las vías de señalización no coinciden con las encontradas en el presente trabajo. A pesar de lo anterior, cabe resaltar que en dicho estudio sugieren que la expresión del conjunto de 30 genes relacionados con quimioresistencia pueden estar promovidos por cuatro factores de crecimiento: el Factor beta de crecimiento transformante (TGF- β 1), factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1), factor A de crecimiento endotelial y vascular (VEGFA) y el factor de crecimiento epitelial (EGF), además de dos factores de transcripción (MTPN y Sp-1) y un receptor nuclear dependiente del ligando (THRB). Lo anterior es importante ya que mencionan varios factores de crecimiento relacionados con la quimioresistencia de los tumores de mama que analizaron, y en el presente trabajo se encontró una variante no descrita en el gen FGFR2, presente en la mayoría de las muestras analizadas, estas muestras provenientes de tumores de CMTN, que se caracterizan por tiempo cortos de recaídas y presencia de metástasis en cortos plazos, por lo que este gen y en especial esta variante puede estar involucrada en la presencia de clones quimioresistentes en los tumores de CMTN.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se realizó un análisis de expresión de genes candidatos (BRCA1, EGFR, PTPN12 y TP53) por qPCR, así como de expresión global por microarreglos en pacientes con CM de las cuales se contó con muestra de biopsia y cirugía (antes y después del tratamiento neoadyuvante), además se realizó un análisis de mutaciones en un panel de genes relacionados con cáncer en pacientes con CMTN. En cuanto a la expresión de genes candidatos es necesario ampliar el número de muestra para encontrar tendencias de la expresión de estos genes y la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Con los datos de microarreglos se pudieron clasificar molecularmente los tumores, además de que se encontró una firma de 59 genes diferencialmente expresados entre las muestras de antes y después del tratamiento. La secuenciación de nueva generación nos mostró tres variantes no sinónimas en los genes ATM, FGFR2 y PIK3CA que no han sido descritas anteriormente y que pueden tener impacto en la función de la proteína así como en la regulación de las vías en las que participa. Finalmente se encontraron vías de señalización en las cuales convergen los datos evaluados en microarreglos y secuenciación. A pesar de que es necesario validar los resultados de microarreglos y secuenciación en cohortes más grandes de pacientes, el presente trabajo abre el panorama a la detección de nuevas firmas genómicas relacionadas a la respuesta al tratamiento neoadyuvante y a la presencia de probables mutaciones propias de nuestra población.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. INEGI: "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER" DATOS NACIONALES. In. Edited by Geografía INdEy. México D.F.; 2013.
2. **Incidence/mortality data** [Available from: <http://globocan.iarc.fr>]
3. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO: **Basal-like breast cancer: a critical review.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(15):2568-2581.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA *et al*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
5. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, Macmillan D, Blamey RW, Ellis IO: **High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses.** *Int J Cancer* 2005, **116**(3):340-350.
6. Yu K, Lee CH, Tan PH, Tan P: **Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(16):5508-5517.
7. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z *et al*: **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(8):1160-1167.
8. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, Nordgren H, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B *et al*: **Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis.** *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**(4):262-272.
9. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ *et al*: **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *N Engl J Med* 2002, **347**(25):1999-2009.
10. Bertucci F, Nasser V, Granjeaud S, Eisinger F, Adelaide J, Tagett R, Loriod B, Giaconia A, Benziane A, Devillard E *et al*: **Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival.** *Hum Mol Genet* 2002, **11**(8):863-872.
11. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET: **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(18):10393-10398.
12. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT *et al*: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**(6871):530-536.
13. Van Laere S, Beissbarth T, Van der Auwera I, Van den Eynden G, Trinh XB, Elst H, Van Hummelen P, van Dam P, Van Marck E, Vermeulen P *et al*: **Relapse-free survival in breast cancer patients is associated with a gene expression signature characteristic for inflammatory breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(22):7452-7460.
14. Miller WR, Larionov A, Anderson TJ, Evans DB, Dixon JM: **Sequential changes in gene expression profiles in breast cancers during treatment with the aromatase inhibitor, letrozole.** *Pharmacogenomics J* 2012, **12**(1):10-21.
15. Paik S: **Development and clinical utility of a 21-gene recurrence score prognostic assay in patients with early breast cancer treated with tamoxifen.** *Oncologist* 2007, **12**(6):631-635.
16. Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, Booser D, Theriault RL, Buzdar AU, Dempsey PJ *et al*: **Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(26):4236-4244.

17. Sorlie T, Perou CM, Fan C, Geisler S, Aas T, Nobel A, Anker G, Akslen LA, Botstein D, Borresen-Dale AL *et al*: **Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(11):2914-2918.
18. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Nasser V, Loriod B, Camerlo J, Tagett R, Tarpin C, Houvenaeghel G *et al*: **Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy.** *Cancer Res* 2004, **64**(23):8558-8565.
19. Chang JC, Makris A, Gutierrez MC, Hilsenbeck SG, Hackett JR, Jeong J, Liu ML, Baker J, Clark-Langone K, Baehner FL *et al*: **Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **108**(2):233-240.
20. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P *et al*: **Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(16):5678-5685.
21. Potti A, Dressman HK, Bild A, Riedel RF, Chan G, Sayer R, Cragun J, Cottrill H, Kelley MJ, Petersen R *et al*: **Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics.** *Nature medicine* 2006, **12**(11):1294-1300.
22. Elias AD: **Triple-negative breast cancer: a short review.** *American journal of clinical oncology*, **33**(6):637-645.
23. Reis-Filho JS, Tutt AN: **Triple negative tumours: a critical review.** *Histopathology* 2008, **52**(1):108-118.
24. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N: **Triple-negative breast cancer--current status and future directions.** *Ann Oncol* 2009, **20**(12):1913-1927.
25. Cleator S, Heller W, Coombes RC: **Triple-negative breast cancer: therapeutic options.** *The lancet oncology* 2007, **8**(3):235-244.
26. Gerson R. VA, Alban L. et al. : **Time to recurrence and survival in triple negative early-stage breast cancer** *Journal of Clinical Oncology. ASCO Annual Meeting Proceedings 2007, 25 Part I*(18S):21151.
27. El Weshi A. TA, Al Sayed A. et al.: **Triple-negative breast cancer. A clinicopathologic study of 113 cases and comparison with 55 cases with triple positive breast cancer: A matched-control analysis.** *Journal of Clinical Oncology ASCO Annual Meeting Proceedings 2007, Vol 25 Part I.* (18S): 21119.
28. Cazzaniga M. E. MG, Pronzato P. et al. : **Pathological characteristics and clinical outcome in triple-negative breast cancer (BC) patients (PTS): Results from the NORA study.** *Journal of Clinical Oncology ASCO Annual Meeting Proceedings 2007, Vol 25 Part I.*(18S):11014.
29. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA: **Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(15 Pt 1):4429-4434.
30. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM: **The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(8):2329-2334.
31. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V: **Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry.** *Cancer* 2007, **109**(9):1721-1728.
32. Oncology ASoC: **Guía de cáncer de mama.**
33. **NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.** [<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/041ssa202.html>]
34. Society AC: **Cáncer de seno (mama).** 2013.

35. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE: **Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium.** *Lancet* 1994, **343**(8899):692-695.
36. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J *et al*: **Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium.** *American journal of human genetics* 1998, **62**(3):676-689.
37. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W *et al*: **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** *Science* 1994, **266**(5182):66-71.
38. Stratton MR, Ford D, Neuhasen S, Seal S, Wooster R, Friedman LS, King MC, Egilsson V, Devilee P, McManus R *et al*: **Familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q.** *Nature genetics* 1994, **7**(1):103-107.
39. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D *et al*: **Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13.** *Science* 1994, **265**(5181):2088-2090.
40. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D *et al*: **The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds.** *Nature genetics* 1996, **12**(3):333-337.
41. **Low- and Moderate-Penetrance Genes Associated With Breast and/or Ovarian Cancer** [<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/HealthProfessional/page3>]
42. Gao Y, Zhu J, Zhang X, Wu Q, Jiang S, Liu Y, Hu Z, Liu B, Chen X: **BRCA1 mRNA expression as a predictive and prognostic marker in advanced esophageal squamous cell carcinoma treated with cisplatin- or docetaxel-based chemotherapy/chemoradiotherapy.** *PLoS One* 2013, **8**(1):e52589.
43. Santarpia M, Magri I, Sanchez-Ronco M, Costa C, Molina-Vila MA, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, Mayo C, Benlloch S, Viteri S *et al*: **mRNA expression levels and genetic status of genes involved in the EGFR and NF-kappaB pathways in metastatic non-small-cell lung cancer patients.** *Journal of translational medicine* 2011, **9**:163.
44. Meseure D, Vacher S, Drak Alsibai K, Trassard M, Susini A, Le Ray C, Lerebours F, Le Scodan R, Spyrtatos F, Marc Guinebretiere J *et al*: **Profiling of EGFR mRNA and protein expression in 471 breast cancers compared with 10 normal tissues: a candidate biomarker to predict EGFR inhibitor effectiveness.** *Int J Cancer* 2012, **131**(4):1009-1010.
45. Sun T, Aceto N, Meerbrey KL, Kessler JD, Zhou C, Migliaccio I, Nguyen DX, Pavlova NN, Botero M, Huang J *et al*: **Activation of multiple proto-oncogenic tyrosine kinases in breast cancer via loss of the PTPN12 phosphatase.** *Cell* 2011, **144**(5):703-718.
46. Xunyi Y, Zhentao Y, Dandan J, Funian L: **Clinicopathological significance of PTPN12 expression in human breast cancer.** *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 2012, **45**(12):1334-1340.
47. Wu MQ, Hu P, Gao J, Wei WD, Xiao XS, Tang HL, Li X, Ge QD, Jia WH, Liu RB *et al*: **Low expression of tyrosine-protein phosphatase nonreceptor type 12 is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in operable triple-negative breast cancer.** *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2013, **14**(1):287-292.
48. Shien T, Kinoshita T, Seki K, Yoshida M, Hojo T, Shimizu C, Taira N, Doihara H, Akashi-Tanaka S, Tsuda H *et al*: **p53 expression in pretreatment specimen predicts response to neoadjuvant chemotherapy including anthracycline and taxane in patients with primary breast cancer.** *Acta medica Okayama* 2013, **67**(3):165-170.
49. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T *et al*: **A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer.** *N Engl J Med* 2004, **351**(27):2817-2826.

50. Gonzalez-Angulo AM, Iwamoto T, Liu S, Chen H, Do KA, Hortobagyi GN, Mills GB, Meric-Bernstam F, Symmans WF, Pusztai L: **Gene expression, molecular class changes, and pathway analysis after neoadjuvant systemic therapy for breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(4):1109-1119.
51. Valladares A, Hernandez NG, Gomez FS, Curiel-Quezada E, Madrigal-Bujaidar E, Vergara MD, Martinez MS, Arenas Aranda DJ: **Genetic expression profiles and chromosomal alterations in sporadic breast cancer in Mexican women.** *Cancer genetics and cytogenetics* 2006, **170**(2):147-151.
52. Garcia N, Salamanca F, Astudillo-de la Vega H, Curiel-Quesada E, Alvarado I, Penaloza R, Arenas D: **A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females.** *BMC cancer* 2005, **5**:93.
53. Beck J, Urnovitz HB, Mitchell WM, Schutz E: **Next generation sequencing of serum circulating nucleic acids from patients with invasive ductal breast cancer reveals differences to healthy and nonmalignant controls.** *Molecular cancer research : MCR* 2010, **8**(3):335-342.
54. Kanagal-Shamanna R, Portier BP, Singh RR, Routbort MJ, Aldape KD, Handal BA, Rahimi H, Reddy NG, Barkoh BA, Mishra BM *et al*: **Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2013.
55. Seo SB, King JL, Warshauer DH, Davis CP, Ge J, Budowle B: **Single nucleotide polymorphism typing with massively parallel sequencing for human identification.** *International journal of legal medicine* 2013.
56. Murphy KM, Eshleman JR: **Simultaneous sequencing of multiple polymerase chain reaction products and combined polymerase chain reaction with cycle sequencing in single reactions.** *The American journal of pathology* 2002, **161**(1):27-33.
57. Beadling C, Neff TL, Heinrich MC, Rhodes K, Thornton M, Leamon J, Andersen M, Corless CL: **Combining highly multiplexed PCR with semiconductor-based sequencing for rapid cancer genotyping.** *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2013, **15**(2):171-176.
58. Lu C, Wu W, Xiao J, Meng Y, Zhang S, Zhang X: **[Detection of pathogenic mutations in Marfan syndrome by targeted next-generation semiconductor sequencing].** *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese journal of medical genetics* 2013, **30**(3):301-304.
59. Yousem SA, Dacic S, Nikiforov YE, Nikiforova M: **Pulmonary langerhans cell histiocytosis: profiling of multifocal tumors using next-generation sequencing identifies concordant occurrence of BRAF V600E mutations.** *Chest* 2013, **143**(6):1679-1684.
60. Becker K, Vollbrecht C, Koitzsch U, Koenig K, Fassunke J, Huss S, Nuernberg P, Heukamp LC, Buettner R, Odenthal M *et al*: **Deep ion sequencing of amplicon adapter ligated libraries: a novel tool in molecular diagnostics of formalin fixed and paraffin embedded tissues.** *Journal of clinical pathology* 2013, **66**(9):803-806.
61. Singh RR, Patel KP, Routbort MJ, Reddy NG, Barkoh BA, Handal B, Kanagal-Shamanna R, Greaves WO, Medeiros LJ, Aldape KD *et al*: **Clinical Validation of a Next-Generation Sequencing Screen for Mutational Hotspots in 46 Cancer-Related Genes.** *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2013.
62. Beadling C, Heinrich MC, Warrick A, Forbes EM, Nelson D, Justusson E, Levine J, Neff TL, Patterson J, Presnell A *et al*: **Multiplex mutation screening by mass spectrometry evaluation of 820 cases from a personalized cancer medicine registry.** *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2011, **13**(5):504-513.
63. Feng YM, Li XQ, Sun BC, Gao XC, Gu L, Niu Y, Hao XS: **[Prognostic molecular classification of breast cancers based on gene expression profiling].** *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006, **28**(12):900-906.

64. Chan M, Ji SM, Yeo ZX, Gan L, Yap E, Yap YS, Ng R, Tan PH, Ho GH, Ang P *et al*: **Development of a next-generation sequencing method for BRCA mutation screening: a comparison between a high-throughput and a benchtop platform.** *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2012, **14**(6):602-612.
65. Tarabeux J, Zeitouni B, Moncoutier V, Tenreiro H, Abidallah K, Lair S, Legoix-Ne P, Leroy Q, Rouleau E, Golmard L *et al*: **Streamlined ion torrent PGM-based diagnostics: BRCA1 and BRCA2 genes as a model.** *European journal of human genetics : EJHG* 2013.
66. Horvath A, Pakala SB, Mudvari P, Reddy SD, Ohshiro K, Casimiro S, Pires R, Fuqua SA, Toi M, Costa L *et al*: **Novel Insights into Breast Cancer Genetic Variance through RNA Sequencing.** *Scientific reports* 2013, **3**:2256.
67. Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, Byrd P, Taylor M, Easton DF: **Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers.** *Journal of the National Cancer Institute* 2005, **97**(11):813-822.
68. Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K *et al*: **ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles.** *Nature genetics* 2006, **38**(8):873-875.
69. Tommiska J, Bartkova J, Heinonen M, Hautala L, Kilpivaara O, Eerola H, Aittomaki K, Hofstetter B, Lukas J, von Smitten K *et al*: **The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer.** *Oncogene* 2008, **27**(17):2501-2506.
70. Lee JH, Mand MR, Deshpande RA, Kinoshita E, Yang SH, Wyman C, Paull TT: **Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase activity is regulated by ATP-driven conformational changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex.** *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(18):12840-12851.
71. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, MacDonald TY, Jarosz M, Lipson D, Tagawa ST, Nanus DM *et al*: **Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity.** *European urology* 2013, **63**(5):920-926.
72. Scott SP, Bendix R, Chen P, Clark R, Dork T, Lavin MF: **Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(2):925-930.
73. Bhattacharya N, Mukherjee N, Singh RK, Sinha S, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK: **Frequent Alterations of MCPH1 and ATM are Associated with Primary Breast Carcinoma: Clinical and Prognostic Implications.** *Annals of surgical oncology* 2012.
74. Turner N, Lambros MB, Horlings HM, Pearson A, Sharpe R, Natrajan R, Geyer FC, van Kouwenhove M, Kreike B, Mackay A *et al*: **Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets.** *Oncogene* 2010, **29**(14):2013-2023.
75. Berrada N, Delaloge S, Andre F: **Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization?** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2010, **21 Suppl 7**:vii30-35.
76. Neilson KM, Friesel RE: **Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-2 by a point mutation associated with Crouzon syndrome.** *The Journal of biological chemistry* 1995, **270**(44):26037-26040.
77. Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, Yu K, Ornitz DM, Mohammadi M: **Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(13):7182-7187.
78. Schaefer F, Anderson C, Can B, Say B: **Novel mutation in the FGFR2 gene at the same codon as the Crouzon syndrome mutations in a severe Pfeiffer syndrome type 2 case.** *American journal of medical genetics* 1998, **75**(3):252-255.

79. Wang X, Weng LP, Yu Q: **Specific inhibition of FGF-induced MAPK activation by the receptor-like protein tyrosine phosphatase LAR.** *Oncogene* 2000, **19**(19):2346-2353.
80. Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C: **Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts.** *The Journal of cell biology* 2000, **149**(6):1297-1308.
81. Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, Mohammadi M: **Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity.** *Cell* 2000, **101**(4):413-424.
82. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struewing JP, Morrison J, Field H, Luben R *et al*: **Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.** *Nature* 2007, **447**(7148):1087-1093.
83. Zheng W, Long J, Gao YT, Li C, Zheng Y, Xiang YB, Wen W, Levy S, Deming SL, Haines JL *et al*: **Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1.** *Nature genetics* 2009, **41**(3):324-328.
84. Liang J, Chen P, Hu Z, Zhou X, Chen L, Li M, Wang Y, Tang J, Wang H, Shen H: **Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women.** *Carcinogenesis* 2008, **29**(12):2341-2346.
85. Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, Wacholder S, Wang Z, Welch R, Hutchinson A *et al*: **A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer.** *Nature genetics* 2007, **39**(7):870-874.
86. Slattery ML, John EM, Stern MC, Herrick J, Lundgreen A, Giuliano AR, Hines L, Baumgartner KB, Torres-Mejia G, Wolff RK: **Associations with growth factor genes (FGF1, FGF2, PDGFB, FGFR2, NRG2, EGF, ERBB2) with breast cancer risk and survival: the Breast Cancer Health Disparities Study.** *Breast Cancer Res Treat* 2013, **140**(3):587-601.
87. Barzan D, Veldwijk MR, Herskind C, Li Y, Zhang B, Sperk E, Du WD, Zhang XJ, Wenz F: **Comparison of genetic variation of breast cancer susceptibility genes in Chinese and German populations.** *European journal of human genetics : EJHG* 2013.
88. Ottini L, Silvestri V, Saieva C, Rizzolo P, Zanna I, Falchetti M, Masala G, Navazio AS, Graziano V, Bianchi S *et al*: **Association of low-penetrance alleles with male breast cancer risk and clinicopathological characteristics: results from a multicenter study in Italy.** *Breast cancer research and treatment* 2013, **138**(3):861-868.
89. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C *et al*: **The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers.** *Cancer biology & therapy* 2004, **3**(8):772-775.
90. Santarpia L, Qi Y, Stemke-Hale K, Wang B, Young EJ, Booser DJ, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Hellerstedt B, Pippen J *et al*: **Mutation profiling identifies numerous rare drug targets and distinct mutation patterns in different clinical subtypes of breast cancers.** *Breast cancer research and treatment* 2012, **134**(1):333-343.
91. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A *et al*: **An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer.** *Cancer research* 2008, **68**(15):6084-6091.
92. Vera-Ramirez L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa CL, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M, Lorente JA: **Transcriptional shift identifies a set of genes driving breast cancer chemoresistance.** *PLoS One* 2013, **8**(1):e53983.

9. ANEXOS

9.1. Carta comité ética

 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN	<h1 style="margin: 0;">UANL</h1> <h2 style="margin: 0;">Comité de Ética y Comité de Investigación</h2>	 FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO
---	--	--

DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Investigador Principal
Departamento de Bioquímica
Presente.-

Estimada Dra. Ortiz:

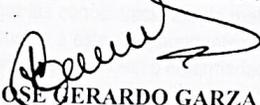
Le informo que nuestro **Comité de Ética** de la Facultad de Medicina de la UANL y Hospital Universitario "José Eleuterio González", ha **evaluado y aprobado** el siguiente protocolo de investigación titulado **"Análisis de perfiles genómicos en pacientes con cáncer de mama y su asociación con la respuesta al tratamiento"**, participando además el Dr. med. Servando Cardona Huerta, Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado, Dr. Augusto Rojas Martínez, Dr. Carlos Córdova Fletes, M.C. Sandra Karina Santuario Facio, Q.F.B. Yadira Xitlalli Pérez Páramo, Dr. Yohan Grodin, Dr. med. Raquel Garza Guajardo, Dra. med. Oralia Barboza Quintana, Dra. Petra Yuridia Lizet Alvarado Bernal, Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez como Co-Investigadores.

Su proyecto quedó registrado en esta Subdirección con la clave **BI11-005**. Este número es necesario para la autorización de los servicios de apoyo a la investigación

Le pedimos mantenernos informados del avance o terminación de su proyecto.

Sin más por el momento, me despido de usted.

Atentamente,
"Alere Flammas Veritatis"
Monterrey N.L. 08 de Noviembre del 2011


DR. JOSÉ GERARDO GARZA LEAL
Secretario de Investigación Clínica
Presidente del Comité de Ética y Comité de Investigación

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
Edificio de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. planta baja
Av. Francisco I. Madero Pte. s/n y Dr. E. Aguero Panguero, Col. Mitras Centro, C.P. 64460 Monterrey N.L. México
Tel./Fax: (+52) 8329 4050 Ext. 2977 al 2974 Correo Electrónico: sinvestigacion@hu.uanl.mx

9.2. Consentimiento Informado



UV



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANÁLISIS DE PERFILES GENÓMICOS Y PROTEÓMICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Se solicita a usted que lea por favor el siguiente material con el propósito de asegurar que se encuentre completamente informado(a) de la naturaleza de este proyecto de investigación. Al firmar esta forma, queda confirmado usted ha sido suficientemente informado(a) y que da su consentimiento para participar en este estudio. Las regulaciones federales requieren una carta de consentimiento informado antes de cualquier participación en un estudio de investigación, de manera que usted pueda conocer la naturaleza y riesgos de su participación y darle la oportunidad de decidir libremente si participa o no participa.

PROPOSITO

Usted está siendo invitado(a) a participar voluntariamente en el proyecto de investigación cuyo título esta señalado al principio de este escrito. El propósito de este proyecto de investigación es analizar su material genético (información heredada de padres a hijos que nos distingue como individuos) para conocer como su organismo puede responder o no al tratamiento que su médico ha indicado para contrarrestar el cáncer de mama. La razón de este estudio es porque se ha descrito que mecanismos moleculares en nuestras células actúan de manera diferente ante el mismo medicamento, y conocer estos mecanismos nos ayudará en el futuro a proveer un tratamiento más efectivo contra el cáncer de mama, con menos efectos secundarios y más probabilidad de respuesta favorable. Pensamos que el material genético de las células tanto del tumor como el de su sangre nos ayudará a determinar estos mecanismos y a saber porque algunas personas si responden bien al tratamiento mientras que otras no. Como el material genético es el que provee la información que determina el desarrollo de los humanos, es en ese material que haremos el estudio, y para eso requeriremos de usted la donación voluntaria de parte del tejido que le será retirado durante su biopsia y/o cirugía, y de 10 ml de sangre periférica para extraer de ellas ADN, ARN y plasma y una muestra de orina, con los cuales haremos las investigaciones explicadas.

La muestra de orina es para investigar las concentraciones de metabolitos del medicamento que el doctor le recetó, para valorar su respuesta a éste. Es importante mencionarle que sus muestras NO serán utilizadas para investigar ninguna otra condición ó enfermedad genética.

CRITERIOS DE SELECCION

El investigador principal o un miembro de su grupo de investigadores hablarán con usted acerca de lo que se necesita para que usted participe en el estudio. Para ser candidato usted debe tener al menos 18 años, tener diagnóstico de cáncer de mama y estar programada para ser sometida a una cirugía de la mama. Serán excluidas del estudio aquellas personas que hayan recibido un tratamiento por cáncer de mama u otro tumor.

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN

COMITÉ DE ÉTICA
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

PROCEDIMIENTOS

La siguiente información describe su participación en este estudio:

1. Cuestionario.

A través de un cuestionario una persona calificada le hará algunas preguntas básicas acerca de su estilo de vida cotidiano y su historial de salud.

2. Muestra de orina.

Será necesario también coleccionar una muestra de orina de usted. La cantidad de orina será menos de media taza. Es necesario que se trate de una muestra de orina recolectada después de su primera sesión de quimioterapia y nosotros le daremos instrucciones de cómo debe usted coleccionar y almacenar la muestra hasta antes de que nos la entregue. En su muestra de orina mediremos los niveles de medicamento tanto en su forma original como los productos resultantes de la manera como su cuerpo los ha transformado.

3. Tejido de seno/ muestra de sangre.

Nosotros coleccionaremos exclusivamente parte del tejido que el cirujano remueve de su(s) seno(s) para el diagnóstico inicial (biopsia) y del que es removido en la cirugía para eliminar el tumor. No se tomará ningún tejido adicional ni se hará ningún procedimiento adicional al que el cirujano normalmente realiza en este tipo de operaciones. Tomaremos una muestra de sangre, la cual será obtenida al mismo tiempo que se toman muestras de sangre para los estudios preoperatorios, por lo cual esto no le implicará una punción extra. De esas muestras aislaremos el DNA y el RNA, el material que le describimos en el primer párrafo.

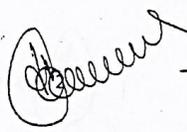
Con la muestra de tejido nosotros extraeremos el RNA y DNA para estudiar el perfil genético, es decir, la manera como los genes se expresan en las células. El análisis consistirá en valorar la expresión de prácticamente todos los genes humanos conocidos a la fecha.

El RNA y DNA de su sangre se utilizará para los estudios de respuesta a medicamento y el suero será almacenado en congelación para ser utilizados en futuros análisis de validación de resultados del primer estudio. Sus muestras serán almacenadas por 10 años y después serán desechadas.

Si desea saber de manera más amplia como será llevado a cabo el estudio, podemos proveerle de información más específica.

4. Investigación futura y almacenamiento de las muestras.

Para nosotros es muy importante almacenar su DNA y RNA para poder utilizarlo en estudios de validación de los resultados obtenidos en la primera etapa y porque existe la posibilidad de que en un futuro se puedan estudiar otros aspectos importantes de la enfermedad u otros mecanismos involucrados en como el cuerpo procesa algunos medicamentos que no han sido descritos hasta ahora. En este momento no podríamos decir exactamente el o los tipos de estudio que se realizarían, debido a que ellos dependerán del desarrollo de nuevas técnicas y la generación de nuevo conocimiento. Si acepta, usted estará dando su consentimiento para participar tanto en este estudio como para que sus muestras puedan ser utilizadas en los estudios futuros que le mencionamos.



COMITÉ DE ÉTICA

De cualquier manera, usted puede decidir en cualquier momento dejar de participar en el estudio contactando a los investigadores en los teléfonos que se encuentran señalados al final de este formato.

Si decide abandonar el estudio, sus muestras serán destruidas, y sus resultados no serán utilizados en ninguno de los estudios excepto aquellos que ya hayan sido reportados antes de que usted decidiera renunciar.

RIESGOS

El riesgo físico que existe al participar en este estudio es muy bajo, debido a que no se modificará ningún procedimiento de los que se realizan de rutina para su diagnóstico y tratamiento. La recolección de sangre se hará cuando se tomen las muestras para sus estudios preoperatorios, por lo cual usted no será sometido a otra punción, y la recolección de orina se realizará en una de sus visitas al seguimiento del tratamiento. Por lo que respecta al tejido del seno, solo tomaremos el tejido que el cirujano tomará durante la cirugía y que en otras circunstancias normalmente es desechado, por lo cual no se requiere ningún otro procedimiento adicional que ponga en riesgo su integridad física, que aquel que usted tendrá al someterse a la cirugía. Solo cuatro miembros del cuerpo de investigadores tendrán acceso a su información personal y esta información será mantenida en secreto de una manera segura.

BENEFICIOS

No existen beneficios directos para usted por su participación, el beneficio es indirecto al contribuir al conocimiento de la enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD

Su identidad será conocida solo por cuatro miembros del grupo. Sus resultados personales no se pondrán a disposición de terceras partes tales como empleadores, organizaciones gubernamentales, compañías de seguros, instituciones de educación, y tampoco se le hará llegar a su médico. Es posible que alguna agencia regulatoria gubernamental o comité de ética pueda revisar su información, debido a que esos organismos se encargan de vigilar que los proyectos de investigación no violen los derechos de los participantes. La confidencialidad de las muestras será protegida asignándole un código específico, de tal manera que su muestra no será identificada con su nombre si no con un número que será ligado a su muestra. Ese número será salvaguardado por los responsables del estudio. Sus muestras serán almacenadas en la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las muestras serán almacenadas por 10 años, después de lo cual serán destruidas. Usted puede decidir en cualquier momento dejar de participar en el estudio contactando a los investigadores en los teléfonos que se encuentran señalados al final de este formato. Si decide abandonar el estudio, sus muestras serán destruidas, y sus resultados no serán utilizados en ninguno de los estudios excepto aquellos que ya hayan sido reportados antes de que usted decidiera renunciar.

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA

COSTO DE LA PARTICIPACION Y COMPENSACION O LAS PARTICIPANTES

No existe ningún costo para su participación, excepto su tiempo. No existe tampoco compensación alguna por participar en este estudio.

CONTACTOS

Usted puede obtener información adicional acerca de esta investigación, o externar sus comentarios o quejas llamando al Investigador Principal: Dra. Rocio Ortiz López (8183485287), o al cirujano que la atiende (8183483303). También puede contactar al presidente del Comité de Ética que aprobó este proyecto de investigación: Dr. José Gerardo Garza Leal, Presidente del Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la UANL y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" teléfono 83294050 ext 2870-74.

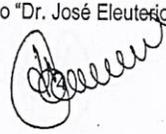
RESPONSABILIDADES

Todos los estudios que se realizaran en este proyecto de investigación son a partir de las muestras obtenidas, durante procedimientos de rutina para su tratamiento. Por lo tanto no se esperan efectos adversos o indeseables, sin embargo sabemos que algunos efectos indeseables son posibles en cualquier programa de investigación, aún a pesar de la utilización de altos estándares de seguridad los cuales podrían ocurrir aun cuando ni usted ni los investigadores incurran en ninguna falta. Sin embargo, pueden ocurrir algunos imprevistos que requieran atención. Usted no cede ninguno de sus derechos legales al firmar esta forma. En el caso de que usted requiera de atención médica por daños causados que usted considera fueron provocados por esta investigación por favor contacte al Investigador Principal mencionado con anterioridad.

AUTORIZACIÓN

Yo, _____ por la presente hago constar que antes de dar mi consentimiento para firmar esta forma, el método, inconvenientes, riesgos y beneficios del proyecto de investigación me han sido explicados y mis preguntas han sido contestadas. Tengo el derecho de preguntar en cualquier momento y la libertad de abandonar el estudio sin que esto ocasione ninguna actitud o hecho negativo para mi persona. Si mi participación en este proyecto de investigación es terminada por el investigador responsable, las razones me deberán ser explicadas. Cualquier información nueva desarrollada durante el curso de este estudio que pueda afectar mi deseo de continuar en el proyecto de investigación me será notificada en cuanto esté disponible. Esta forma de consentimiento deberá ser llenada con la M. C. Sandra Karina Santuario Facio o con la QFB Yadira Xitlalli Pérez Páramo de la Unidad de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación del Centro de investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León con acceso restringido solo a ellas. Solo la Dra. Rocio Ortiz López y el Dr. Servando Cardona podrán tener acceso a esta información. Al firmar esta forma yo no cedo ninguno de mis derechos. Así mismo, me será dada una copia firmada de este documento.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además, entiendo que estoy en la libertad de retirarme en el momento que desee y si tomo esta decisión no me responsabilizo de los tratamientos que se requieran en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González".



COMITÉ DE ÉTICA

Entiendo que la información obtenida de la investigación será manejada en forma confidencial y que en ningún momento se violará mi privacidad.

Además, en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la UANL, estarán en la disposición de brindarme tratamiento médico o quirúrgico sin costo, en caso de que resultara dañado directamente por cualquiera de los procedimientos del proyecto de investigación, y en caso de daño permanente, tendré derecho a ser indemnizado de acuerdo al daño sufrido.

Nombre del Paciente (impreso)

Fecha

Firma del paciente o tutor

Teléfono

Dirección

Nombre y firma de Testigo 1

Dirección

Nombre y firma de Testigo 2

Dirección

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Yo investigador del proyecto, he explicado claramente a la paciente la naturaleza del proyecto de investigación mencionado arriba. Por la presente certifico que en lo mejor de mi conocimiento la persona que firmó esta forma, ha sido informada de la naturaleza, demandas, beneficios y riesgos implicados en su participación.

Nombre y Firma del Entrevistador

Fecha

Nombre y firma del Investigador Principal

Fecha

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA

9.3. Cuestionario





FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

ANÁLISIS DE PERFILES GENÓMICOS Y PROTEÓMICOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Cuestionario

Nombre del paciente: _____ No. En el proyecto _____

Nombre de entrevistador: _____ Fecha: _____

I.- Información socio-demográfica:

1. Lugar de nacimiento:

1) Monterrey y área metropolitana	3) Otro Estado: _____
2) Otro municipio de Nuevo León	
2. ¿Qué nacionalidad tiene?

1) Mexicana	3) Otra: _____
2) Estadounidense	
3. ¿Cuánto tiempo tiene viviendo en su actual domicilio (Ciudad y/o Estado)?

1) Menos de un año	4) 20-29 años
2) 1- 9 años	5) 30 años o más
3) 10-19 años	
4. ¿Cuál es su edad actual? _____

1) 30 años o menos	4) 41-45 años
2) 31-35 años	5) 46-50 años
3) 36-40 años	6) Más de 50 años
5. ¿Cuál es su estado civil?

1) Casada	4) Divorciada
2) Unión libre	5) Soltera (nunca casada)
3) Separada	
6. ¿Cuál es su nivel más alto de escolaridad?

1) Kinder	9) Carrera técnica terminada
2) Primaria incompleta	10) Profesional (licenciatura, ingeniería) incompleta
3) Primaria terminada	11) Profesional (licenciatura, ingeniería) terminado
4) Secundaria incompleta	12) Posgrado (maestría o doctorado) incompleto
5) Secundaria terminada	13) Posgrado (maestría o doctorado) terminado
6) Preparatona (o bachillerato) incompleto	
7) Preparatona (o bachillerato) terminado	
8) Carrera técnica incompleta	
7. Actualmente usted está:

1) Empleado con salario	6) Estudiante
2) Trabajando por su cuenta	7) Jubilado
3) Sin trabajo por más de un año	8) Incapacitado para trabajar
4) Sin trabajo por menos de un año	9) No desea contestar
5) Ama de casa	

II.- Morfometría

1. Peso: _____ Kg Talla: _____ cm ASC: _____ $ASC = \sqrt{\frac{\text{peso} \times \text{talla}}{3600}}$

Página 1 de 7



III.- Información Gineco-obstétrica.

1. ¿A qué edad empezó su periodo menstrual?
 - 1) Nunca ha menstruado
 - 2) 9 o menor
 - 3) 10-12
 - 4) 13-15
 - 5) 16 o mayor
 - 6) No sabe
2. ¿Usted está embarazada actualmente?
 - 1) Si
 - 2) No
3. ¿Cuántas veces ha estado embarazada? (incluyendo abortos y embarazos a término)
 - 1) 0
 - 2) 1
 - 3) 2
 - 4) 3
 - 5) 4
 - 6) 5
 - 7) 6
 - 8) 7
 - 9) 8
 - 10) 9
 - 11) 10
 - 12) Más de 10

Si contesta alguna opción diferente a 0 responda las preguntas 4, 5, 6, 7 y 8 si contesto la opción 1 pase a pregunta 9.
4. ¿Cuántos de sus embarazos fueron embarazos a término?
 - 1) Numero: _____
 - 2) Ninguno (pasar a pregunta 9)
5. ¿Qué edad tenía cuando tuvo su primer embarazo a término?
 - 1) 15 años o menos
 - 2) 16-20 años
 - 3) 21-25 años
 - 4) 26-30 años
 - 5) 31-40 años
 - 6) 41 años o más
 - 7) Ninguno (pasar a pregunta 10)
6. ¿Usted alimento con leche materna a alguno de sus hijos?
 - 1) Si
 - 2) No (pasar a pregunta 10)
7. ¿Qué edad tenía cuando alimento con leche materna a sus hijos?
 - 1) 15 años o menos
 - 2) 16-20 años
 - 3) 21-25 años
 - 4) 26-30 años
 - 5) 31-40 años
 - 6) 41 años o más
8. ¿Cuántas semanas o meses en promedio alimento con leche materna a sus hijos?
 - 1) 1-2 meses
 - 2) 3-6 meses
 - 3) 6-12 meses
 - 4) 1 año o más
9. ¿Ha usado anticonceptivos orales? (anticoncepción, menstruación irregular).
 - 1) Si
 - 2) No (pasar a pregunta 11)
10. ¿Por cuánto tiempo?
 - 1) 6 meses o menos
 - 2) 6 meses-1 año
 - 3) 1-3 años
 - 4) 3-5 años
 - 5) Más de 5 años
11. ¿Aun tiene periodos menstruales?
 - 1) Si
 - 2) No (pase a la pregunta 15)
12. ¿Hace cuanto tiempo dejó de menstruar?
 - 1) 12 meses o menos
 - 2) Más de 12 meses
13. ¿Ha usado hormonas femeninas por dos meses o más para evitar síntomas de menopausia?
 - 1) Si
 - 2) No (pase a la pregunta 15)



14. ¿Por cuánto tiempo las ha usado?
- | | |
|--------------------|-----------------|
| 1) 3 meses o menos | 4) 1-3 años |
| 2) 4-6 meses | 5) 4- 5 años |
| 3) 7meses-1 año | 6) 5 años o más |
15. ¿Se tomó usted alguna mamografía, previa a su diagnóstico?
- | | |
|-------|--|
| 1) Si | |
| 2) No | |
16. ¿Cuántas mamografías se ha hecho en los últimos 5 años?
- | | | |
|------------|------|------------|
| 1) Ninguna | 3) 2 | 5) 4 |
| 2) 1 | 4) 3 | 6) 5 o más |

IV.- Antecedentes familiares

1. ¿Alguno de sus padres, hermanos o hijos ha tenido cáncer de mama?
- | | |
|----------|--|
| 1) Si | |
| 2) No | |
| 3) No sé | |
- Si responde no o no sé, pasar a la pregunta 4.
2. ¿Cuántos familiares han padecido cáncer de mama?
- | | |
|--------|------------|
| 1) 1 | 4) 3-4 |
| 2) 1-2 | 5) 4 o más |
| 3) 2-3 | |
3. ¿Qué parentesco tenía usted con los afectados?
- | | |
|---|--|
| 1) Padres, hijos y/o hermanos (1er Grado) | |
| 2) Abuelos, tíos y primos (2do Grado) | |
| 3) Bisabuelos (3er Grado) | |
4. ¿Alguno de sus familiares ha padecido síndrome de Lynch?
- | | |
|----------|--|
| 1) Si | |
| 2) No | |
| 3) No sé | |
- Si responde no o no sé, pasar a la pregunta 7.
5. ¿Cuántos familiares han padecido síndrome de Lynch?
- | | |
|--------|------------|
| 1) 1 | 4) 3-4 |
| 2) 1-2 | 5) 4 o más |
| 3) 2-3 | |
6. ¿Qué parentesco tenía usted con los afectados?
- | | |
|---|--|
| 1) Padres, hijos y/o hermanos (1er Grado) | |
| 2) Abuelos, tíos y primos (2do Grado) | |
| 3) Bisabuelos (3er Grado) | |
7. ¿Padece usted alguna de las siguientes enfermedades crónico degenerativas?
- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1) No padezco ninguna | 5) Cardiopatía isquémica |
| 2) Diabetes | 6) Infecciones: tipo _____ |
| 3) Hipertensión arterial | 7) Otro: _____ |
| 4) Artritis reumatoide | |
8. ¿Toma regularmente alguno de los siguientes medicamentos para alguna enfermedad a parte del cáncer?
- | | |
|---|--|
| 1) Analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios (Aspirina, Dipirona, Indometacina, Paracetamol, Ibuprofeno, Piroxicán, Diclofenaco, Bencidamina). | |
| 2) Diuréticos (Clortalidona, Furosemida, Hidroclorotiazida, Espironolactona). | |
| 3) Sedantes o hipnóticos (Diazepam, Meprobamato, Nitrazepam). | |
| 4) Antihipertensivos (Nifedipina, Captopril, Atenolol, Verapamilo, Metildopa, Diltiazem). | |



- 5) Hipoglicemiantes (Tolbutamida, Glibenclamida, Insulina).
- 6) Antianginosos (Nitrosorbide, Nitropental).
- 7) Broncodilatadores (Salbutamol spray, Aminofilina).
- 8) Cardiotónicos (Digoxina)
- 9) Antiagregante plaquetario (Dipiridamol).
- 10) No
- 11) Otros: _____

V.- Hábitos (Tabaquismo, Etilismo)

- 1. ¿Fuma actualmente?
 - 1) Si
 - 2) No (pase a pregunta 3)
 - 3) Dejó de fumar hace _____
- 2. Índice Pack Year: (# cigarrillos al día)(# años fumados)/ 20.
 - 1) Hasta 1
 - 2) 1-5
 - 3) 6-10
 - 4) Más de 10
- 3. ¿Consume o ha consumido bebidas alcohólicas?
 - 1) Si
 - 2) No (pase a siguiente sección)
- 4. ¿Por cuánto tiempo consumió o ha consumido bebidas alcohólicas?
 - 1) Menos de 1 año
 - 2) 1-5 años
 - 3) Más de 5 años
- 5. ¿Cuántas cervezas o vasos de vino consume o consumía en una semana?
 - 1) 1-3
 - 2) 3-6
 - 3) 6 o más

VII.- Neoplasia mamaria actual

- 1. Localización tumor:

Derecha	Izquierda									
<table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 40px; height: 40px; margin: auto;"> <tr><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td><td style="text-align: center;">4</td></tr> </table>	1	2	3	4	<table border="1" style="border-collapse: collapse; width: 40px; height: 40px; margin: auto;"> <tr><td style="text-align: center;">5</td><td style="text-align: center;">6</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">7</td><td style="text-align: center;">8</td></tr> </table>	5	6	7	8	
1	2									
3	4									
5	6									
7	8									

 - 1) Mama derecha cuadrante superior derecho.
 - 2) Mama derecha cuadrante superior izquierdo.
 - 3) Mama derecha cuadrante inferior derecho.
 - 4) Mama derecha cuadrante inferior izquierdo.
 - 5) Mama izquierda cuadrante superior derecho.
 - 6) Mama izquierda cuadrante superior izquierdo.
 - 7) Mama izquierda cuadrante inferior derecho.
 - 8) Mama izquierda cuadrante inferior izquierdo.
 - 9) Retroareolar.
 - 10) Otro: _____

- 2. Tamaño (cm):
 - 1) ≤ 2.0 cm
 - 2) 2-5 cm
 - 3) > 5 cm
 Clasificación TNM: _____

- 3. Tamaño:
 - 1) Tx
 - 2) T0
 - 3) Tis



- 4) T1
- 5) T2
- 6) T3
- 7) T4
- 4. Afección a nódulos linfáticos:
 - 1) Nx
 - 2) N0
 - 3) N1
 - 4) N2
 - 5) N3
- 5. Metástasis:
 - 1) Mx
 - 2) M0
 - 3) M1
- 6. Etapa:
 - 1) Estadio 0 (carcinoma in situ)
 - 2) Estadio I
 - 3) Estadio II
 - 4) Estadio IIIA
 - 5) Estadio IIIB
 - 6) Estadio IIIC
 - 7) Estadio IV
- 7. BI-RADS:
 - 1) BI-RADS 0: Evaluación adicional
 - 2) BI-RADS 1: Negativa
 - 3) BI-RADS 2: Benigna
 - 4) BI-RADS 3: Probablemente benigna
 - 5) BI-RADS 4: Anormalidad sospechosa
 - 6) BI-RADS 5: Altamente sugestiva de malignidad
 - 7) BI-RADS 6: Malignidad conocida
- 8. Grado Scarff-Bloom-Richardson:
 - a) GRADO 1 o bien diferenciado: 3 a 5 puntos
 - b) GRADO 2 o moderadamente diferenciados: 6 y 7 puntos
 - c) GRADO 3 o pobremente diferenciados: 8 y 9 puntos
- 9. Receptores de estrógeno (Escala de Allred)
 - a) 0=negativo
 - b) 1= Score Allred 0-5
 - c) 2= Score Allred 6-7
 - d) 3= Score Allred 8
- 10. Receptores de progesterona
 - a) 0=negativo
 - b) 1=positivo
 - c) 2: indeterminado
- 11. Receptor Her2 neu
 - a) 0=negativo
 - b) 1=1+negativo
 - c) 2=2+indeterminado
 - d) 3=3+ positivo
- 12. Fish
 - a) 0=negativo
 - b) 1=positivo
 - c) 2=no realizado

VIII. LABORATORIO:

- 1. Glucosa:
 - 1) < 70 mg/dL
 - 2) 70-100 mg/dL
 - 3) >100 mg/dL
- 2. Creatinina:
 - 1) <1,4 mg/dL
 - 2) >1,4 mg/dL
- 3. Urea:
 - 1) <10 mg/dL
 - 2) 10-40 mg/dL
 - 3) >40 mg/dL
- 4. Acido úrico:
 - 1) <2,3 mg/dL
 - 2) 2,3-6,6 mg/dL
- 5. Colesterol:
 - 1) <200 mg/dL
 - 2) 200-240 mg/dL
 - 3) >200 mg/dL
- 6. Bilirrubina total:
 - 1) 0-1 mg/dL
 - 2) >1 mg/dL
- 7. Bilirrubina directa:
 - 1) 0-0,4 mg/dL
 - 2) >0,04 mg/dL
- 8. Albumina:
 - 1) <3,1 g/dL
 - 2) 3,1-4,3 g/dL



- 3) >4,3 g/dL
9. TGO:
- 1) <9 U/L
- 2) 9-25 U/L
- 3) >25 U/L
10. TGP:
- 1) <7 U/L
- 2) 7-30 U/L
- 3) >30 U/L
11. Fosfatasa alcalina:
- 1) <30 U/L
- 2) 30-100 U/L
- 3) >100 U/L

IX: EVALUACIÓN DE TOXICIDADES

ADRIAMICINA

1.- Nausea

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1 Disminución del apetito sin alteración de hábitos alimenticios
- c) 2=GRADO2 Ingesta oral disminuida, sin pérdida significativa de peso, deshidratación o malnutrición
- d) 3=GRADO3 Ingesta calórica inadecuada, indicación de NPT, o hospitalización

2.- Vómito

- a) 0= NO
- b) 1=GRADO 1: 1-2 episodios separados por 5 min en 24 hrs
- c) 2=GRADO 2: 3-5 episodios separados en 5 minutos en 24 hrs
- d) 3=GRADO 3: >= 6 episodios separados por 5 minutos en 24 hrs
- e) 4=GRADO 4: Riesgo de complicaciones
- f) 5=GRADO 5: Muerte

3.- Neutropenia

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1: PMN < 1500/mm³
- c) 2=GRADO2: PMN <1500 - 1000/mm³
- d) 3=GRADO3: PMN <1000 - 500/mm³
- e) 4=GRADO4: PMN <500/mm³

4.- Amenorrea

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1: Interrupción intermitente de la menstruación de 1 a 3 meses
- c) 2=GRADO2: Interrupción intermitente de la menstruación de 4 a 6 meses
- d) 3=GRADO3: Interrupción intermitente de la menstruación por mas de 6 meses

5.- Fotosensibilidad

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1 Sintomatología leve
- c) 2=GRADO2: Sintomatología moderada
- d) 3=GRADO3: Sintomatología grave

6.- Insuficiencia cardíaca

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO 1: asintomático
- c) 2= GRADO2: Sintomático con ejercicio moderado o severo
- d) 3=GRADO3: Sintomático con ejercicio leve
- e) 4=GRADO4: Sintomático al reposo



7.- Trastornos electrocardiograficos

- a) 0=NO
- b) 1=SI
- c) TIPO _____

PACLITAXEL

1.- Neutropenia

- a) 0=NO
- b) 1= PMN < 1500/mm³
- c) 2=GRADO2 PMN <1500 - 1000/mm³
- d) 3=GRADO3: PMN <1000 - 500/mm³
- e) 4=GRADO4: PMN <500/mm³

2.- Anemia

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1: Hb < 10.0 g/dL
- c) 2=GRADO2: Hgb <10.0 - 8.0 g/Dl
- d) 3=GRADO3: Hgb <8.0 - 6.5 g/Dl
- e) 4=GRADO4: Hgb < 6.5

3.- Neuropatía sensitiva periférica

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1: Síntomas leves
- c) 2=GRADO2: Síntomas moderados
- d) 3=GRADO3: Síntomas graves
- e) 4=GRADO 4: Muerte

4.- Fotosensibilidad.

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1 Sintomatología leve
- c) 2=GRADO2: Sintomatología moderada
- d) 3=GRADO3: Sintomatología grave

5.- Trastornos electrocardiográficos.

- a) 0=NO
- b) 1=SI
- c) TIPO _____

CICLOFOSFAMIDA

1.-Neutropenia

- a) 0=NO
- b) 1= PMN < 1500/mm³
- c) 2=GRADO2 PMN <1500 - 1000/mm³
- d) 3=GRADO3: PMN <1000 - 500/mm³
- e) 4=GRADO4: PMN <500/mm³

2.- Anemia

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1: Hb < 10.0 g/dL
- c) 2=GRADO2: Hgb <10.0 - 8.0 g/Dl
- d) 3=GRADO3: Hgb <8.0 - 6.5 g/Dl
- e) 4=GRADO4: Hgb < 6.5

3.-Nausea

- a) 0=NO
- b) 1=GRADO1 Disminución del apetito sin alteración de hábitos alimenticios
- c) 2=GRADO2 Ingesta oral disminuida, sin pérdida significativa de peso, deshidratación o malnutrición
- d) 3=GRADO3 Ingesta calórica inadecuada, indicación de NPT, o hospitalización

4.- Vomito

- a) 0= NO
- b) 1= GRADO1 1-2 episodios separados por 5 min en 24 hrs
- c) 2=GRADO2 3-5episodios separados en 5 minutos en 24 hrs
- d) 3=GRADO3 >= 6 episodios separados por 5 minutos en 24 hrs
- e) 4=GRADO 4 Riesgo de complicaciones
- f) 5=GRADO5 Muerte