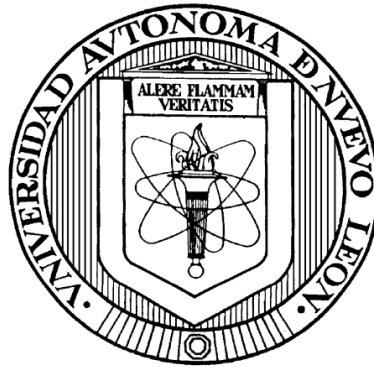


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“RASTREO DE SNPs EN GENES ASOCIADOS A CÁNCER DE MAMA EN PACIENTES DEL NORESTE DE MÉXICO”**

**Por:**

**IBQ Indira Nadezda Muñoz Montelongo**

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación Terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Monterrey, Nuevo León**

**Julio del 2012**

Agradecimientos:

- Al Dr. Hugo Barrera por su apoyo, paciencia, enseñanzas y por ayudarme a conocer de cerca lo que es una persona comprometida con la generación de conocimiento.
- A la Lulú Garza por todas sus enseñanzas, orientación asesoría y sobre todo su amistad. Y por demostrarme que una mujer es capaz de combinar su trabajo con su familia sin descuidar ambas cosas.
- Al Dr. Juan Francisco Gonzalez por ayudarnos con el acceso a las pacientes y por la asesoría de este trabajo.
- A Normita, por ser una persona que brinda su apoyo y ayuda a todos, por estar siempre cuando te necesitamos, gracias por todo.
- A la Dra. Herminia por su paciencia y apoyo.
- A mis compañeros de generación por brindarme su amistad y compañía.
- A todos los miembros del departamento de Bioquímica por su ayuda de alguna u otra manera en la realización de este trabajo.
- A las mujeres que participaron en nuestro estudio sin ustedes nada hubiera sido posible.

A mi familia por todo, por ser mi apoyo y darme la fuerza necesaria para seguir,


- A ti Flaco por apoyarme y admitirme en tu casa durante mi estancia en Mty., por cuidarme, por todos tus consejos y por preocuparte siempre por mi.
- A mi chaparro por todo tu apoyo y entusiasmo aun en la distancia, por echarme siempre porras, por inspirarme a ser siempre mejor.
- A ti chiquilla por ayudarme tanto, por estar siempre para mi, por ser ese motor alegre que muestra el lado feliz de las cosas.
- A mis papas, por ser las dos maravillosas personas que son, sin ustedes no seria lo que soy, por mostrarme ambos lados de las cosas afrontando las consecuencias de nuestras acciones, por guiarme en este camino que es la vida.
- A ti Fer, por tu amor, tu comprensión, tu guía, tu impulso, por ser el motor de mi vida, por rodearme de cariño y hacerme inmensamente feliz.

Son lo más importante de mi vida, los amo.

A Dios, por estar siempre a mi lado, por levantarme y llevarme siempre de la mano, por ser mi pastor y mi escudo.

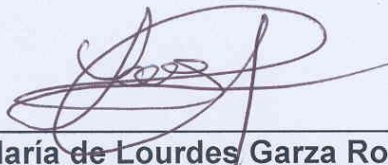
Rastreo de SNPs en genes asociados a cáncer de mama en pacientes del noreste de México.

Aprobación de la Tesis:



---

**Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña**  
Director de Tesis



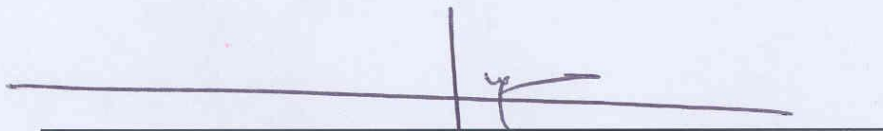
---

**Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez**  
Co-Directora de Tesis



---

**Dr. C. Juan Francisco González Guerrero**  
Co-Director de Tesis



---

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

<b>INDICE</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>11</b>

## **CAPITULO I: INTRODUCCION**

1.1 Cáncer	12
1.2 Cáncer de mama	13
1.2.1 Factores de riesgo	13
1.2.2 Factores protectores	16
1.2.3 Síntomas y signos de alarma	16
1.2.4 Diagnóstico	18
1.2.4.1 Importancia del diagnóstico temprano	18
1.2.4.2 Métodos de diagnóstico	19
1.2.4.2.1 Autoexamen mamario	19
1.2.4.2.2 Examen clínico	20
1.2.4.2.3 Mamografía	20
1.2.4.2.4 Otras pruebas de imágenes	21
1.2.4.2.5 Biopsia	21
1.2.5 Estadíaje	23
1.2.5.1 Diseminación del cáncer	24
1.2.5.2 Estadios del cáncer	24
1.2.6 Tratamiento	28
1.2.6.1 Cirugía	28
1.2.6.2 Biopsia de ganglio linfático centinela seguida de cirugía	30
1.2.6.3 Radioterapia	31
1.2.6.4 Quimioterapia	31
1.2.6.5 Terapia con hormonas	32
1.2.6.6 Terapia dirigida	32
1.2.6.7 Nuevas alternativas de tratamiento	33
1.2.6.7.1 Quimioterapia de dosis altas con trasplante de células madre	34
1.3 Epidemia de cáncer	34
1.3.1 El cáncer en el mundo	35
1.3.2 Impacto del cáncer de mama	35
1.3.3 El cáncer de México	37
1.3.4 El cáncer de mama en nuestro país	37

1.4 El cáncer y la herencia	41
1.4.1 Genética del cáncer de mama	42
1.4.1.1 Genes BRCA 1 y 2	43
1.4.1.2 Genes recientemente asociados a CM.	45
1.5 Funciones de los genes asociados a cáncer de mama	46
1.5.1 TOX3	46
1.5.1.1 TOX3 y cáncer de mama	47
1.5.2 MAP3K1	47
1.5.2.1 MAP3K1 y cáncer de mama	48
1.5.3 MMP7	48
1.5.3.1 MMP7 y cáncer de mama	49
1.5.4 ESR1	50
1.5.4.1 ESR1 y cáncer de mama	51
Justificación	52

## **CAPITULO II: OBJETIVOS**

Objetivo general	53
Objetivos particulares	53

## **CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS**

3.1 Diseño del estudio	54
3.2 Lugar de realización del estudio	54
3.3 Sujetos de estudio	54
3.4 Criterios de selección de la muestra	55
3.4.1 Criterios de inclusión	55
3.4.2 Criterios de exclusión	55
3.5 Materiales y reactivos	56
3.5.1 Materiales	56
3.5.2 Reactivos	56
3.5.3 Equipos	57
3.6 Estrategia general	59
3.7 Calculo de tamaño de muestra	60

3.8 Extracción de ADN	60
3.8.1 Protocolo para la extracción de ADN de alta calidad con TSNT a partir 3 ml de sangre.	60
3.9 Generación del Biobanco-archivo electrónico	62
3.10 Detección de genes de predicción del riesgo en CM	62
3.10.1 Diseño de primers	62
3.10.2 Selección de enzimas de restricción	64
3.10.3 Amplificación por PCR de los polimorfismos	65
3.10.4 Digestión con enzimas de restricción	67
3.10.5 Genotipificación por PCR tiempo real	70

#### **CAPITULO IV: RESULTADOS**

4.1 Prueba piloto para cálculo de tamaño de muestra	72
4.2 Resultados epidemiológicos	73
4.3 Comportamiento de la enfermedad	75
4.4 Resultados de la genotipificación	77

#### **CAPITULO V: DISCUSIÓN**

Discusión	79
-----------	----

#### **CAPITULO VI: CONCLUSIONES**

Conclusiones	81
--------------	----

<b>REFERENCIAS</b>	83
--------------------	----

#### **ANEXOS**

ANEXO 1. Carta de aprobación del comité de ética.	86
ANEXO 2. Hoja de recolección de datos.	87
ANEXO 3. Consentimiento informado.	90

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Síntomas de cáncer de mama	17
Cuadro 2. Comparación de incidencia y mortalidad entre países desarrollados y subdesarrollados	35
Cuadro 3. Mutaciones reportadas para los genes BRCA 1 y 2	44
Cuadro 4. Iniciadores oligonucleotídicos para amplificar SNPs	64
Cuadro 5. Enzimas de restricción para detección de SNPs de riesgo en CM	64
Cuadro 6. Frecuencia alélica (%) prueba piloto	72
Cuadro 7. Procedencia de las mujeres que participaron en el estudio	73
Cuadro 8. Resultados de los receptores hormonales de las pacientes con CM	76
Cuadro 9. Frecuencias alélicas encontradas	77
Cuadro 10. Frecuencias genotípicas encontradas	78



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Riesgo incrementado con la edad de desarrollar cáncer de mama	14
Figura 2. Riesgo de cáncer de mama con antecedentes familiares	15
Figura 3. Probabilidad de supervivencia con respecto al estadio del cáncer de mama al momento del diagnóstico	18
Figura 4. Estadio de diagnóstico del cáncer de mama	18
Figura 5. Carcinoma ductal in situ	25
Figura 6. Estadio I	25
Figura 7. Cirugía conservadora de seno	28
Figura 8. Mastectomía simple	29
Figura 9. Mastectomía radical modificada	29
Figura 10. Biopsia de ganglio linfático centinela	31
Figura 11. Distribución mundial de los nuevos casos de cáncer de mama	35
Figura 12. Distribución de la incidencia de cáncer de mama a nivel mundial	36
Figura 13. Tasas de incidencia y mortalidad a nivel mundial estratificadas por edad	36
Figura 14. Probabilidad de padecer o morir por cáncer de mama en México	38
Figura 15. Tasa de mortalidad por cáncer de mama en mujeres mexicanas mayores de 25 años (por 100 000)	39
Figura 16. Comparación entre los dos tipos de cáncer más comunes en mujeres en México	39
Figura 17. Distribución de la mortalidad por los dos tipos de cáncer más comunes en mujeres en México	40
Figura 18. Predicciones de incidencia y mortalidad por cáncer de mama en México del 2008 al 2030	41
Figura 19. Estrategia General	59
Figura 20. Gradientes de temperatura para estandarización de PCR	64
Figura 21. Estandarización de la amplificación del SNP rs1943779	65
Figura 22. Prueba de la cantidad de ADN a usar en la PCR	65
Figura 23. Digestiones del SNP rs2228480	68

Figura 24. Digestiones del SNP rs3798577	68
Figura 25. Digestiones del SNP rs889312	69
Figura 26. Digestiones del SNP rs1943779	69
Figura 27. Digestiones del SNP rs3803662	70
Figura 28. Genotipificación por PCR-tiempo real	71
Figura 29. SNPs de riesgo para CM prueba piloto en población general	72
Figura 30. Frecuencia de problemas de peso entre mujeres del estudio	74
Figura 31. Comparación de variables epidemiológicas entre pacientes y controles	75
Figura 32. Estadio clínico de las pacientes	76

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACO. Anticonceptivos orales.

ADN. Acido desoxirribonucleico.

BSA. Albumina serica bovina.

CLIS. Carcinoma lobulillar in situ.

CDIS. Carcinoma ductal in situ.

CM. Cáncer de mama.

DES. Dietilestilbestrol.

dNTPs. Desoxiribonucleotidos.

IMC. Índice de masa corporal.

MAP3K1. Proteína activada por mitógeno quinasa quinasa quinasa 1.

mM. Concentracion milimolar.

MMP7. Metalopeptidasa de matriz 7.

MgCl<sub>2</sub>. Cloruro de magnesio.

PARP. Poli ADP-Ribosa polimerasa.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

PR. Receptor de progesterona.

SNP. Polimorfismos de un solo nucleótido.

RE. Receptor de estrógenos.

TC. Tomografía computarizada.

TEP. Tomografía de emisión de positrones.

TOX3. Proteína de la familia de alta movilidad 3.

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Cáncer

Las células del cuerpo se están regenerando de manera continua, lo cual llevan a cabo por un proceso de recambio en el que se producen células nuevas a la misma velocidad que otras mueren. Este proceso se encuentra altamente regulado en el organismo, pero puede suceder que la correcta regulación del ciclo celular se vea alterada a causa de que el material genético (ADN) de una célula sufra daños permanentes (mutaciones), lo cual se refleja en trastornos de la proliferación normal de las células. Cuando esto sucede, las células no mueren cuando deberían y células nuevas se forman a un ritmo acelerado no requerido por el cuerpo. Las células excedentes forman una masa de tejido, que es lo que se conoce como tumor.

Es importante aclarar que no todos los tumores son cancerosos y que existen dos clases: benignos y malignos, mismos que se definen como sigue:

- Los tumores benignos no son cancerosos. Pueden extirparse y, en la mayoría de los casos, no vuelven a aparecer. Las células de este tipo de tumores no se diseminan a otras partes del cuerpo.
- Los tumores malignos son cancerosos. Las células de estos tumores tienen la capacidad de invadir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo. Cuando el cáncer se disemina de su origen inicial a otra parte del cuerpo, se dice que ha ocurrido metástasis.

Con lo anterior, se puede definir al cáncer como un crecimiento tisular producido por la proliferación descontrolada de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos.

El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, por lo que no puede verse como una enfermedad única, sino como un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y estirpe celular de origen. Existen cientos de tipos distintos, siendo tres los principales subtipos:

- Los sarcomas que proceden del tejido conectivo, como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- Los carcinomas procedentes de tejidos epiteliales, como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, así como los tejidos glandulares

de la mama y próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas y los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas.

- Los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas, entre los que se encuentran las leucemias y los linfomas. Estos producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

## 1.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama (CM) es aquel que comienza en el tejido mamario, reconociéndose:

- El carcinoma ductal, que comienza en los conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón. La mayoría de los cánceres de mama pertenecen a este grupo.
- El carcinoma lobulillar, llamado así por originarse en los lobulillos (glándulas productoras de leche).

En raras ocasiones, el CM comienza en otras áreas de la mama.

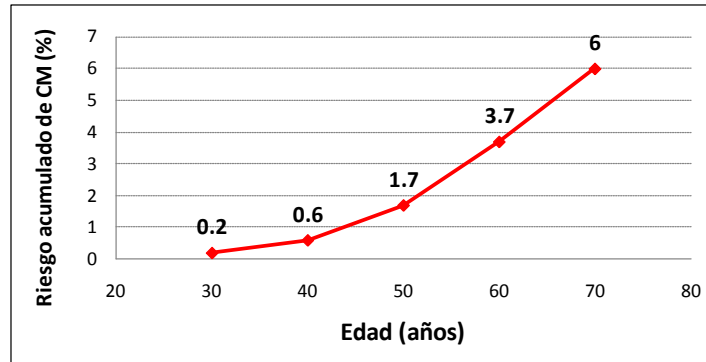
El CM puede ser invasivo o no, significando lo primero que se ha propagado desde el conducto galactóforo o lobulillo a otros tejidos en la mama; mientras que lo segundo, también denominado *in situ*, significando que aún no ha invadido otro tejido mamario.

### 1.2.1 Factores de Riesgo:

Los siguientes son factores que se han asociado a una mayor propensión a desarrollar CM:

- *Edad*: el riesgo de desarrollarlo se incrementa a medida que las personas envejecen [Figura 1]. La mayoría de los casos de CM avanzados se encuentra en mujeres de más de 50 años. En México, la mujer lo padece en promedio una década antes que las europeas o norteamericanas.
- *Género*: las mujeres tienen casi 100 veces más probabilidad de desarrollarlo que los hombres.

- *Consumo de alcohol*: la ingesta diaria de más de 2 vasos de alcohol se reflejan en un riesgo incrementado de padecerlo.

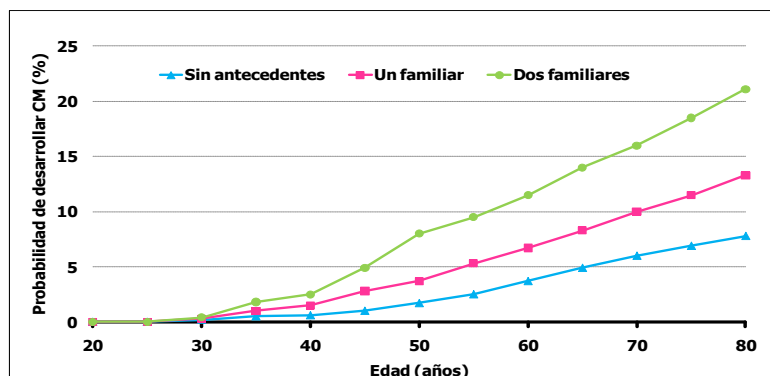


**Figura 1. Riesgo incrementado con la edad de desarrollar CM.** Se muestra un incremento de desarrollarlo conforme avanza la edad, siendo 30 veces mayor para una mujer de 70 con respecto a una de 30 años.

- *Obesidad*: Se ha encontrado que la obesidad es otro factor de riesgo en mujeres postmenopáusicas. El incremento del riesgo en estas mujeres podría deberse a los altos niveles de estrógeno circulante, secundario al incremento de la conversión de andrógenos en estrógeno por el tejido adiposo y una alta proporción de estrógeno biodisponible debido a los bajos niveles de la globulina transportadora de hormonas sexuales producida por la obesidad [1-2]. Así mismo, está demostrado que el exceso de tejido adiposo favorece la aparición de metástasis y la recurrencia del CM, asociándolo con una mayor mortalidad. Así, las mujeres con sobrepeso u obesas con esta neoplasia presentan 2.5 veces más probabilidades de morir de la enfermedad dentro de los cinco años del diagnóstico, en comparación con las mujeres delgadas [3]. Contrariamente, se cree que las mujeres obesas premenopáusicas podrían tener un mayor grado de anovulación, resultando en menores niveles de progesterona y estradiol, conduciendo a tasas bajas de división de células mamarias y consecuentemente a menor riesgo de padecer la enfermedad.
- *Ciclo menstrual (menarquía temprana y menopausia tardía)*: las mujeres que inician tempranamente sus períodos menstruales (antes de los 12 años) tienen un riesgo aumentado de 1.8 veces de padecerlo, como se ha documentado en mujeres blancas en Estados Unidos. Igualmente, cuando las mujeres llegan a la menopausia de manera tardía (después de los 55 años), el riesgo se incrementa 2.5 veces.
- *Maternidad*: las mujeres que nunca tuvieron hijos o que los tuvieron después de los 30 años, tienen un mayor riesgo de desarrollarlo.
- *Consumo de DES*: las mujeres que tomaron dietilestilbestrol (DES) para evitar abortos pueden tener un mayor riesgo de sufrirlo después de los 40 años. Este

fármaco se le suministraba comúnmente a las mujeres en las décadas de 1940 y 1960.

- *Hormonoterapia*: el haber consumido terapia hormonal con estrógenos suministrados por periodos prolongados (mayores de 5 años), incrementa en un 2% anual el riesgo de las mujeres postmenopáusicas. Este riesgo permanece por cinco años posterior a la suspensión de la terapia hormonal y después de ese tiempo el riesgo se iguala al de mujeres que nunca usaron terapia de remplazo hormonal. El uso combinado de estrógenos y progestágenos, continuos o secuenciales, incrementa aún más el riesgo (51% si se administraron por más de 5 años).[4]
- *Radiación*: sí se recibió radioterapia durante la infancia, adolescencia o juventud, para tratar un cáncer del área del tórax, se tiene un riesgo mucho más alto de padecerlo. Cuanto más joven haya sido al iniciar la radiación y más alta la dosis, mayor será el riesgo; especialmente si la radioterapia se administró durante el desarrollo de las mamas.
- *Antecedentes personales de CM*: la mujer que ha tenido cáncer de ovario o endometrio, incrementa su riesgo de padecerlo. Así mismo, las mujeres que lo padecieron en un seno tienen un riesgo mayor de desarrollar esta enfermedad en su otro seno. De igual manera, tener ciertos tipos de células anormales en el seno (hiperplasia atípica, carcinoma lobulillar in situ [CLIS], o carcinoma ductal in situ [CDIS]), aumenta el riesgo de padecer la forma invasora.
- *Antecedentes familiares*: el riesgo de padecerlo se ve aumentado si algún familiar de primer grado lo ha padecido o ha padecido cáncer de ovario o colon. Así mismo, el riesgo se incrementa con el número de familiares afectados (Figura 2).



**Figura 2. Riesgo de CM con antecedentes familiares.** A partir de los 35 años de edad, el riesgo de padecerlo comienza a incrementarse en todas las mujeres. Sin embargo, se observa que éste se duplica en caso de tener un familiar de primer grado que lo haya padecido y se triplica si más de un familiar lo ha padecido.

- *Genética*: existen variantes génicas que incrementan el riesgo de una persona a padecer este tipo de cáncer, encontrándose las más conocidas en los genes BRCA 1 y BRCA 2. Sin embargo existen otros genes como ESR1, TOX3, MMP7, MAP3K1 y FGFR2, los cuales han sido menos estudiados y sobre los cuales se enfoca el presente trabajo.
- *Etnia*: En Estados Unidos, se diagnostica con más frecuencia en mujeres blancas que en mujeres afroamericanas, hispanas, asiáticas, indígenas americanas y nativas de Alaska.
- *Densidad mamográfica*: En una mamografía, los senos se ven con zonas de tejido denso y de tejido adiposo no denso (tejido graso). Las mujeres cuyas mamografías muestran zonas más grandes de tejido denso presentan un riesgo mayor.
- *Inactividad física*: el tener una vida sedentaria incrementa el riesgo de padecerlo.

Que una mujer tenga un factor de riesgo no significa que vaya a desarrollar CM, pero sí contribuye a incrementar la posibilidad de la enfermedad con respecto a una mujer que no tiene dichos factores. El conocer los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, permite modificar hábitos y poder prevenir en la medida de lo posible la aparición del CM.

### 1.2.2 Factores protectores

De entre los factores que se han asociado negativamente al CM, están:

- *La multiparidad*: Quedar embarazada más de una vez o a temprana edad reduce el riesgo de padecer este tipo de cáncer.
- *La lactancia*: amamantar se encuentra altamente asociado como factor protector.
- *La menopausia artificial por hipectomía*: los cambios hormonales generados por la extracción de la matriz antes de los 40 años, ha demostrado disminuir notablemente el riesgo.

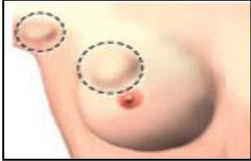




### 1.2.3 Síntomas y signos de alarma

El CM en etapas tempranas no presenta síntoma. Por esta razón es importante la realización de exámenes regulares en los senos. A medida que el cáncer se desarrolla, los síntomas pueden comenzar a aparecer (Cuadro 1).



El CM avanzado puede presentar los siguientes síntomas: dolor óseo, dolor o molestia en los senos, úlceras cutáneas, hinchazón de un brazo (próximo al seno con cáncer) y pérdida de peso.

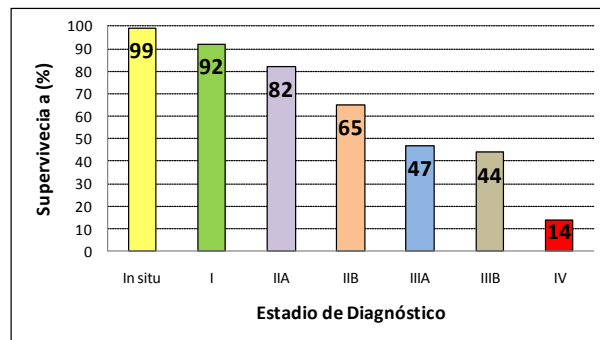
Cuadro 1: Síntomas del cáncer de mama.

Síntoma	Ejemplo
Presencia de tumores en las mamas o en las axilas, duros con bordes irregulares y que generalmente no duelen.	
Cambio en el tamaño, forma o textura de las mamas o el pezón.	
Cambio en el tamaño, forma o textura de las mamas o el pezón, enrojecimiento, agujeros o fruncimiento que luce como cáscara de naranja.	
Cambio de color en la mama, aureola o pezón.	
Secreción de líquido proveniente del pezón, que puede ser sanguinolento, de claro a amarillento o verdoso, y lucir como pus.	

## 1.2.4 Diagnóstico:

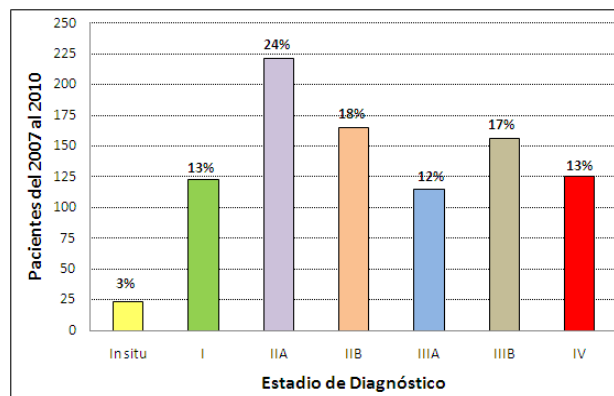
### 1.2.4.1 Importancia del diagnóstico temprano

En la mayoría de las ocasiones la enfermedad es detectada por la propia paciente (~70%). Si la enfermedad se detecta oportunamente puede ser curada hasta en 90% de los casos (Figura 3). El CM no puede evitarse, pero es curable sí la enfermedad es detectada en una etapa clínica temprana (tumor menor de 2 cm).



**Figura 3. Probabilidad de supervivencia con respecto al estadio del CM al momento del diagnóstico.** Se observa que las mujeres a las que se les detecta esta neoplasia en estadios avanzados, tienen una supervivencia disminuida en hasta un 85% con respecto a las mujeres diagnosticadas en etapas tempranas de la enfermedad.

A pesar de esto, en México, el CM es detectado en etapas avanzadas de la enfermedad (Figura 4); como se mencionó anteriormente, la mayoría de los casos es detectado por la propia paciente, pero para que esto sea posible es necesario que el tumor tenga un tamaño considerable (mayor de 2 cm), lo que refleja etapas avanzadas de la enfermedad.



**Figura 4. Estadio de diagnóstico del CM.** Distribución de los estadios al momento del diagnóstico, en el periodo del 2007 al 2010 en el Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Se observa que la mayoría de los diagnósticos se realizan en etapas avanzadas, disminuyendo la probabilidad de supervivencia de las pacientes.

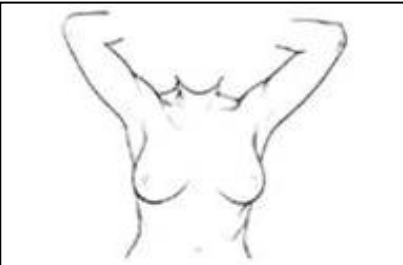
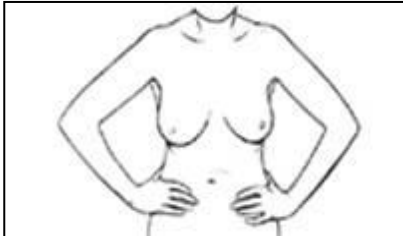
### 1.2.4.2 Métodos de diagnóstico

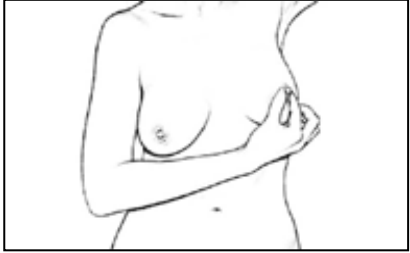
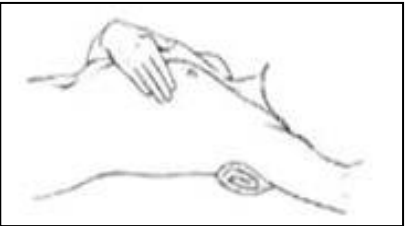
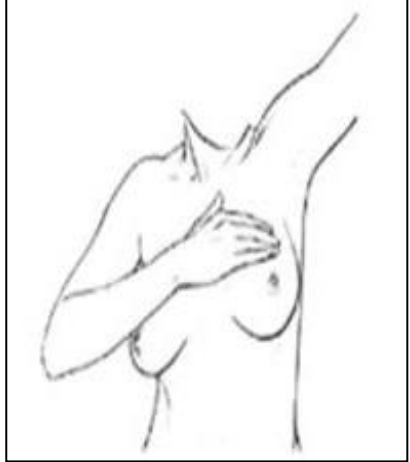
#### 1.2.4.2.1 Autoexamen mamario

Es un procedimiento realizado por la mujer para examinarse física y visualmente en busca de detectar cualquier cambio en sus senos que delate a tiempo la aparición del CM. Por lo tanto, el autoexamen no se debe utilizar para reemplazar, sino para complementar el examen clínico (realizado por un profesional de la salud) y la mamografía. Las mujeres deberían hacerse este autoexamen a partir de los 20 años y durante toda su vida; aún si están embarazadas o después de la menopausia. La autoevaluación de seno debe hacerse cada mes. Las mujeres deben conocer perfectamente el aspecto y tacto normal de sus senos para notar cualquier cambio.

Si la mujer todavía menstrúa, el mejor momento para hacer el examen es varios días, o alrededor de una semana, después de que el periodo termine. Estos son días en que es menos probable que sus senos estén doloridos o inflamados. Si ya no está menstruando, debe elegir un día fijo para realizarse el autoexamen cada mes. Si está tomando hormonas, debe hablar con su médico para saber cuándo debe hacerse.

Cuadro 2 ¿Cómo hacerse un autoexamen de senos?

Pasos a seguir	Ejemplo
<p>La mujer deberá pararse frente a un espejo que sea lo suficientemente grande como para ver sus senos con claridad. Deberá revisarse cada seno para detectar cualquier anomalía, como arrugas, hoyuelos o descamación en la piel, así como secreción de los pezones. Prestando mucha atención al espejo, deberá juntar las manos detrás de la cabeza y empújarlas hacia delante.</p>	
<p>A continuación, deberá presionar las manos firmemente sobre las caderas e inclinarse ligeramente hacia el espejo a medida que saca los hombros y los codos hacia delante.</p>	

<p>Deberá presionar ligeramente cada pezón para determinar si hay secreción.</p>	
<p>Aun mejor es el examinarse los senos acostada, porque de esta manera el tejido mamario se extiende uniformemente sobre el pecho. Por lo tanto, se recomienda recostarse de espaldas, con un brazo sobre la cabeza y una almohada o toalla doblada debajo del hombro. Esta posición alisa el seno y facilita el examen.</p>	
<p>Deberá utilizar las yemas de los dedos de la otra mano para revisar el seno y el área circundante con firmeza, cuidado y detenimiento. Procederá a buscar cualquier bulto o masa extraña debajo de la piel, palpando el tejido presionando los dedos en áreas pequeñas y superpuestas que sean de tamaño similar al de una moneda de diez centavos. Para asegurarse de cubrir todo el seno, deberá tomarse su tiempo y seguir un patrón definido: líneas, círculos o cuñas. Deberá revisarse la zona sobre el seno hasta la clavícula y seguir hasta el hombro.</p>	

Tomado de <http://www.cancer.gov/espanol/>

Se recomienda usar tres niveles distintos de presión para examinar los senos:

Presión ligera: para examinar el tejido más cercano a la piel

Presión media: para palpar un poco más profundamente

Presión firme: para palpar el tejido más profundo cercano a las paredes del tórax.

Cambios a tener en cuenta: si una mujer encuentra cualquier cambio en su(s) senos(s) que le cause preocupación, es importante que acuda a su médico.

#### **1.2.4.2.2 Examen clínico**

El examen clínico debe ser realizado por el médico para revisar los senos de las pacientes. Para realizar la exploración les pide a estas que levanten sus brazos sobre sus cabezas, que los dejen colgar a los lados o que aprieten sus manos contra las caderas.

El médico observa la diferencia de tamaño o forma que haya entre los dos senos. Revisa la piel de cada uno buscando alguna erupción, hoyuelos u otros signos de irregularidad y aprieta los pezones para ver si hay algún fluido presente.

El médico usa las yemas de los dedos para sentir bultos en todo el seno, en la axila y en la zona de la clavícula. En general, un bulto necesita ser del tamaño de un guisante o chícharo para poder sentirse. El examen se realiza primero en un lado y luego en el otro. Pueden revisarse los ganglios linfáticos cerca del seno para ver si están hinchados.

Si el médico localiza un bulto, lo palpará para sentir el tamaño, forma y textura. También lo examinará para ver si se mueve con facilidad. Los tumores benignos con frecuencia se sienten diferentes de los cancerosos. Los bultos que son blandos, suaves y que se pueden mover son generalmente benignos. Un bulto duro, de forma irregular que parece estar fijo al seno es más probable que sea canceroso, pero se necesita realizar exámenes especiales para diagnosticar la enfermedad. [5]

#### **1.2.2.4.3 Mamografía**

Una mamografía es una imagen de rayos X de los tejidos dentro del seno. Por lo general, las mamografías pueden detectar un bulto en el seno antes de que éste pueda palparse. También pueden mostrar una agrupación de partículas pequeñas de calcio llamadas microcalcificaciones.

Los bultos o las partículas pueden deberse al cáncer, a células precancerosas o a otras causas. Es necesario realizar exámenes específicos para saber si hay células anormales.

Antes de que presenten síntomas, las mujeres deben realizarse mamografías de detección en forma periódica para detectar temprano el CM:

- Las mujeres de 40 años y más deben hacerse una mamografía cada uno o dos años.
- Las mujeres menores de 40 años y que tienen factores de riesgo de padecerlo, deben preguntar a sus médicos si necesitan hacerse mamografías y con qué frecuencia.

Si la mamografía muestra una zona anormal en su seno, el médico puede ordenar imágenes más claras y detalladas de dicha zona. Las mamografías de diagnóstico pueden enfocarse en una zona específica del seno y pueden incluir técnicas especiales y más vistas que las mamografías de detección [6-7].

#### **1.2.2.4.4 Otras pruebas de imágenes**

Si se detecta una zona irregular durante un examen clínico de mama o una mamografía, el médico puede solicitar otras pruebas de imágenes. A saber:

- *Ecografía*: Una mujer con un bulto u otro cambio en el seno puede realizarse una ecografía. Un dispositivo de ultrasonido emite ondas sonoras que no pueden ser escuchadas por el oído humano. Estas ondas rebotan en los tejidos del seno. Una computadora usa los ecos para producir una imagen. La imagen puede mostrar si un bulto es sólido o está lleno de líquido (lo que se conoce como un quiste), o una mezcla de ambos. Los quistes normalmente no son cancerosos. Pero un bulto sólido puede ser canceroso.
- *Resonancia magnética (RM)*: usa un magneto potente conectado a una computadora. Produce imágenes detalladas de tejido del seno. Estas imágenes pueden mostrar la diferencia entre el tejido normal y el tejido enfermo.

#### **1.2.2.4.5 Biopsia**

Una biopsia es la extracción de tejido para buscar la presencia de células cancerosas. La biopsia es la única manera de saber con certeza si hay cáncer presente. Normalmente los médicos ordenan una biopsia si se encuentra una zona anormal.

Una zona anormal puede palparse durante un examen clínico del seno, pero puede escapar a una mamografía. O, una zona normal puede verse en una mamografía, pero puede pasar desapercibida durante un examen clínico de mama. En este caso, los médicos pueden usar procedimientos con imágenes (tales como mamografías, ecografías o resonancia magnética) para que les ayude a ver la zona y extirpar el tejido. Para apoyar el diagnóstico, el médico extraerá líquido o tejido de seno en una de las siguientes maneras:

- *Biopsia de aspiración con aguja fina*: el médico usa una aguja fina para extraer células o líquido de un bulto en el seno.

- *Biopsia por punción*: el médico usa una aguja gruesa para extraer una muestra de tejido del seno.
- *Biopsia de piel*: si hay cambios en la piel en el seno, el médico puede tomar una muestra pequeña de piel.
- *Biopsia quirúrgica*: un cirujano extrae una muestra de tejido.
  - La biopsia por incisión toma una parte de un bulto o de una zona anormal.
  - La biopsia por escisión extrae todo el bulto o la zona anormal.

Posteriormente a la biopsia, un patólogo examinará el tejido o el líquido que se haya extraído del seno, para ver si hay células cancerosas. Si se encuentran células cancerosas, el patólogo puede decir el tipo de cáncer del que se trata.

### 1.2.5 Estadiaje

Se denomina estadiaje al proceso que se usa para determinar si el cáncer se diseminó dentro de la mama o hasta otras partes del cuerpo. La información que se obtiene en este proceso determina el estadio de la enfermedad. Es importante conocer el estadio de la enfermedad para establecer un esquema de tratamiento y un probable pronóstico. Para el proceso de estadificación, se pueden utilizar las pruebas y procedimientos siguientes:

- Radiografía del tórax y radiografía de los órganos y huesos del interior del tórax.
- Exploración por TC (exploración por tomografía axial computarizada): procedimiento mediante el cual se toma una serie de imágenes detalladas del interior del cuerpo, desde ángulos diferentes. Las imágenes son creadas por una computadora conectada a una máquina de rayos X. Se inyecta un tinte en una vena o se ingiere, a fin de que los órganos o los tejidos se destaquen de forma más clara.
- Exploración ósea: procedimiento que se utiliza para verificar si hay células en los huesos que se multiplican rápidamente, como las células cancerosas. Se inyecta una cantidad muy pequeña de material radiactivo en una vena y este recorre todo el torrente sanguíneo. Si el material radiactivo se acumula en los huesos, se puede detectar con un gammógrafo.
- Exploración con TEP (exploración con tomografía por emisión de positrones): procedimiento para encontrar células de tumores malignos en el cuerpo. Se inyecta

en una vena una cantidad pequeña de glucosa (azúcar) radiactiva. El explorador por TEP rota alrededor del cuerpo y toma una imagen de los lugares del cuerpo que absorben la glucosa. Las células de tumores malignos tienen aspecto más brillante en la imagen porque son más activas y absorben más glucosa que las células normales.[7]

### 1.2.5.1 Diseminación del cáncer

El cáncer se disemina en el cuerpo de las siguientes tres maneras:

- A través del tejido. El cáncer invade el tejido normal que lo rodea.
- A través del sistema linfático. El cáncer invade el sistema linfático y circula por los vasos linfáticos hacia otros lugares del cuerpo.
- A través de la sangre. El cáncer invade las venas y los capilares, circulando por la sangre hasta otros lugares del cuerpo.

Cuando las células cancerosas se separan del tumor primario (original) y circulan a través de la linfa o la sangre hasta otros lugares del cuerpo, se puede formar otro tumor (secundario). Este proceso se llama metástasis. El tumor secundario (metastásico) es del mismo tipo de cáncer que el del tumor primario. Por ejemplo, si el CM se disemina hasta los huesos, las células cancerosas de los huesos son en realidad células de CM. La enfermedad es cáncer metastásico de mama, no cáncer de hueso.

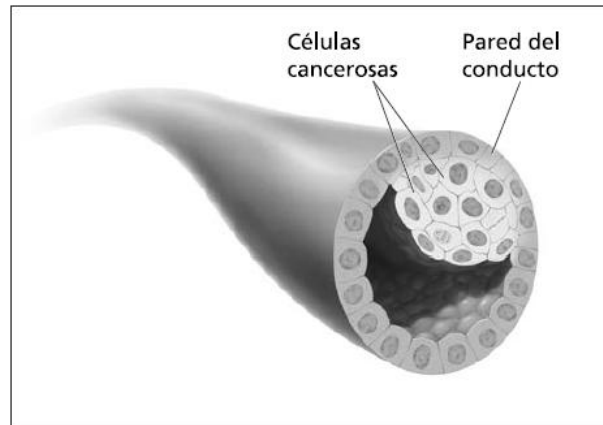
### 1.2.5.2 Estadios del cáncer de mama

*Estadio 0 (carcinoma in situ)*

Hay dos tipos de carcinoma de mama in situ:

- Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): afección no invasora en la que se encuentran células anormales en el revestimiento del conducto de la mama. Las células anómalas no se diseminaron afuera de este conducto hasta otros tejidos de la mama (Figura 5). Algunas veces, el CDIS se puede volver cáncer invasor y diseminarse hasta otros tejidos, aunque por el momento no se sabe cómo predecir cuáles lesiones se volverán invasoras.



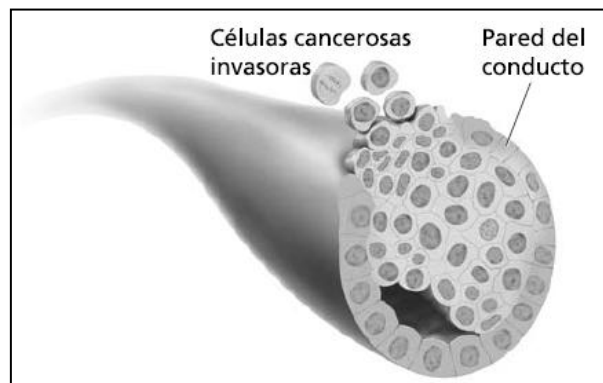


**Figura 5. Carcinoma Ductal *In situ*.** Se observa a las células cancerosas dentro del conducto mamario, el cual conserva intacta la pared que lo delimita evitando la diseminación de las células neoplásicas.

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

#### *Estadio I*

En el estadio I, es una etapa inicial de CM invasor. Las células cancerosas han invadido tejido de seno más allá del lugar en donde empezó el cáncer (Figura 6).



**Figura 6. Estadio I.** Las células cancerosas se han diseminado fuera del conducto y han invadido tejido cercano dentro del seno.

El estadio I se divide en los estadios IA y IB.

En el estadio IA, el tumor mide dos centímetros o menos y no se ha diseminado aún fuera de la mama.

En el estadio IB se presenta una de las siguientes situaciones:

1. No se encuentra un tumor en la mama, pero se encuentran pequeños racimos de células cancerosas (mayores de 0.2 milímetros, pero no mayores de dos milímetros) en los ganglios linfáticos.
2. El tumor mide dos centímetros o menos y se encuentran pequeños racimos de células cancerosas (mayores de 0.2 milímetros pero no mayores de dos milímetros) en los ganglios linfáticos.

### *Estadio II*

El estadio II se divide en los estadios IIA and IIB.

En el estadio IIA se puede presentar cualquiera de las siguientes situaciones:

1. No se encuentra un tumor en la mama, pero se encuentra cáncer en los ganglios linfáticos axilares (ganglios linfáticos debajo del brazo).
2. El tumor mide dos centímetros o menos y se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares.
3. El tumor mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y no se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares.

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

1. Mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros y se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares.
2. Mide más de cinco centímetros, pero no se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares.

### *Estadio IIIA*

En el estadio IIIA, los posibles escenarios son los siguientes:

1. No se encuentra un tumor en la mama. El cáncer se encuentra en los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras; o el cáncer se puede encontrar en los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
2. El tumor mide dos centímetros o menos. El cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.
3. El tumor mide más de dos centímetros, pero no más de cinco centímetros. El cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí

o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

4. El tumor mide más de cinco milímetros. El cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o el cáncer se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

#### *Estadio IIIB*

En el estadio IIIB, el tumor puede tener cualquier tamaño y puede haber diseminado a las siguientes partes del cuerpo:

1. La pared torácica o a la piel de la mama (el cáncer que se diseminó hasta la piel de la mama se llama CM inflamatorio).
2. Los ganglios linfáticos axilares que están unidos entre sí o a otras estructuras, o los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

#### *Estadio IIIC*

En el estadio IIIC, puede no haber signos de CM o el tumor puede tener cualquier tamaño y se puede haber diseminado hasta la pared torácica o a la piel de la mama. Asimismo, el cáncer:

1. Se diseminó hasta los ganglios linfáticos por arriba o debajo de la clavícula.
2. Se puede haber diseminado hasta los ganglios linfáticos axilares o hasta los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

El CM en estadio IIIC se divide en estadio IIIC operable y estadio IIIC inoperable.

En el estadio IIIC operable, el cáncer puede:

1. Encontrarse en diez o más ganglios linfáticos axilares.
2. Encontrarse en los ganglios linfáticos debajo de la clavícula.
3. Encontrarse en ganglios linfáticos axilares y en los ganglios linfáticos cercanos al esternón.

En el estadio IIIC no operable del CM, el cáncer se diseminó hasta los ganglios linfáticos por arriba de la clavícula.

#### *Estadio IV*

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

## 1.2.6 Tratamiento:

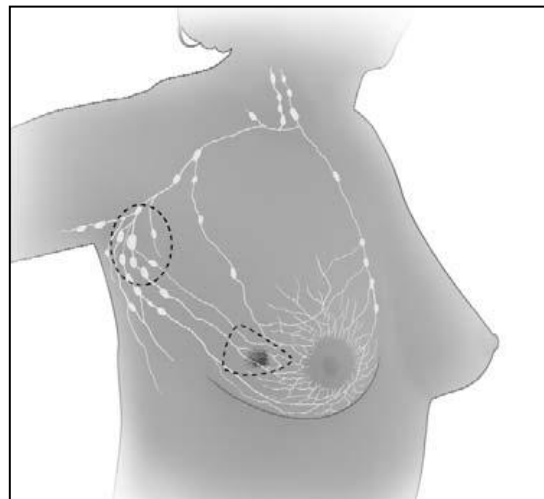
Actualmente se usan seis tipos de tratamiento estándar:

### 1.2.6.1 Cirugía

La mayoría de las pacientes de CM se someten a cirugía a fin de extirparle el tumor. Normalmente se extirpan algunos de los ganglios linfáticos de abajo del brazo y se observan bajo un microscopio para verificar si contienen células cancerosas.

*Cirugía para preservar la mama:* una operación para extirpar el cáncer, pero no la mama (Figura 7). Incluye los siguientes procedimientos:

- Lumpectomía: cirugía para extirpar el tumor (masa) y una pequeña cantidad de tejido normal alrededor del mismo.
- Mastectomía parcial: cirugía para extirpar la parte de la mama que tiene cáncer y algo del tejido normal que la rodea. También se puede extirpar el revestimiento de los músculos pectorales debajo del cáncer. Este procedimiento también se llama mastectomía segmentaria.



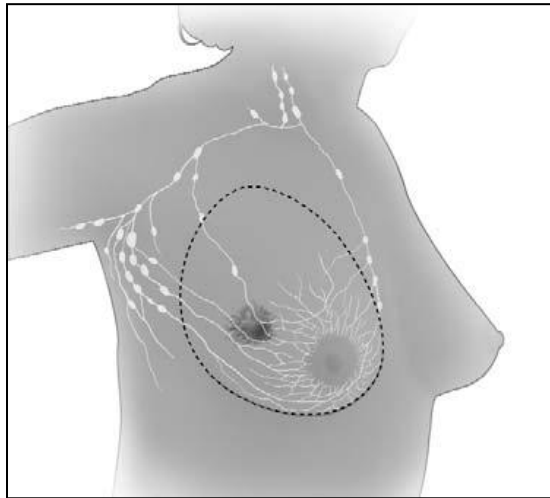
**Figura 7. Cirugía conservadora de seno.** El cirujano extirpa el tumor del seno y algo de tejido normal de su alrededor. Es posible que extirpe algunos de los ganglios linfáticos abajo de la axila. A veces el cirujano extirpa algo del revestimiento que está sobre los músculos del pecho, debajo del tumor.

A las pacientes que se tratan con cirugía para preservar la mama, también se les puede extirpar algunos de ganglios linfáticos debajo del brazo para someterlos a una biopsia. Este procedimiento se llama disección de ganglios linfáticos. Se puede realizar al

mismo tiempo que la cirugía para preservar la mama o después. La disección de ganglios linfáticos se realiza a través de una incisión separada.

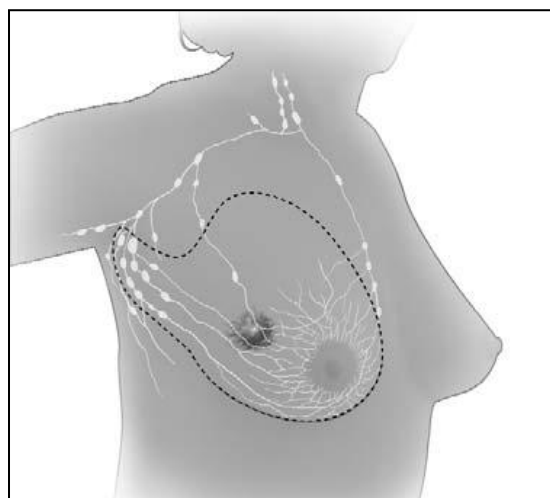
Otros tipos de cirugía incluyen los siguientes procedimientos:

*Mastectomía total:* cirugía para extirpar la mama que contiene cáncer. Este procedimiento también se llama mastectomía simple (Figura 8). Se pueden extraer algunos de los ganglios linfáticos de abajo del brazo para someterlos a una biopsia en el mismo momento de la cirugía o después de la misma. Esto se realiza a través de una incisión separada.



**Figura 8. Mastectomía simple.** El cirujano extirpa todo el seno. Es posible que extirpe también algunos de los ganglios linfáticos de la axila.

*Mastectomía radical modificada:* cirugía para extirpar la mama que contiene cáncer, muchos de los ganglios linfáticos de abajo del brazo, el revestimiento de los músculos pectorales y, a veces, parte de los músculos de la pared del pecho (Figura 9).

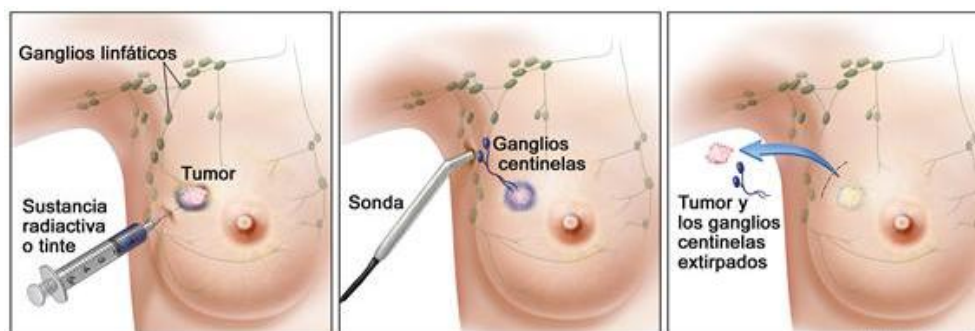


**Figura 9. Mastectomía radical modificada.** El cirujano extirpa todo el seno y casi todos o todos los ganglios linfáticos de la axila. Con frecuencia, se extirpa el revestimiento que está sobre los músculos del pecho. Es posible que también se quite un pequeño músculo del pecho para poder extirpar más fácilmente los ganglios linfáticos.

Se puede administrar quimioterapia antes de la cirugía para extirpar el tumor. Cuando la quimioterapia se administra antes de la cirugía, reducirá el tamaño del tumor y la cantidad de tejido que es necesario extirpar durante la cirugía. El tratamiento administrado antes de la cirugía se llama terapia neoadyuvante. Incluso si el médico extirpa todo el cáncer que se puede ver en el momento de la cirugía, algunas pacientes pueden recibir radioterapia, quimioterapia o terapia con hormonas después de la cirugía para destruir cualquier célula cancerosa que haya quedado. El tratamiento administrado después de la cirugía para disminuir el riesgo de que el cáncer vuelva, se llama terapia adyuvante. Si la paciente se va a someter a una mastectomía, se puede considerar la reconstrucción de la mama (cirugía para reconstruir la forma de una mama después de la mastectomía). La reconstrucción de mama se puede hacer en el momento de la mastectomía o después. La reconstrucción se puede llevar a cabo con tejido de la paciente (no de la mama) o mediante implantes rellenos con solución salina o mediante un gel de silicona.

#### **1.2.6.2 Biopsia del ganglio linfático centinela seguida de cirugía**

La biopsia del ganglio linfático centinela es un procedimiento para extraer el ganglio linfático centinela durante una cirugía (Figura 10). El ganglio linfático centinela es el primer ganglio que recibe el drenaje linfático de un tumor. Es el primer ganglio linfático donde es posible que el cáncer se disemine desde el tumor. Se inyecta una sustancia radiactiva o un tinte azul cerca del tumor. La sustancia o el tinte fluyen a través de los conductos linfáticos hasta los ganglios linfáticos. Se extrae el primer ganglio que recibe la sustancia o el tinte. Un patólogo observa el tejido bajo un microscopio para verificar si hay células cancerosas. Cuando no se detectan células cancerosas, puede no ser necesario extraer más ganglios linfáticos. Después de la biopsia del ganglio linfático centinela, el cirujano extirpa el tumor (cirugía para preservar la mama o mastectomía).



**Figura 10. Biopsia del ganglio linfático centinela.** Biopsia de ganglio linfático centinela de la mama. Se inyecta una sustancia radiactiva o un tinte azul cerca del tumor (primer panel). El material inyectado se identifica con la vista o con una sonda que detecta la radiactividad (panel del medio). Se extraen los ganglios centinelas (los primeros ganglios que absorben la sustancia) para determinar si tienen células cancerosas (último panel).

### 1.2.6.3 Radioterapia

La radioterapia usa rayos de alta energía para destruir las células cancerosas. Afecta únicamente las células en la parte del cuerpo que está siendo tratada y puede usarse después de la cirugía para destruir las células cancerosas que quedan en el área. Existen dos tipos de radioterapia:

- *Radioterapia externa:* La radiación procede de una máquina situada fuera del cuerpo que envía radiación al área donde se encuentra el cáncer. Este tipo de tratamiento se realiza en hospitales. Los tratamientos son generalmente 5 días a la semana durante 4 ó 6 semanas. La radiación externa es el tipo de radioterapia que se usa generalmente para el CM.
- *Radiación interna* (radiación por implante o braquiterapia): El médico coloca uno o más tubos delgados dentro del seno por una incisión pequeña. El tubo se carga con una sustancia radiactiva. La sesión de tratamiento puede durar unos pocos minutos, después de los cuales se retira la sustancia. Cuando dicha sustancia se retira, no queda radiactividad en el cuerpo.

### 1.2.6.4 Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento del cáncer en el que se usan medicamentos para interrumpir el crecimiento de las células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. Cuando la quimioterapia se administra por boca o se inyecta en una vena o músculo, los medicamentos ingresan en el torrente sanguíneo y afectan a células cancerosas de todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la

quimioterapia se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas de esas áreas (quimioterapia regional). La forma en que se administre la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando.

#### **1.2.6.5 Terapia con hormonas**

La terapia con hormonas es un tratamiento para el cáncer por el que se bloquea su acción, y se impide el crecimiento de las células cancerosas. Las hormonas son sustancias elaboradas por las glándulas del cuerpo que circulan por el torrente sanguíneo. Algunas hormonas pueden hacer crecer ciertos cánceres. Si las pruebas muestran que las células cancerosas ofrecen sitios donde pueden adherirse las hormonas (receptores), se utilizan medicamentos, cirugía o radioterapia para reducir la producción de hormonas o impedir que funcionen. La hormona estrógeno, que hace crecer algunos tipos de CM, es elaborada en su mayor parte por los ovarios. El tratamiento para impedir que los ovarios elaboren estrógeno se llama ablación ovárica.

La terapia hormonal con tamoxifeno a menudo se suministra a pacientes con estadios tempranos de la enfermedad y a pacientes de CM metastásico (cáncer que se diseminó hasta otras partes del cuerpo). La terapia hormonal con un inhibidor de la aromatasa se administra a algunas mujeres posmenopáusicas que padecen de CM hormonodependiente. Este necesita de la hormona estrógeno para crecer. Los inhibidores de la aromatasa disminuyen el estrógeno en el cuerpo porque impiden que una enzima que se llama aromatasa convierta el andrógeno en estrógeno.

Ciertos inhibidores de la aromatasa pueden usarse para el tratamiento de CM en un estadio temprano como terapia adyuvante o después de dos años o más de tamoxifeno. Los inhibidores de la aromatasa se están probando en ensayos clínicos para compararlos con la terapia hormonal con tamoxifeno en el tratamiento del CM metastásico.

#### **1.2.6.6 Terapia dirigida**

La terapia dirigida es un tipo de tratamiento para el que se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células cancerosas específicas, sin dañar a las células normales. Los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de la tirosina cinasa son dos de los principales tipos de terapia dirigida que se usan para el tratamiento del



CM. Otro tipo de este tipo de terapia son los inhibidores de la Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP), sustancias que se usan para bloquear la reparación del ADN e intentar destruir las células cancerosas. La terapia con este tipo de inhibidores del PARP está en estudio para el tratamiento del CM triple negativo.

La terapia con anticuerpos monoclonales es un tratamiento para el cáncer en el que se utilizan anticuerpos producidos en el laboratorio a partir de un tipo único de células del sistema inmunitario. Estos anticuerpos pueden identificar moléculas en las células cancerosas o sustancias normales en el cuerpo que contribuyen al crecimiento de estas. Los anticuerpos se adhieren a dichas moléculas o sustancias y así buscan eliminar las células cancerosas, al impedir su crecimiento o prevenir su diseminación. Los anticuerpos monoclonales se administran por infusión y se pueden utilizar solos o para administrar medicamentos, toxinas o material radiactivo directamente a las células cancerosas. Los anticuerpos monoclonales se pueden usar en combinación con la quimioterapia, como terapia adyuvante. De entre los más conocidos esta el trastuzumab (Herceptin). Este es un anticuerpo monoclonal que bloquea los efectos del factor de crecimiento HER2, el cual envía señales a las células cancerosas de la mama. Alrededor de una cuarta parte de las pacientes de CM tienen tumores que se pueden tratar con trastuzumab combinado con quimioterapia.

En el cáncer, la tirosina cinasa detecta factores de crecimiento que los tumores necesitan para crecer, mismos que se encuentran sobreexpresados en las células neoplásicas, propiciando el crecimiento acelerado de los tumores. Los inhibidores de la tirosina cinasa son medicamentos que se usan en la terapia dirigida para bloquear las señales que favorecen el crecimiento. Los inhibidores de la tirosina cinasa se pueden usar en combinación con otros medicamentos anticancerosos como terapia adyuvante.

El lapatinib es un inhibidor de la tirosina cinasa que bloquea las señales intracelulares desatadas por la acción de la proteína HER2 y de otras proteínas que estimulan a las células tumorales. Se puede utilizar para tratar a pacientes que tienen tumores positivos para los receptores de HER2 y no respondieron al trastuzumab.

#### **1.2.6.7 Nuevas Alternativas de tratamiento:**

Se están probando nuevos tipos de tratamiento en ensayos clínicos y algunos tratamientos en evaluación se enlistan a continuación.

- Quimioterapia de dosis alta con trasplante de células madre.

- Inhibidores de la tirosina cinasa como terapia adyuvante.
- Dasatinib está basado en moléculas más pequeñas que son inhibidores de quinasas y que son capaces de introducirse en la célula y actuar sobre varias quinasas celulares, aunque no sobre Her2.
- La eribulina, descubierta y desarrollada por la compañía farmacéutica internacional Eisai, es un inhibidor no taxano de la dinámica de los microtúbulos y un análogo sintético de la halicondrina B, un producto natural que se obtiene de la esponja marina *Halichondria okadai*.

#### **1.2.6.7.1 Quimioterapia de dosis alta con trasplante de células madre.**

La quimioterapia de dosis alta con trasplante de células madre es una forma de administrar dosis altas de quimioterapia y reemplazar las células generadoras de sangre destruidas por el tratamiento. Las células madre (células sanguíneas inmaduras) se extraen de la sangre o la médula ósea del mismo paciente o de un donante, se congelan y almacenan. Después de finalizar la quimioterapia, las células madre guardadas se descongelan y se reinyectan al paciente mediante una infusión. Estas células madre reinyectadas crecen (y restauran) las células sanguíneas en el cuerpo.

Algunos estudios han mostrado que con las dosis altas de quimioterapia seguidas de un trasplante de células madre, se obtienen mejores resultados que con la quimioterapia estándar para el tratamiento del CM. Sin embargo, los médicos por ahora emplean las dosis altas de quimioterapia únicamente en ensayos clínicos.

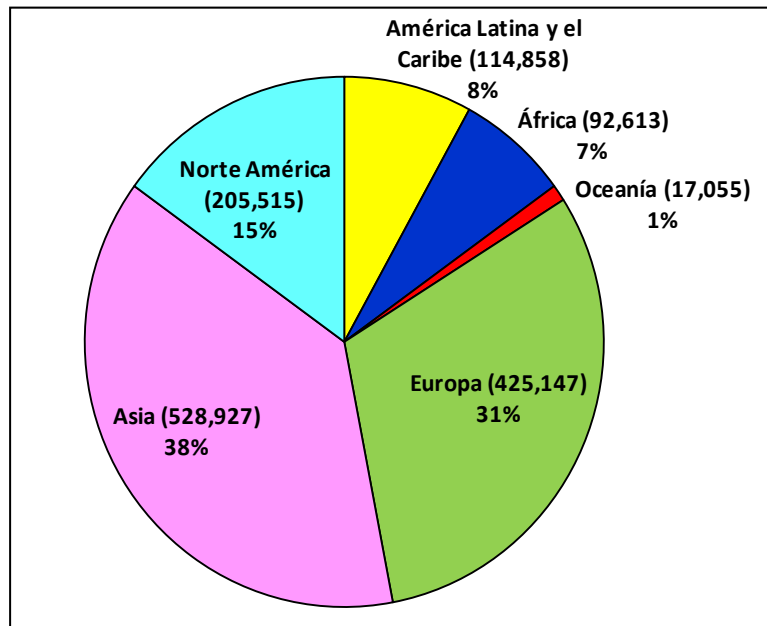
### **1.3. Epidemia de cáncer**

#### **1.3.1. El cáncer en el mundo**

A nivel mundial los diferentes tipos de cánceres cobran 7,564,800 vidas (105.6 por cada 100,000 habitantes) de los 12,662,600 casos nuevos de que se registran. De estos, el 47.73% (6,044,710) corresponde a mujeres, cobrando 3,345,176 vidas anualmente (87.2 por cada 100,000 mujeres), siendo los tipos más comunes en población femenina: mama, colorectal, cervicouterino, pulmón y estómago.

### 1.3.2 Impacto del cáncer de mama

El CM es actualmente la neoplasia más frecuente y mortal entre las mujeres del mundo [8]. Para el año 2008, la Organización Mundial de la Salud publicó que se diagnosticaron 1,384,155 nuevos casos (Figura 11) (38.9% del total de los cánceres en la mujer) y que 458,503 resultaron en descensos (12.4% de las muertes por cáncer en mujeres).



**Figura 11. El CM en el mundo.** Se muestra la distribución mundial de nuevos casos de CM por regiones geográficas.

La frecuencia del CM varía ampliamente; los países de Norteamérica y Europa son los que tienen frecuencia más alta y los países de Asia y África tienen las más bajas. En general, los países latinoamericanos tienen una baja frecuencia, comparados con los países desarrollados (Cuadro 2) (Figura 12).

**Cuadro 2.** Comparación de incidencia y mortalidad entre países desarrollados y subdesarrollados.

	Incidencia			Mortalidad			Prevalencia a 5 años	
	Número de casos	Proporción (%)	Tasa sobre 100,000	Número de casos	Proporción (%)	Tasa sobre 100,000	Número de casos	Proporción (%)
Países menos desarrollados	691,521	20	27.1	269,048	12.7	10.7	2,380,310	30.6
Países más desarrollados	692,634	26.7	66.4	189,455	15.5	15.3	2,808,718	37.4
América Latina y el Caribe	114,898	24.9	39.7	36,952	14.1	12.4	415,198	34.7
México	13,939	21.2	27.2	5,217	13.2	10.1	51,497	30.8

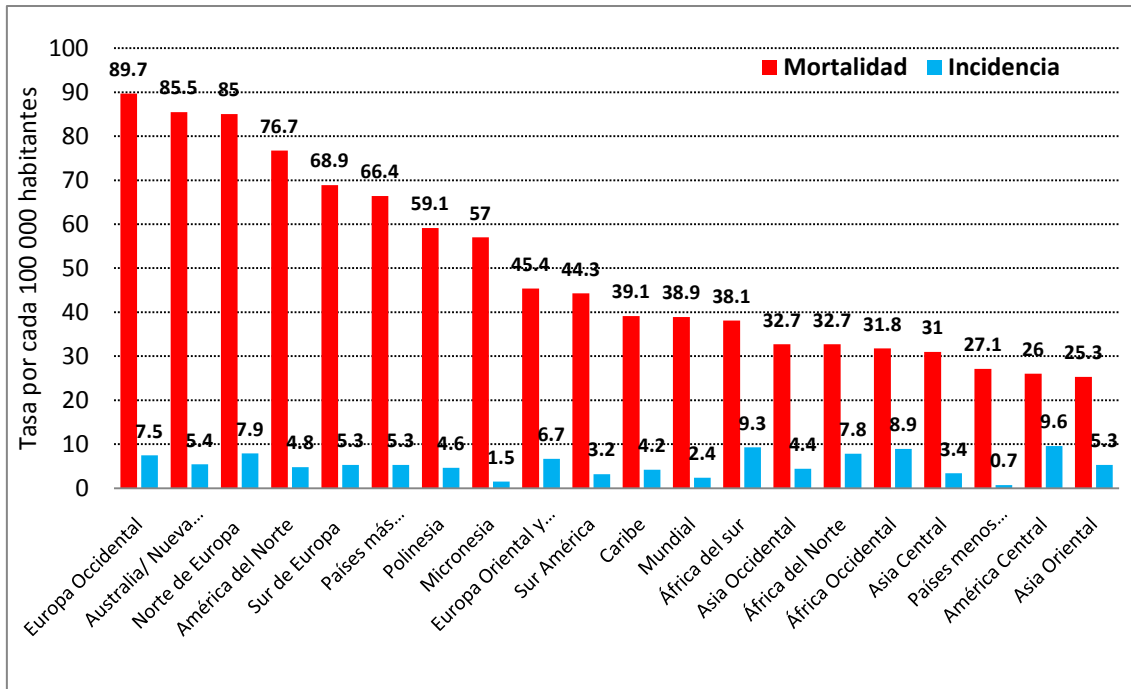


Figura 12. Distribución de la incidencia de CM por regiones geográficas.

La tasa de incidencia promedio a nivel mundial es de 38.9 por cada 100,000 mujeres. Al estratificar por edades (Figura 13), resultan las más afectadas aquellas mujeres entre los 65 y 74 años. La tasa de mortalidad sin importar la edad se encuentra en 29.32 mujeres por cada 100,000, siendo las mujeres mayores de 75 años de edad las que tienen más probabilidades de morir por esta neoplasia.

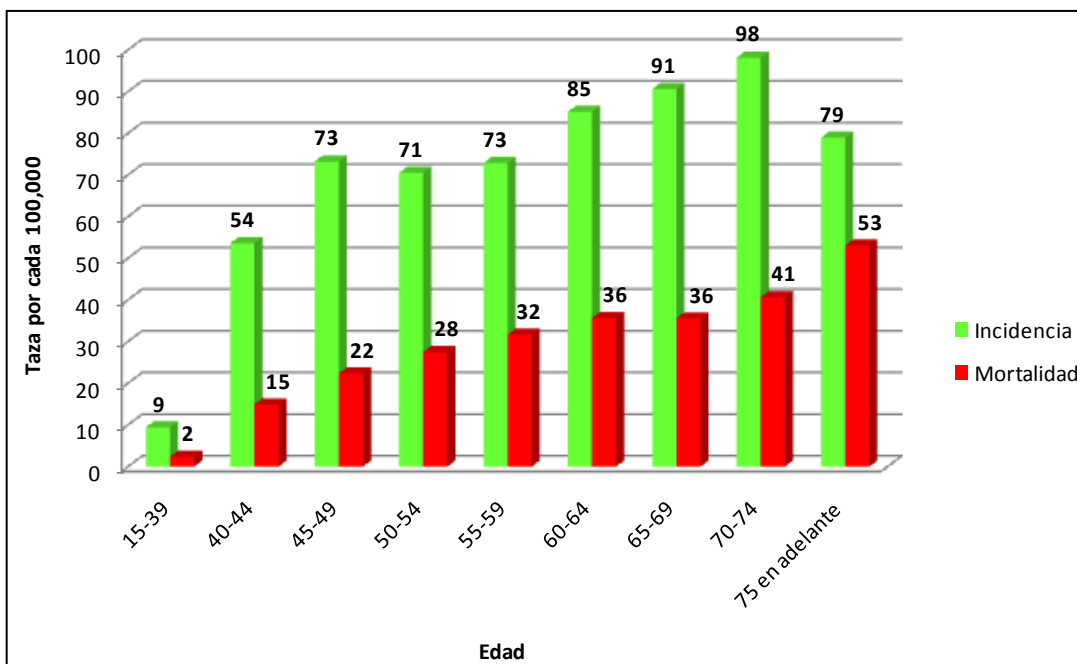


Figura 13. Tasas mundiales de incidencia y mortalidad del CM. Se estratifican por edad.

Es notorio que en todo el mundo existe un incremento en la frecuencia de CM, mismo que es mayor en países desarrollados. Por ejemplo en Estados Unidos de América, el número de casos aumentó progresivamente de 1970 a 1997 en 161% (de 69,000 a 180,200) y el número de muertes por esta enfermedad aumentó en un el 63% (de 30,000 a 49,000) [9].

Este cambio, en gran parte se debió al aumento del número de mujeres en riesgo, de forma particular de mujeres de edad avanzada. Sin embargo, cuando se analiza la tasa de incidencia ajustada por edad se muestra un incremento anual del 1% de 1940 a 1980. A partir de este último año, el incremento se aceleró al 4% anual y se estabilizó en 111.3 por 100,000 habitantes a partir de 1995. El crecimiento acelerado a partir de 1980 se debe, en parte, no al aumento real de la enfermedad, sino al incremento en la detección de la misma, ya que desde entonces se ha ido generalizando el uso de la mastografía de manera regular y preventiva. Así, la proporción de mujeres blancas de 50 a 59 años de edad en Estados Unidos, a las que se les realiza mastografía, fue del 46% en 1987, 68% en 1990 y 76% en 1992. Gracias al uso de las mastografías de manera generalizada y frecuente entre las mujeres, el CM ha sido detectado en etapas más tempranas y con la disponibilidad de mejores tratamientos, las tasas de mortalidad se han visto disminuidas. Esto aplica sobre todo a países desarrollados del norte de Europa, Canadá y Estados Unidos. En países mediterráneos o exsocialistas europeos, como: España, Portugal, Grecia, Italia, Hungría y Polonia, esta disminución no ha sucedido. Ello debido a la falta de infraestructura para realizar a las mujeres mastografías de manera general. Por tanto, en los países subdesarrollados, como el nuestro, las mujeres con CM continúan teniendo un diagnóstico tardío y una baja tasa de recuperación. Otras causas que explican el aumento en la frecuencia a partir de 1980 son los cambios en la maternidad, con tendencia a retardar el primer nacimiento, disminuir la paridad y el usar de forma generalizada anticonceptivos orales y terapia estrogénica de remplazo.

### **1.3.3 El cáncer de México**

En nuestro país, el cáncer afecta más frecuentemente a las mujeres (62.5% comparado con 37.5% de los varones). En el 2008 se reportaron 65,700 casos nuevos (422 por cada 100,000 mujeres) y 39,400 muertes por algún tipo de cáncer en mujeres, siendo los más comunes en la población femenina: mama, cervicouterino, estomago,

pulmón y colorectal. El riesgo de las mujeres mexicanas de padecer cáncer antes de los 75 años es de 12.9. Así mismo, la probabilidad de morir por neoplasias antes de los 75 años es de 8%. Tanto el riesgo de padecer cáncer, como el de morir por esta enfermedad, se incrementan con la edad hasta los 60 años. (Figura 14)

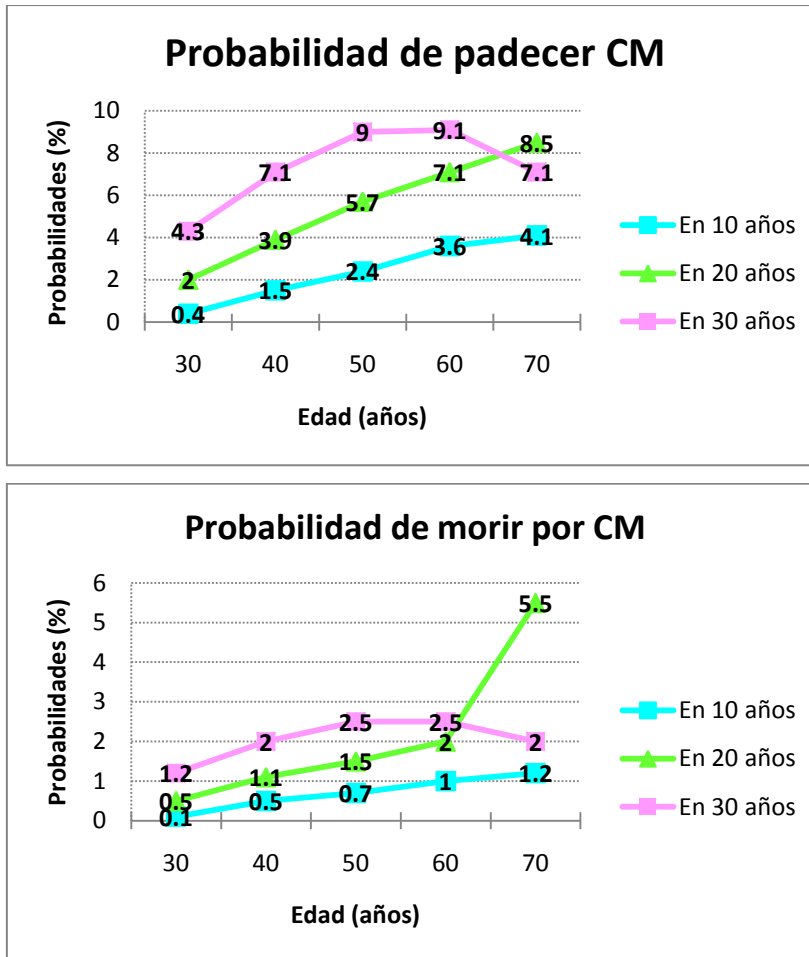


Figura 14. Probabilidad de padecer o morir por CM. Se indican estas cifras para mujeres en base a su edad.

### 1.3.4 El CM en nuestro país

En México en el 2008, el CM presentó 13,939 nuevos casos (incidencia de 27.2 por cada 100,000 mujeres), lo que corresponde al 21.2% de los casos totales de cáncer en el país. En el mismo año se reportaron 5,217 muertes por este padecimiento (13.2% del total de las muertes por cáncer), lo que representa una tasa de mortalidad del 10.1 por cada 100,000 mujeres. Al estratificar la mortalidad por CM en mujeres mayores de 25 años, la tasa se elevó de 13.6 a 14.58 por cada 100,000 mujeres de 1990 al 2001 (Figura 15).

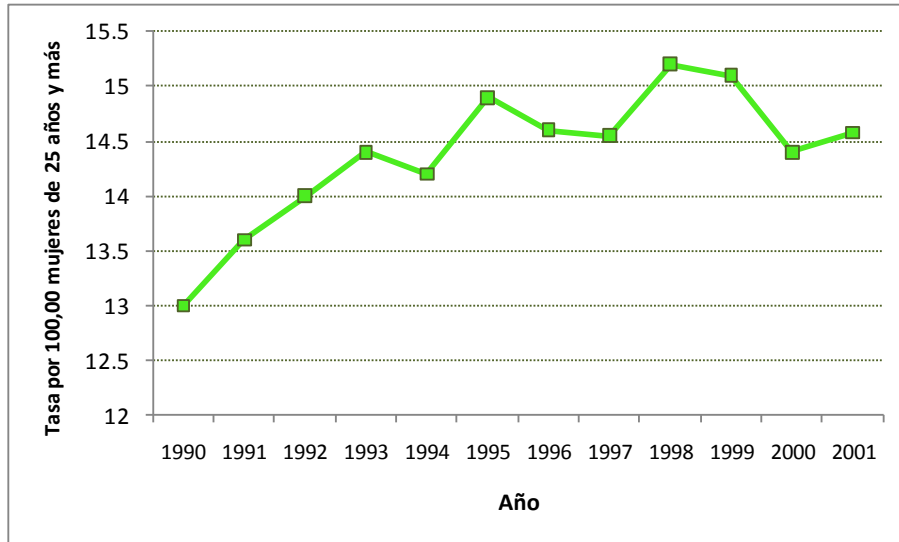


Figura 15. Tasa de mortalidad por CM en mujeres mexicanas. Las cifras corresponden a mujeres mayores de 25 años (por 100,000 mujeres).

Desde el año 2006, esta neoplasia ha rebasado en nuestro país al cáncer cervicouterino (CaCU) (Figura 16) y desde entonces es la segunda causa de muerte en general\_ y la primera causa de muerte por cáncer entre mujeres de edades comprendidas entre los 30 y 54 años [10-12]. En el 2008 se notificaron 5,217 muertes con una tasa de 10.1 por cada 100 000 mujeres. [8].

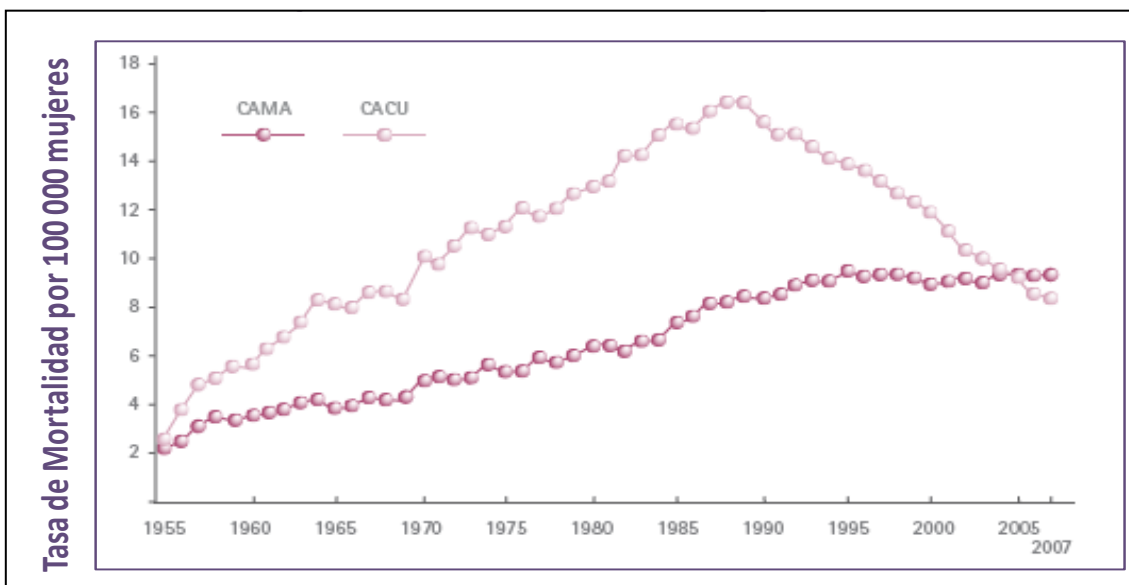
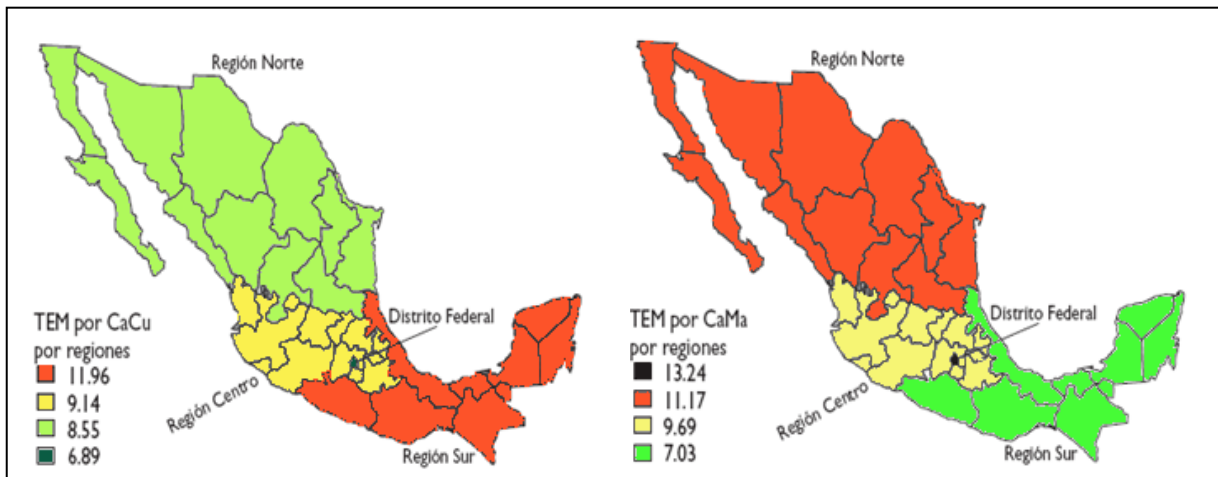


Figura 16. Comparación entre los dos tipos de cánceres más comunes en mujeres en mexicanas. CAMA se refiere a cáncer de mama y CACU a cáncer de cervicouterino.

En México, las tasas de mortalidad por CM son mayores en los estados del norte (Figura 17) principalmente Coahuila (16.1), Nuevo León (14.5), Sonora (14.5), Chihuahua (14.1) y Baja California (13.5)[10]. El 47% de las muertes por CM ocurren en mujeres de entre 45 y 64 años, por lo que la Secretaría Salud calcula un promedio de 21 años de vida productiva perdidos por cada mujer, que tuvieron un efecto económico de 3,107,505,000.00 pesos en el 2001.



**Figura 17. Distribución geográfica de la mortalidad por los dos tipos de cáncer más comunes en mujeres en México.** CaCu = Cáncer cervicouterino, CaMa= Cáncer de mama.

El CM se ha convertido en un grave problema de salud pública, que lejos de disminuir continua aumentando día con día en nuestro país y el resto del mundo. Predicciones hechas por la Organización Mundial de la Salud, dicen que para el 2030, tanto los índices de incidencia como la mortalidad, se incrementarán casi hasta duplicarse (Figura 18). Por lo que los investigadores, tanto nacionales como internacionales, han girado su mirada a este problema de salud, buscando nuevas alternativas de tratamiento. Pero principalmente para encontrar medidas preventivas eficientes, que permitan de ser posible evitar su fatal impacto, tales como métodos de detección temprana que posibiliten un tratamiento oportuno de la enfermedad y así incrementar las tasas de sobrevivencia.



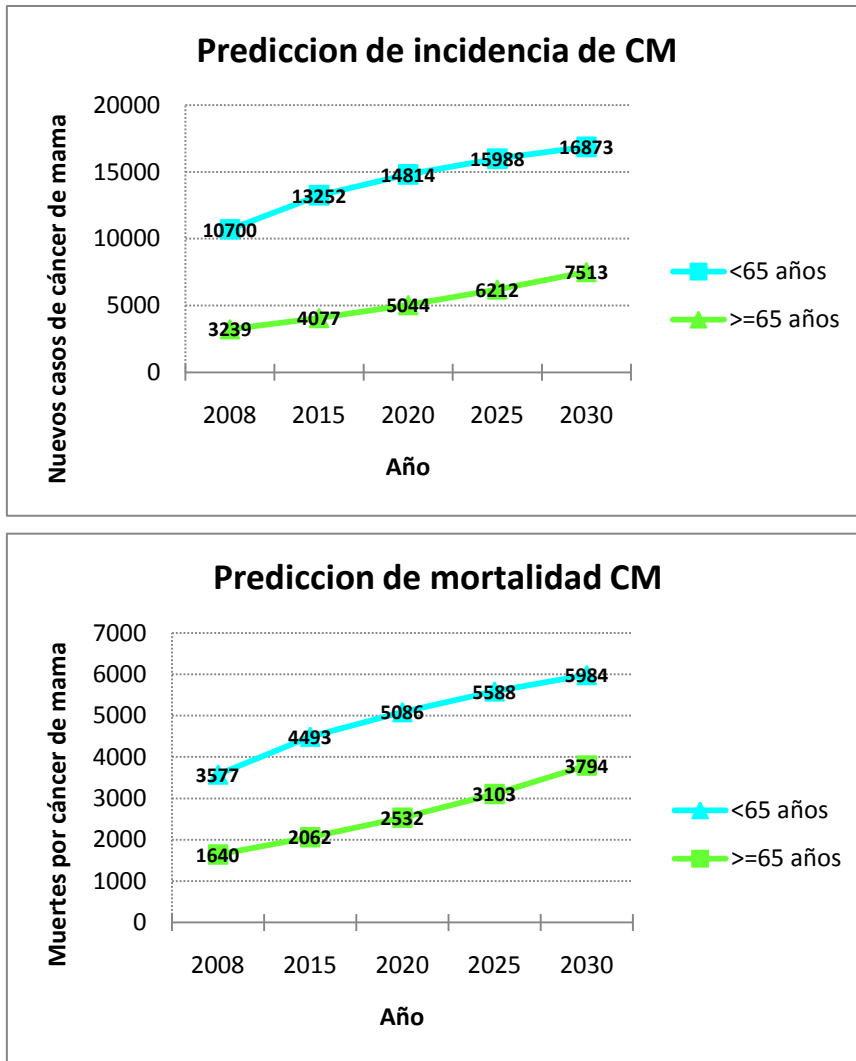


Figura 18. Predicciones de incidencia y mortalidad por CM en México. Se muestran las cifras correspondientes de 2008 al 2030.

#### 1.4. El cáncer y la herencia

En la actualidad se sabe que el cáncer es causado por una serie de mutaciones heredadas (línea germinal) o adquiridas (somáticas), que alteran la correcta regulación del crecimiento celular. Estas mutaciones se dan principalmente en dos tipos de genes: en los proto-oncogenes, que son genes que de manera normal se encargan de propiciar que la célula normal se replique, pero que al ser alterados (oncogenes) inician la proliferación celular de manera acelerada. El otro tipo son los conocidos como genes supresores de tumores. Estos son genes cuya función es la de detener o frenar la proliferación celular, pero al dañarse no cumplen con esta función, por lo que la célula pierde su capacidad de frenar el crecimiento acelerado.

Las mutaciones aisladas generalmente no son suficientes para causar cáncer, sino que producen cambios que pueden predisponer a las células al crecimiento maligno, incrementando las posibilidades de que a lo largo de la vida se desarrolle cáncer. Mutaciones adicionales en otros genes, causadas por el daño del medio ambiente, continúan la transformación maligna de las células. De este modo, el cáncer es un proceso de muchos pasos, que implica la interacción entre los genes y el medio ambiente.

Actualmente se conoce que algunas de estas mutaciones se transmiten de generación en generación, lo que explica en parte que dentro de una familia se presenten varios casos del mismo tipo de cáncer. Los tipos de cáncer en los que se ha estudiado mayormente el factor hereditario son: colon, recto, páncreas, estómago, ovario y mama, siendo este último el de nuestro interés.

#### **1.4.1 Genética del cáncer de mama**

El riesgo conferido por una historia familiar de CM ha sido evaluado en diversos estudios, tanto de casos y controles, como de cohortes, con resultados consistentes. El riesgo relativo (RR) conferido por tener un familiar de primer grado con CM ha sido estimado en 2.1 [13]. Este riesgo aumenta de manera directa con el número de familiares de primer grado afectados y con el diagnóstico cada vez a edades más tempranas de estos [14].

El riesgo por herencia de desarrollar CM se ha atribuido a algunas mutaciones dentro del genoma, de las cuales las más estudiadas y asociadas son las que afectan los genes BRCA1 y BRCA2, identificados en la década de 1990 [15-16]. Las proteínas BRCA codificadas por estos genes tienen funciones múltiples, siendo de las más importantes la reparación del daño al ADN y la regulación de la expresión génica. [17-18]; aunque los genes BRCA1 y 2 fueron los primeros en asociarse al CM y actualmente son los que han sido mas ampliamente estudiados, estos únicamente se asociación a su forma hereditaria, es decir con antecedentes familiares, los que corresponden únicamente a aproximadamente el 15% del total de los casos. Además, aun en estos casos, mutaciones en estos genes sólo se han encontrado en alrededor del 40% de los tumores, lo que se traduce en tan solo el 7% del total de las mujeres afectadas por el CM. Debido a esto, además de *BRCA 1* y *2*, se han buscado otros genes que se vean asociados al desarrollo de esta neoplasia.

Con el uso de poderosas herramientas de biología molecular y bioinformática, se han realizado en distintos puntos del mundo estudios de asociación genética amplia (GWAS, del inglés Genome Wide Associations Studies), los cuales han permitido identificar genes que confieren riesgo de desarrollar CM: confieren un alto riesgo cuatro de ellos: *TP53*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1*; Otros cuatro confieren un riesgo moderado: *PALB2*, *BRIP1*, *ATM* y *CHEK2*; y seis más tienen una baja penetrancia: *CASP8*, *FGFR2*, *TOX3*, *MAP3K1*, *LSP1* y *8q24 rs13281615* [13, 19-20]. Todos estos genes adquieren mayor importancia debido a que sus variantes alélicas presentan una alta frecuencia, a diferencia de las de los genes de mayor penetrancia (*BRCA1* y *2*, así como *P53*) [21].

Las variantes genéticas de estos genes podrían ayudar a esclarecer el por qué de la aparición de CM en el 93% de los casos que no pueden ser explicados por los genes *BRCA 1* y *BRCA 2*.

Las variantes genéticas que mayormente se encuentran en los genes que se asocian a CM, corresponden a variaciones en la secuencia del ADN llamados polimorfismos de un sólo nucleótido o SNPs (por su nombre en inglés *Single Nucleotide Polimorphisms*), mismos que se caracterizan por variar considerablemente entre los diferentes individuos en la población e incluso entre pares de cromosomas en un mismo individuo. Este tipo de variaciones genéticas influyen el desarrollo de las enfermedades y la respuesta a agentes externos como: patógenos, sustancias químicas, medicamentos y vacunas. Debido a que estos SNPs representan las principales diferencias en la información genética entre un individuo y otro, son una pieza fundamental para valorar el riesgo y por tanto para hacer realidad la medicina personalizada.

#### **1.4.1.1 Genes BRCA 1 y BRCA 2**

Las mutaciones en los genes *BRCA 1* y *BRCA 2* son los principales factores genéticos asociados a un riesgo heredado familiarmente de desarrollar CM.

Las variaciones genéticas reportadas para el gen *BRCA 1* ascienden a más 1600, entre polimorfismos y mutaciones. Las que tienen un mayor impacto en el riesgo de CM, ya que resultan en una proteína trunca o de secuencia alterada, son las de corrimiento del marco de lectura (“Frameshift”) debido a que se modifica o pierde totalmente la funcionalidad de la proteína. Además de este tipo, se han descrito también mutaciones con sentido equivocado (“missense”) las cuales son responsables de

cambiar un aminoácido por otro y muchas veces el funcionamiento de la proteína. [21-24]

Las mutaciones más estudiadas para el gen BRCA 1 son la 185delAG (exón 2) y la 5382insC (exón 20), mientras que para el gen BRCA 2 es la 6174delT (exón 11), encontrada en poblaciones de judíos Askenatsi [23]. Al haber sido asociadas fuertemente con la aparición del CM, se han continuado estudiando en otras poblaciones, por ejemplo: Zhang, *et al.*, las analizaron en población caucásica [22] y Kuperstein, *et al.*, hicieron lo propio en Cánada [17], entre otros. Sin embargo estudios en donde se analizaron todos los exones de los genes BRCA mostraron diferentes mutaciones que también podrían asociarse a la aparición de CM (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mutaciones reportadas para los genes BRCA 1 y BRCA 2.

Autores	Población	Gen	Mutación	Región génica
Ruiz-Flores <i>et al</i> , 2002 [25]	Mexicana	BRCA1	2364G>T	exón 11
			3587delT	exón 11
			5711+3 6C>A	3'UTR
		BRCA2	353A>G	exón 3
			2066T>G	exón 10
			2663-2664insA	exón 11
			6580G>T	exón 11
			7105T>C	exón 12
8605G>A	exón 19			
9966C>T	exón 27			
Rodríguez <i>et al</i> , 2008 [26]	Cubana	BRCA1	5231delT	exón 18
		BRCA2	3394C>T	exón 11
			2604C>A	exón 11
			2792_2793delCA	exón 11
			4637_4641delTAAGA	exón 11
			5397_5401insAGTAC	exón 11
7697T>C	exón 15			
Gallardo <i>et al</i> , 2004 [27]	Chilena	BRCA1	3936C>T	exón 11
Tomassi <i>et al</i> , 2005 [28]	Caucásica Italiana	BRCA1	5382insC	exón 20
			4566delA	exón 14

Las mutaciones en el gen BRCA 2 se han encontrado en menos del 5% de los casos de CM y han resultado más frecuentes en los casos de CM en hombres. Sin embargo, la prevalencia en población en general para este tipo de variaciones es desconocida [29-30].

Si bien los genes BRCA<sub>s</sub> cobran importancia en la aparición del CM hereditario, éste únicamente abarca el 5 al 10% de los casos. Así mismo, son las causantes únicamente de entre el 15 y el 35% de los casos hereditarios, lo que dice que estos genes, aunque sí conducen fuertemente al desarrollo de esta enfermedad, sólo son responsables de aproximadamente el 5% del total de los casos de CM. Por lo que las investigaciones recientes se han orientado a la búsqueda de otros genes que puedan ayudar a dilucidar el origen del otro 95% de los casos de esta neoplasia.

#### **1.4.1.2 Genes recientemente asociados a CM.**

En estudios GWAS o pangénomicos, se han buscado genes que confieran mayor susceptibilidad al desarrollo del CM o que presenten un efecto protector en contra de éste. Se han analizado diversos genes y sus polimorfismos, destacando entre ellos la asociación documentada entre los SNPs del gen del Receptor 2 del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGFR2) (rs1219648, rs2420946, rs11200014, rs2981579, rs7895676 y rs313578.) y el desarrollo de CM [31-35]. Este gen, por relacionarse a un factor de crecimiento, juega un papel importante en proliferación celular, invasión celular y angiogénesis. De manera interesante, las mutaciones de este gen asociadas a CM no se localizan en la sección codificante del gen, si no que caen dentro del segundo intrón. Aunque aun no se conoce ciertamente el papel de estas mutaciones, se cree que pudieran jugar un papel en la regulación génica. La genotipificación en los SNPs rs2981582C/T, rs1219648A/G y rs2420946C/T en población china reveló que estos loci incrementan el riesgo relativo de CM en 1.36. Estos SNPs también se han asociado a tumores negativos para receptores de estrógenos (RE) y positivos para progesterona [35]. Distintos haplotipos posibles para estos SNPs han sido asociados con el riesgo de CM en poblaciones judías y árabes, estableciendo que en particular el polimorfismo rs1219648 tiene un mayor peso en el desarrollo del CM [36]. También han sido reportadas variantes en los genes BRCA 1 y BRCA 2 que muestran diferencias en la respuesta a quimioterapia, así como la asociación de estas variantes con el estadio de la enfermedad, como factor pronóstico [37-38]. Otros dos SNPs (rs2228480 y rs3798577) presentes en el gen del Receptor 1 de Estrógenos (ESR1) están altamente asociados con la recaída [39]. Además, se ha reportado que el SNP rs1943779 en el gen de la Metaloproteasa 7 (MMP7) confiere un efecto protector contra metástasis y dos SNPs (rs2981582, rs1219648) en el gen de FGFR2 y uno (rs1420546) en el gen Miembro 3 de

la Familia de Alta Movilidad (TOX3), están relacionados con tumores RE positivos, Además, se ha encontrado que mujeres heterocigotas para el SNP (rs889312) en el gen Proteína Activadora de Mitógeno Quinasa Quinasa Quinasa 1 (MAP3K1), se encuentran libres de metástasis [39].

La utilidad de la detección de SNPs de riesgo en los loci referidos y de mutaciones en los genes BRCA en familias afectadas es de gran valor, ya que permite iniciar con la prevención en las mujeres portadoras de dichas variaciones génicas, lo que se traduce en una mayor sobrevivencia y disminución de las muertes por CM.

## **1.5 Funciones de los genes asociados a CM**

Para comprender mejor el papel que juegan los genes que han sido asociados a esta neoplasia en el desarrollo de la enfermedad, es importante conocer sus funciones.

### **1.5.1 TOX3**

Miembro 3 de la familia de alta movilidad o Gen de la proteína 9 que contiene repeticiones trinucleotídicas (TNRC9). Pertenece a una familia numerosa y diversa de proteínas que funcionan como factores primordiales en la modificación de la estructura de la cromatina por enrollamiento y desenrollamiento del ADN [40].

Esta proteína fue identificada por O'Flaherty, *et al.*, al buscar por medios bioinformáticos al homólogo humano de proteína TOX3 de ratón, la cual llamaron TNCR9. Ellos dedujeron una proteína de 576 aminoácidos con un peso molecular calculado de 63.4 kD. Esta proteína tiene una región central rica en lisinas (señal de localización nuclear) seguida de una caja HMG. TOX3 comparte una gran similitud con la proteína TOX3 del ratón, con la excepción de repeticiones de un trinucleótido (CAG) codificante para glutamina en el extremo carboxilo terminal que no se encuentra en el ratón.

O'Flaherty, *et al.* encontraron que la TOX3 en el ratón se encontraba en el cromosoma 8, dicho cromosoma tiene homología con el 16 en el humano, información que permitió a otros grupos como al encabezado por Stacey *et al.*, [31], establecer que el gen TOX3 humano se encuentra localizado en 16q12.1, comenzando en la posición nucleotídica a 52,471,918 y terminando en la 52,581,714 del brazo largo de dicho cromosoma, con una longitud de 109,797pb y orientación negativa, siendo su no. de acceso del GenBank: NC\_000016.9, NT\_010498.15

### 1.5.1.1 TOX3 y CM

Smid, *et al.* [41], encontraron que TOX3 es uno de los 69 genes que se expresan diferencialmente en pacientes con metástasis de CM hacia hueso, con respecto a metástasis a cualquier otra parte del cuerpo.

En una muestra de 10,358 portadores de mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 de 23 estudios previos, Antoniou, *et al.* [42], encontró una significativa asociación combinada entre CM y el alelo menos frecuente del SNP rs3803662 en el gen TOX3 (OD=1.13,  $p=5 \times 10^{-5}$ ). Los autores concluyeron que este locus interacciona elevando el riesgo para CM, tanto en portadores como en no portadores de mutaciones en los genes BRCA 1 o BRCA 2.

### 1.5.2 MAP3K1

Proteína activada por mitógenos quinasa quinasa quinasa MAP3K o MEK quinasa, es una quinasa serina/treonina que ocupa un papel central en la transducción de señales por fosforilación de enzimas como respuesta celular a estímulos metabólicos y de mitógenos que incluyen a la insulina y factores de crecimiento.

La MAP3K1 activa a ERK y JNK por la fosforilación de MAP2K1 y MAP2K4. Todas estas proteínas son miembros de la ruta de señalización de las quinasas encargada de inducir apoptosis. La MAP3K1 genera señalización antiapoptótica como proteína completa, sin embargo si es cortada por la vía de las caspasas, induce apoptosis.

Para poder conocer la estructura de la proteína, Xia, *et al.* [43], clonaron el transcrito de la MAP3K1 humana a partir de librerías de cADN de células HeLa, linfocitos B y Jurkat. Ellos dedujeron una proteína de 1,495 aminoácidos con un dominio catalítico en el carboxilo terminal y homología de un 83% con la MAP3K1 del ratón.

Con el fin de ubicar la localización del gen de esta proteína, Vinik *et al.* [44], identificaron polimorfismos en las secuencias homólogas de ADN del gen de la MAP3K1 entre el ratón y el humano en las regiones intrónicas y en el extremo 3' no traducible. Utilizando polimorfismos específicos de alelo, mapearon el gen al cromosoma 13 del ratón. Y el gen humano fue mapeado al cromosoma 5 (5q11.2) por análisis de células somáticas híbridas.

El gen contiene 81,080 pb, tiene orientación positiva. En el 2010 Pearlman [45], *et al.*, analizaron la secuencia en herramientas bioinformáticas, identificando que el gen

contiene 20 exones. La proteína completa es de 1,512 aminoácidos, con un tamaño de 164,470 Da y con dependencia al magnesio como cofactor.

### 1.5.2.1 MAP3K1 y cáncer de mama

Easton, *et al.* [19], identificaron que el SNP A/C (rs889312) en el gen MAP3K1 está significativamente asociado con CM ( $p=7 \times 10^{-20}$ ), en un estudio GWAS de tres etapas con 22,848 casos de 22 estudios previos. Ellos encontraron que este alelo es común en población de Inglaterra y que confiere un riesgo incrementado de padecer la enfermedad y que en combinación con otros alelos de susceptibilidad, este SNP puede volverse de importancia clínica.

En el análisis realizado por Antoniou, *et al.* [42], en el que emplearon información de 23 estudios previos, no se encontró asociación entre el SNP rs889312 y el riesgo aumentado de CM. Sin embargo, cuando el grupo es estratificado, las portadoras de mutaciones en el gen BRCA2, quienes además poseen el alelo variante para el SNP, tienen significativamente incrementado el riesgo (OD=1.12,  $p=0.02$ ), por lo que los autores concluyen que este locus actúa elevando el riesgo de CM en portadores de mutaciones en el gen BRCA2.

### 1.5.3 MMP7

Las proteínas de la familia de las metalopeptidasas de matriz (MMP) están involucradas en la desintegración de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, reproducción, y remodelación de tejidos, así como en procesos de enfermedad, como artritis y metástasis. La mayoría de las MMPs son secretadas como proproteínas que son activadas al ser cortadas por las proteinasas extracelulares. La enzima codificada por este gen degrada proteoglicanos, fibronectina, elastina y caseína. Y difiere de la mayoría de las MMPs en la pérdida de un dominio C-terminal conservado en el resto de la familia proteica. La enzima esta involucrada en la cicatrización y estudios en ratones sugieren que esta proteína regula la actividad defensiva de la mucosa intestinal.

El gen de la metalopeptidasa 7 (MMP7) fue identificado a través de estudios con metaloproteinasas producidas por tumores capaces de degradar tejido conectivo agregado con colagenasa. Muller, *et al.*, encontraron que la MMP7 consta de 267



aminoácidos, pesa 29677 Da y tiene dos sitios de unión para iones de calcio y otros dos para iones de zinc por subunidad. [46].

Las metaloproteinasas de matriz son enzimas involucradas en procesos normales y patológicos de remodelación de tejido. Gaire, *et al.*, compararon la estructura y expresión normal de la MMP7 con aquellas otras miembros de la familia de las metaloproteinasas, encontrando que ésta ha perdido un dominio C terminal conservado entre los miembros de esta familia proteica. [47]

Las metaloproteasas de matriz, también llamadas matrixinas, son endopeptidasas dependientes de zinc y son las principales proteasas involucradas en la degradación de la matriz extracelular. Las MMPs son capaces de degradar un amplio rango de moléculas extracelulares y algunas moléculas bioactivas.

La actividad de las MMPs está regulada por dos inhibidores endógenos: alfa2-macroglobulina e inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs). Las MMPs desempeñan un rol central en proliferación celular, diferenciación, angiogénesis y apoptosis. La desregulación de estas proteínas ha sido implicada en muchas enfermedades, incluyendo artritis, úlceras crónicas, encefalomiелitis y cáncer.

El gen de la MMP7 es parte de un conglomerado de genes de MMP que se localizan en el cromosoma 11q21-q22. El gen tiene una longitud de 10,246pb y orientación negativa [48], siendo su no. de acceso a las secuencias en el Gen Bank: NC\_000011.9, NT\_033899.8

### **1.5.3.1 MMP7 y CM**

La metástasis del cáncer es un proceso en el que las células del tumor se diseminan a partir de un tumor primario a otros órganos o tejidos distantes. Uno de los primeros pasos en el proceso de la metástasis es la degradación de la membrana basal, proceso en el que están implicadas las MMPs. Estas son secretadas por los propios tumores o por las células estromales circundantes estimuladas por la cercanía del tumor.

Numerosos estudios han relacionado a la expresión alterada de las MMP en diferentes tumores mamarios de pobre pronóstico. MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13 y -14 elevan su expresión tanto en tumores primarios como en metástasis. Inhibidores sintéticos o naturales de las MMPs provocan la inhibición de la metástasis, cuando la desregulación de las MMPs conduce a la invasión de células cancerígenas.

#### **1.5.4 ESR1 (Receptor de Estrógenos 1, Receptor de Estradiol)**

Este gen codifica para un receptor de estrógenos. Las hormonas esteroideas y sus receptores están involucradas en la regulación de la expresión génica en células eucariotas y afectan la proliferación y diferenciación celular en tejidos específicos.

El ESR1 es un factor de transcripción activado por ligando (el propio estrógeno) compuesto por muchos dominios importantes para la unión a hormonas, al ADN y de activación de la transcripción. La proteína se localiza en el núcleo de la célula, donde forma un homodímero o un heterodímero con el receptor de estrógenos 2. Los estrógenos y sus receptores son esenciales para el desarrollo sexual y las funciones reproductivas, pero además tienen un papel importante en muchos tejidos como el hueso.

Los estrógenos controlan muchos procesos celulares incluyendo crecimiento, diferenciación y función del sistema reproductor. Los principales blancos de los estrógenos son en las mujeres los ovarios, útero, vagina y glándulas mamarias, mientras que en hombres los testículos, próstata y epidídimo. Los estrógenos también son responsables del crecimiento y mantenimiento del esqueleto, así como del funcionamiento normal de los sistemas cardiovascular y nervioso. Los estrógenos realizan la mayoría de su acción vía sus receptores (RE). Estos receptores pertenecen a una superfamilia de receptores hormonales. Hoy en día, se conocen dos receptores de estrógenos RE alfa y RE beta. Existe una alta similitud entre ambos receptores, especialmente en los dominios de unión a ADN y ligando, mientras que la mayor divergencia entre estos existe en el extremo N-terminal, que corresponde al dominio de transactivación. Los dos receptores interactúan con el mismo elemento de respuesta de ADN y muestran un patrón similar de unión al ligando. Al unírsele el ligando, el receptor sufre un cambio conformacional, permitiendo la dimerización espontánea, ya sea en homo o heterodímeros. Como dímero, el receptor de estrógenos se une al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora de los genes blanco. RE alfa y RE beta se encuentran presentes en un amplio espectro de tejidos.

El gen del ESR1 se encuentra en el cromosoma 6q25.1, esta conformado por 472,929pb, es de orientación positiva y tiene no. de acceso en GENBANK: NC\_000006.11, NT\_025741.15

El “splicing” alternativo resulta en algunas variantes, que difieren en la 5’ UTRs y en el uso de distintos promotores.

#### 1.5.4.1 ESR1 y CM

McGuire, *et al.*, descubrieron que la abundancia relativa del mRNA del receptor de estrógenos varía en tejidos con CM. Identificaron también inserciones, deleciones y cambios nucleotídicos, así como “splicing” alternativo con pérdida de los exones 3, 5 o 7. Empleando ensayos de transactivación en levaduras descubrieron dos receptores con función alterada. El primero de ellos permanece activo sin necesidad de estrógenos presentes, y el otro, por el contrario, es transcripcionalmente inactivo, lo que evita la acción normal del receptor de estrógenos. Ellos concluyeron que estas variantes podrían tener importantes implicaciones clínicas, ayudando a explicar el comportamiento de tumores mamarios.

Es conocido que la presencia de receptores de estrógenos identifica a aquellas pacientes de CM con bajo riesgo de recaída y mejor pronóstico de supervivencia, por lo que el análisis de RE se ha convertido en un ensayo de rutina en el manejo clínico del CM. El estado de los receptores también provee de una referencia para identificar a aquellos tumores que responderán a tratamientos de terapia anti-hormonal. Sin embargo, únicamente la mitad de las pacientes RE positivas responden a esta terapia y lo hacen desde el inicio del tratamiento. Sluysers and Mester [49], hipotetizaron que la pérdida de dependencia hormonal de algunos tipos de CM, puede deberse a la presencia de receptores esteroideos mutados o trancos que son capaces de activar la transcripción en ausencia de las hormonas. Esto se corroboró por Scott, *et al.* [50], quienes encontraron en biopsias de CM formas de RE con el dominio de unión a ADN truncado.

Se han realizado numerosos estudios tratando de esclarecer completamente el papel del RE en el desarrollo de CM, sin embargo, algunos de ellos se contraponen, dado que el CM es una enfermedad sumamente compleja y que entre diferentes pacientes el origen y funcionamiento de las células tumorales pueden ser completamente distintos.

## JUSTIFICACIÓN

Además de los genes *BRCAs*, existen otros genes relacionados al CM que pudieran explicar cerca del 90% de los casos. Estudios de asociación genómica amplia han evidenciado la utilidad diagnóstica de estos genes en diversas poblaciones y etnias. Sin embargo, casi todos se han llevado a cabo en poblaciones caucásicas, las que poseen una estructura poblacional distinta de la población mestiza mexicana y latinoamericana. El grado de componente ancestral europeo en pacientes latinas se relaciona con un riesgo incrementado de CM [51], lo que sugiere la presencia de variaciones genéticas posiblemente vinculadas con el desarrollo de esta enfermedad. En México, el CM es un grave problema de salud pública que se incrementa año con año, por lo que es importante fortalecer la investigación que permita la identificación de los SNPs en todos los genes que se han asociado al CM presentes en la población mexicana en general, y para el caso de nuestro interés, la del Noreste de México en particular.

Por lo anterior, en este estudio se realizó la genotipificación de SNPs de los siguientes genes relacionados a la predisposición a CM: *FGFR2* (rs1219648, rs11200014), *TOX3* (rs3803662), *ESR1* (rs2228480 y rs3798577), *MAP3K* (rs1943779) y *MMP7* (rs1943779), los cuales no habían sido estudiados en mujeres mexicanas. Ello buscando identificar patrones en variaciones genéticas o “firmas moleculares”, que permitan predecir el riesgo a CM y en apoyo al área clínica con miras a sustentar una medicina preventiva personalizada, que permita un mejor combate a este grave problema de salud pública de nuestro país.

## CAPITULO II: OBJETIVOS

### Objetivo general

Investigar la presencia y utilidad pronóstica de SNPs en genes asociados al riesgo de desarrollar CM en pacientes del Noreste de México.

### Objetivos particulares

1. **Generar un banco de ADN y datos relevantes de pacientes con CM.** El primero a partir de sangre periférica de pacientes diagnosticadas con CM del noreste de México y los segundos concentrando información demográfica y epidemiológica relevante de éstas.
  
2. **Rastrear en los bioespecímenes SNPs en genes asociados al CM:**
  - a) Gen ERS1: rs2228480 y rs3798577.
  - b) Gen MMP7: rs1943779.
  - c) Gen MAP3K1: rs889312.
  - d) Gen TOX3: rs3803662.
  - e) Gen FGFR2: rs11200014 y rs1219648.
  
2. **Evaluar el valor para el diagnóstico de los SNPs analizados:** Probar posibles asociaciones entre los genotipos de los SNPs de las pacientes, con el comportamiento de su enfermedad, antecedentes familiares, demografía y datos epidemiológicos

## **CAPITULO III: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Diseño del estudio**

La presente investigación fue diseñada como un estudio de casos y controles, transversal y observacional.

### **3.2 Lugar de realización del estudio**

El mismo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología Médica (UBM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, en conjunto con las siguientes instituciones:

- Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
  - Centro Universitario contra el Cáncer
  - Servicio de Cirugía General
- Clínica Opción Oncología
- Fundación CIMAB
- Clínica 25 del IMSS

### **3.3 Sujetos de estudio.**

Este protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Ética de la Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina, con número de registro: BI10-002 [Anexo 1].

Para su realización se llevó a cabo la recolección de muestras de dos grupos; 1) pacientes diagnosticadas con CM que estuvieran recibiendo su tratamiento en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio Gonzalez” o en la clínica de especialidades número 25 del IMSS. 2) mujeres sin diagnóstico de CM pareadas por edad con las pacientes. A cada mujer se le invitó a participar en el estudio, se le ofreció información detallada oral y escrita acerca del protocolo y se respondieron todas sus dudas. Se llenó una encuesta con las siguientes variables, tanto de las pacientes como de las controles: edad, talla, peso, consumo de anticonceptivos orales, alcohol y tabaco, edades de menarquía y menopausia, paridad, lactancia y exposición a radiación. Adicionalmente a

esta información, se registró también información clínica como: edad al diagnóstico de la enfermedad, lado del cáncer, estado de receptores hormonales, tratamientos, recaídas, otros datos epidemiológicos y otros datos clínicos [Anexo 2]. Sí accedían a participar, tanto de las pacientes como de las voluntarias, se recabó la firma de la carta de Consentimiento Informado de cada una de ellas [Anexo 3] y se procedió a realizar la toma de muestra. Las muestras fueron recolectadas (sangre periférica con EDTA como anticoagulante) de dos grupos de estudio: Grupo 1 (casos), pacientes con diagnóstico de CM; Grupo 2 (controles), mujeres voluntarias sin CM que aceptaron donar sangre y proporcionar información. A cada participante se le tomaron 3 mL de sangre venosa periférica en tubos con EDTA y en caso de ser sometidas a cirugía para remoción del tumor, se les solicitó al cirujano tratante una pequeña porción del mismo. Las muestras fueron transportadas a la UBM donde fueron ingresadas al Biobanco, fraccionándolas en alícuotas con el fin de generar un almacén de bioespecímenes de las pacientes del estudio. A la vez, se generó un archivo electrónico con los datos relevantes de cada paciente y voluntaria, siendo excluidas aquellas pacientes cuyas muestras rindieron ADN insuficiente o de mala calidad.

### 3.4 Criterios de selección de la muestra

#### 3.4.1 Criterios de Inclusión

	Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión	Criterios de Eliminación
Grupo 1 (Casos)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pacientes femeninas que acepten participar en el estudio.</li> <li>2. Mayores de 18 años.</li> <li>3. Con diagnóstico confirmado de CM.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menores de 18 años.</li> <li>2. Pacientes embarazadas.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Decisión propia de abandonar el estudio.</li> </ol>
Grupo 2 (controles)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mujeres también mayores de edad que voluntariamente acepten participar donando sangre y sus datos.</li> <li>2. Sin diagnóstico de CM.</li> </ol>		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Diagnóstico de CM posterior al reclutamiento.</li> <li>2. Decisión propia de abandonar el estudio.</li> </ol>

### 3.5 Material y Reactivos

#### 3.5.1 Material

Los materiales especializados fueron los siguientes:

- Tubos vacutainer lilas con EDTA como anticoagulante, marca BD (Cat. 367841)
- Agujas de colecta múltiple, marca BD (Cat. 367214)
- Holder o adaptador para agujas “Standard”, marca BD (Cat. 364888)
- Tubos cónicos de 15mL, marca corning (Cat. 430790)
- Puntillas para micropipetas de 10, 100 y 1000 $\mu$ L, marca Sorenson (Cat. 37650, 10590, 10040)
- Tubos para PCR, marca Axygen (Cat. PCR-02D-A)
- Placas para PCR tiempo real, marca Applied (Cat. 4306737)
- Cubiertas autoadheribles ópticas para PCR tiempo real, marca Appied (Cat. 4313663)

#### 3.5.2 Reactivos:

Los reactivos especializados fueron los siguientes:

- Fenol
- Cloroformo
- Alcohol Isoamílico
- Etanol al 96%
- Tris-Base
- EDTA
- Agarosa
- Enzima DNA. Polimerasa Taq
- Enzimas de restriccion de la casa comercial New England Biolabs (*ScaI*, *NlaIII*, *BtgI*, *BpuI*, y *HpyCHIV*, con los No. Cat. R0122L, R0125L, R0125L, R0649L y R0619L, respectivamente)
- TaqMan Universal Master Mix II, marca Applied Biosystems (cat. 4440038)
- Sondas TaqMan Genotyping Assays, marca Applied Biosystems (cat. C\_29171314\_20, C\_2917305\_10, C\_31019228\_10, C\_15885469\_10)



### **3.5.3 Equipos:**

Los equipos especializados fueron los siguientes:

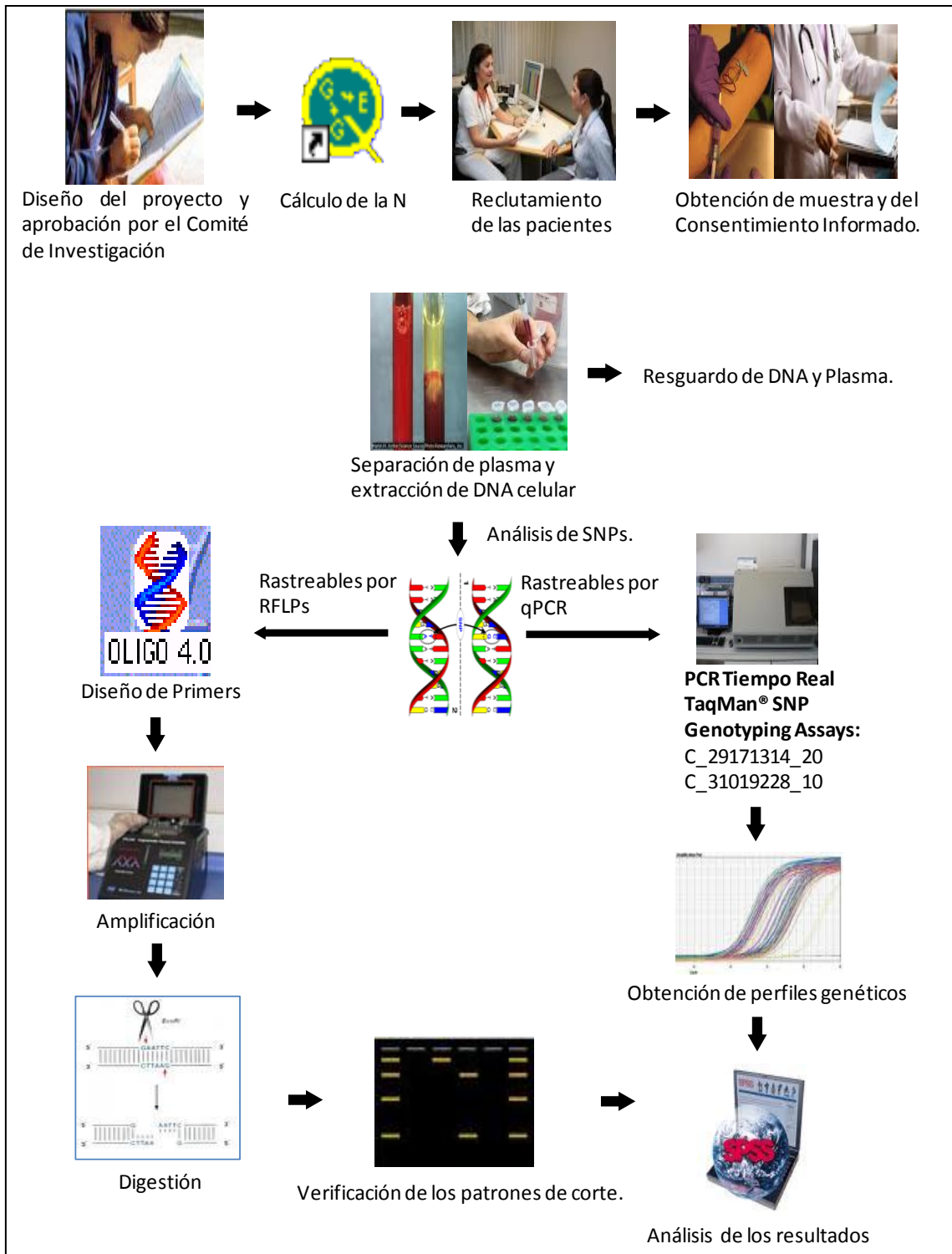
- a. Termociclador Veriti, marca Applied Biosystems (No Cat. 4375305)
- b. Cámara de electroforesis VWR (No. Cat. 27373-200)
- c. Fotodocumentador Gel Doc 1000 (No. Cat. 400- 0065)
- d. Incubadora 1535 de Sheldom manufacturing, Inc, USA. (No. Cat. 5130518)
- e. Termociclador de tiempo real 7900HT Fast, marca Applied biosystems. (No. Cat. 4329001)

### **3.6 Estrategia General**

En la figura 19 se esquemática el procedimiento experimental implementado para la genotipificación de alelos, de los genes de interés. El cual comprende desde el diseño, sometimiento y aprobación del proyecto al comité de ética, seguido por la invitación de voluntarias a participar en el estudio, así como la obtención de las muestras donadas y la recolección de los datos personales y epidemiológicos, dichas muestras fueron sometidas a centrifugación para la separación del plasma, el cual fue almacenado a -80°C, de la sangre total se extrajo el ADN por el método modificado de TSNT. El ADN se cuantificó se apartó una alícuota de trabajo y resto fue almacenado a -80°C.

Los SNPs de interés fueron analizados por RFLPs en los que el polimorfismo altera el patrón de corte con enzimas de restricción y por PCR tiempo real en las que el patrón de corte no se modificara por el polimorfismo.

Los resultados fueron analizados en el paquete estadístico SPSS para encontrar las posibles asociaciones entre los polimorfismos y el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 19. Estrategia general seguida en este estudio.** Se realizó la toma de muestras en las voluntarias, seguida de la extracción de ADN y el análisis de SNPs por las técnicas de RFLPs y qPCR.

### 3.7 Cálculo del tamaño de muestra

Se calculó el tamaño de la muestra con ayuda del programa estadístico Quanto, para lo cual se realizó una prueba piloto con el objetivo de inferir la frecuencia de los SNPs de interés en la población en general, recurriendo a rastrearlos en el ADN de 113 estudiantes de la Facultad de Enfermería de la UANL. En dichas muestras se identificaron los SNPs presentes y con la información de dicha prueba y definiendo a los SNPs mediante un modelo aditivo se obtuvieron los siguientes valores:

SNP	No. de pacientes
rs1943779	279
rs889312	196
rs2228480	213
rs3798577	201
rs3803662	200

Estableciendo para este trabajo un número de pacientes de 300 y lográndose coleccionar un total de 200 controles.

### 3.8 Extracción de ADN

De cada mujer incluida en el estudio se obtuvo una muestra de sangre periférica venosa en tubos con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron mantenidas y transportadas inmediatamente en refrigeración para garantizar su preservación. Una vez en el área del Biobanco, fueron procesadas con buenas prácticas de laboratorio para evitar cualquier tipo de contaminación y una vez satisfechos los criterios de calidad.

El plasma se separó por centrifugación (10min a 5rpm) y se repartió en fracciones de 500 $\mu$ L en tubos de 1.5mL, almacenándolas a -20°C.

El ADN se extrajo de sangre total por la técnica de TSNT [52], modificada incorporándole una doble extracción con fenol y cloroformo para incrementar la calidad del ADN obtenido [Anexo 4]. El ADN purificado se resuspendió en buffer TE (10mM de Tris-HCl, pH 8 y 0.1mM de EDTA). El ADN se cuantificó, se hizo una alícuota de trabajo a una concentración de 100ng/ $\mu$ L. Y el resto se etiquetó con la clave de la muestra, la fecha de extracción y la concentración.

### **3.8.1 Protocolo para la extracción de ADN de alta calidad con TSNT a partir 3 ml de sangre.**

1. Coloque 3 ml de la sangre en un tubo cónico de 15 ml.
2. Agregue 1.2ml de buffer de lisis TSNT y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
3. Agregue 3 ml de fenol saturado y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
4. Agregue 0.6 ml de sevag y mezcle en vórtex a velocidad baja o media durante 1 minuto.
5. Agregue 2 ml de TE 1X y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
6. Centrifugue 20 min a 10 000 rpm.
7. Transfiera la fase acuosa a un tubo cónico de 15 ml.
8. Agregue 2 ml de fenol saturado y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
9. Agregue 0.6 ml de sevag y mezcle en vórtex a velocidad baja o media durante 1 minuto.
10. Centrifugue 20 min a 10 000 rpm.
11. Transfiera la fase acuosa a un tubo cónico de 15 ml.
12. Agregue 1 volumen de isopropanol y mezcle gentilmente por inversión.
13. Transferir la hebra con 500 de sobrenadante a tubos eppendorf de 1.5ml.
14. Centrifugue 8 min a 14 000 rpm y decante el sobrenadante.
15. Lave la pastilla agregando 1ml de etanol al 70%.
16. Centrifugue 8 min a 14 000 rpm.
17. Secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente de 20 min.
18. Resuspenda la pastilla en 200µl de TE 1X.

### **3.9 Generación del Biobanco-archivo electrónico.**

Las muestras de ADN, suero y plasma se dividieron en alícuotas y se conservaron a -20°C. La infraestructura de Biobanco incluye un área con el sistema de cómputo especializado en almacenaje de información. A cada participante se le asignó un registro en el archivo electrónico, en donde se almacenó toda la información relevante generada en la hoja de recolección de datos, así como con una clave de seguridad para garantizar la confidencialidad de los datos de identidad. La información se almacenó en la UBM en archivos confidenciales a los cuales sólo tienen acceso los encargados de los protocolos y los responsables del biobanco.

### **3.10 Detección de genes de predicción del riesgo en CM**

A todas las muestras incluídas en este estudio, tanto de pacientes como de controles, se les realizaron pruebas de genotipificación de SNPs de genes relacionados en estudios previos como asociados al CM. Los polimorfismos analizados incluyeron aquellos en los siguientes genes: 1) TOX3: rs3803662; 2) ESR1: rs2228480 y rs3798577; 3) MMP7: rs1943779; 4) MAP3K1: rs889312 y 5) FGFR2: rs1219648 y rs11200014.

Para realizar la genotipificación de los SNPs de interés, se decidió emplear dos técnicas; primeramente RFLPs por su sencillez y facilidad, sin embargo debido a que en los SNPs en el gen FGFR2 (rs1219648, rs11200014), el alelo variante no altera el patrón de corte por alguna enzima de restricción, fue necesario emplear otra técnica, por lo que se optó PCR tiempo real (qPCR).

#### **3.10.1 Diseño de primers**

Los polimorfismos de los genes 1) TOX3: rs3803662; 2) ESR1: rs2228480 y rs3798577; 3) MMP7: rs1943779; 4) MAP3K1: rs889312, fueron analizados por la técnica de RFLPs. Para diseñar los iniciadores específicos que flanquearon cada una de los sitios donde se ubican los polimorfismos de interés, se descargaron del GenBank las secuencias nucleotídicas de los genes incluidos en el estudio. A dichas secuencias se puede acceder con los números de acceso: NC\_000006.11, NC\_000005.9, NC\_000011.9, NC\_000016.9 para los genes ESR1, MP3K1, MMP7 y TOX3,

respectivamente. Se ubicaron las posiciones de los polimorfismos en las secuencias obtenidas de las bases de datos. Con ayuda del programa OLIGO 4.0, los oligonucleótidos fueron diseñados flanqueando a los polimorfismos.

Las secuencias amplificadas se muestran a continuación, marcando en verde el sitio de alineamiento de los oligonucleotidos y en rojo la ubicación del polimorfismo. La secuencia de los primers diseñados se muestra resaltada dentro de las secuencias nucleotídicas de interés a continuación y en el cuadro 4.

#### Gen ESR1 polimorfismo rs2228480 (A>G)

GACCTGCTGCTGGAGATGCTGGACGCCACCGCCTACATGCGCCACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTGG  
 AGGAGACGGACCAAAGCCACTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCATTCCCTTGCAAAGTATTACAT  
 CACGGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACGCTCTGAGAGCTCCCTGGCTCCCACACGGTTCAGATAATC  
 CCTGCTGCATTTTACCCTCATCATGCACCACCTTTAGCCAAATTTCTGTCTCCTGCATACACTCCGGCATGC  
 ATCCAACACCAATGGCTTTCTAGATGAGTGGCCATTCATTTGCTTGCTCAGTTCTTAGTGGCACATCTTC  
 TGTCTTCTGTTGGGAACAGCCAAAGGGATTCCAAGGCTAAATCTTTGTAACAGCTCTCTTCCCCCTTGC  
 TATGTTACTAAGCGTGAGGATTCCCGTAGCTCTTACAGCTGAACCTCAGTCTATGGGTTGGGGCTCAGAT  
 AA

#### Gen ESR1 polimorfismo rs3798577 (C>T)

TGGACCTATGGAGAGCAGCAAGTTGATCTTAGTTAAGTCTCCCTATATGAGGGATAAGTTCCTGATTTTT  
 GTTTTTATTTTTGTGTTACAAAAGAAAGCCCTCCCTCCCTGAACTTGCAGTAAGGTCAGCTTCAGGACCT  
 GTTCCAGTGGGCACTGTACTTGGATCTTCCCGGCGTGTGTGTGCCCTTACACAGGGGTGAACCTGTTCACTG  
 TGGTGTATGCATGATGAGGGTAAATGGTAGTTGAAAGGAGCAGGGGCCCTGGTGTTCATTTAGCCCTGGG  
 GCATGGAGCTGAACAGTACGTGTGCAGGATTGTTGTGGCTACTAGAGAACAAGAGGGAAAGTAGGGCAGA  
 AACTGGATACAGTCTGAGGCACAACCAGACTTGCTCAGGGT

#### Gen MAP3K1 polimorfismo rs889312 (C>A)

TTAGAGGGCACGAAATGAAACACCCTACAAACGCTTCGCTTTGGGCAGTGTGTTTTCCCTCTGCTAGGGCC  
 TGGGTCCTTAGCATTCCAGTCTGGGGTGGCTTGTAGCTTTGTGGTGCAGTTTGTATAGATTAAGCTAATT  
 TTGGAGGACACAGGCATCAATTATTTCTTTCCAAAATAGAATTGTGCTTAATCAATTACATGTCACCTCCA  
 ATGCAAAATCTTCCCTTGCTTACTTTTTGGTCAATTCGATGGCCATCTGTTTTACCAACCTGGATTTCTTAC  
 TCATCACACAAGTCAGGCCCCATTACTTGAGATGATCTCTGAGATGCCCTGCTGGAGAAAGGATGTGC  
 AAATTAAGAGACTACAAATCAGTTTAAAACTCAACGACTCCTTCCATAAATCTGTGTCCTTAATATTA  
 AAAATCATTTCGAGGTGCTGAAAAGAAAGAG

#### Gen MMP7 polimorfismo rs1943779 (C>T)

CTGTGCTTCAAAAACACTGCTAAGTCTTTTATACACTTAATCTTCTCATTTAATCCTCACCACAACCCTA  
 AGGAAAAGTACTATTTCCATTTTTTCGGATAAGGAAGTTGAATTTTATAAAGGTTAAATATTCAGTCACTG  
 TAACACAGAAGGAATCTAACCAGGGCTGAATAACTCTCCTTTAACCTAATTACAAGTTAAGTCACTGCTGC  
 TCAGATCACCAAAGCAGAAAAATCACACTACAGCAAGAAGAAATCAAAGGTATGAAAAGGAAAGCTATCAG  
 AATCAAAGCATCTGGAACAATGACCTAAATATAATAGCTAAAACCATAAAACTCTTAGGAGAAAATGTAG  
 AAATAAATCTTCGTGACCTTGGATTTGGCAGTTGATTTCTTAGATGTGACACCAAACGCATGAGCAACCAA  
 GGAAAAAATAGATAAATTTGGACTTCATCAAAATTAGAAACCTTTGTGCCCTCAAAGACATTATCAAGAA  
 AGTGAAAGACAACCCACAGAAA

Gen TOX3 polimorfismo rs3803662 (A>G)

AGTCCTGGCTGTTCTGTGATCAAATGCAATTGTTTCCCATTCTTAAGAAACAGAATCTTTATTAGACT  
 CAGTTCTTTTCTGGTTATTTTTACAATTTTATTGTTCTATGGTTATTAATAAATAACATGTCATATAAA  
 TTAAGCCTAGAAACATGGATGTTTATCAAAGAAAGGATTGTCATCCAAAGCACCAACTATGAGAGATATC  
 TATGTGCAATGGTATATAGATCTGTCATAGAAGGGTTAATTATATCTGCCTAATGATTTTCTCTCCTTA  
 ATGCCTCTATAGCTGTCCTTAGCGAAGAATAAACTGTGGACTGACCCCCACCCATTTGCGAAGAAAGT  
 ACTGGGTCTTCAGCTTTTCATTGTTTCAGCCGGTGGTCTTTGTGGACAACACCAGGGGCCCTCCTGCTGAA  
 GACTGTCTGGAC

Cuadro 4. Iniciadores oligonucleotídicos para amplificar regiones génicas de los SNPs de interés.

Gen	SNP	Iniciadores	Amplificación
TOX3	rs3803662	5' AGTCCTGGCTGTTCTGTG 3'	465pb
		5' GTCCAGACAGTCTTCAGCAG 3'	
ESR1	rs2228480	5' GACCTGCTGCTGGAGATG 3'	492pb
		5' TTATCTGAGCCCCAACCC 3'	
	rs3798577	5' TGGACCTATGGAGAGCAGC3'	392pb
		5' ACCCTGAGCAAGTCTGGC 3'	
MMP7	rs1943779	5' CTGTGCTTCAAAAACACTGC 3'	514pb
		5' TTTCTGTGGTTGTCTTTCAC 3'	
MAP3K1	rs889312	5' GTCTGGGGTGGCTTGTAG 3'	577pb
		5' AAAAGGCAGCACAGAACTG 3'	

3.10.2 Selección de enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción que fueron utilizadas se seleccionaron buscando que la base variante estuviera dentro del sitio de corte de la enzima, lo que permitió que existiera un corte diferencial entre los alelos silvestres y mutados. Dichos patrones de corte fueron analizados con ayuda del programa NebCutter 2.0, eligiendo las que se indican en el cuadro 5.

Cuadro 5. Enzimas de restricción para detección de SNPs de riesgo en genes asociados al CM.

Gen	SNP	Amplificación	Enzima	Sitio de reconocimiento	Fragmentos alelo silvestre	Fragmentos alelos mutados	No. Cat.
TOX3	rs3803662	465pb	Bpu10I	CCTNAGC	298, 167	NC	R0649S
ESR1	rs2228480	494pb	BtgI	CCRYGG	325, 102, 51, 14	427, 51, 14	R0608S
	rs3798577	394pb	Scal	AGTACT	297, 95	NC	R0122S
MMP7	rs1943779	514pb	HpyCH4IV	ACGT	328, 184	NC	R0619S
MAP3K1	rs889312	577pb	NlaIII	CATG	421, 114, 42	276, 145, 114, 42	R0125S

NC: No genera corte.



### 3.10.3 Amplificación por PCR de los polimorfismos.

Para la amplificación de los polimorfismos estudiados por RFLPs, se realizó la estandarización de la PCR, la cual incluyó gradiente de temperatura de alineamiento (Figura 20). Con éste se logró obtener amplificaciones claras y únicas para cuatro de los polimorfismos a estudiar.

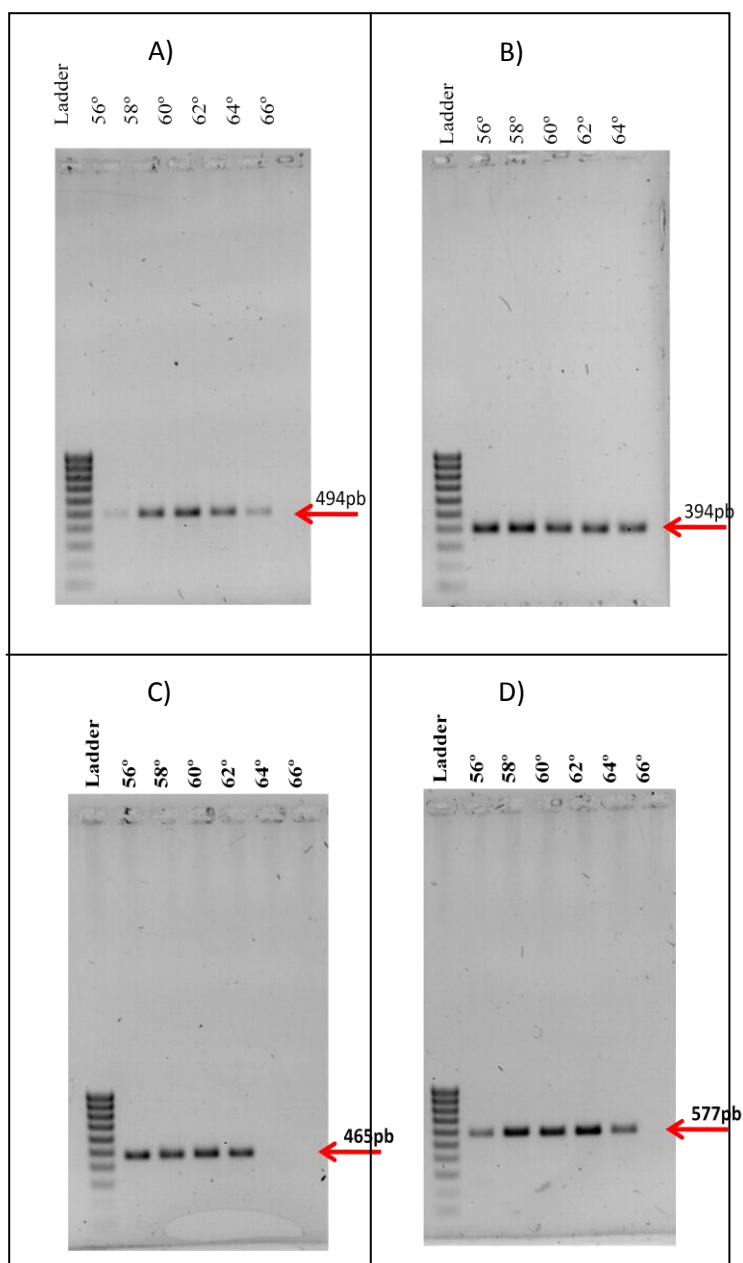


Figura 20. Gradiente de temperatura para a estandarización de PCR. En los cuatro gels mostrados se realizaron gradientes de temperatura con intervalos de 2°C, en un rango de 56 a 66°C. El primer carril en todos los casos es un marcador de peso molecular en escalera de 100pb hasta llegar a 1000pb. A)rs2228480, B)rs3798577, C)rs3803662, D)rs889312.

En el único RFLP restante en el que la señal obtenida fue más débil, se procedió a realizar un gradiente de concentración de cloruro de magnesio (Figura 21), logrando al final amplificaciones exitosas para los cinco polimorfismos del estudio.

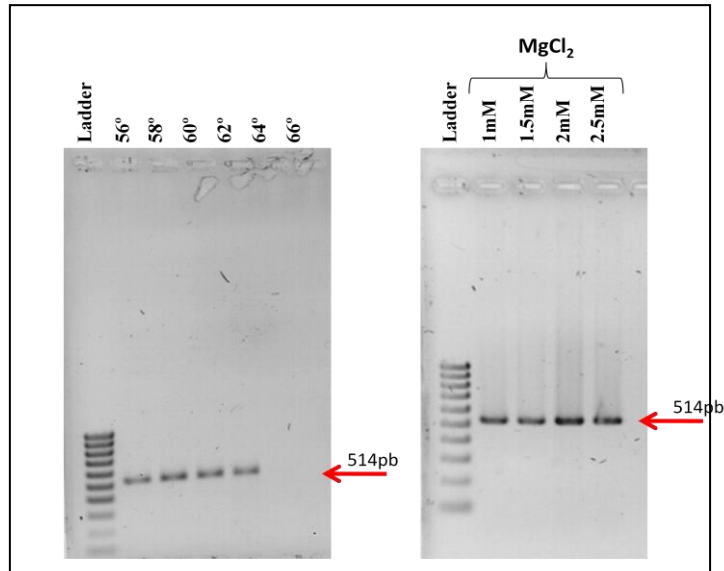


Figura 21. Estandarización de la amplificación del SNP rs1943779. Del lado izquierdo se muestra el gradiente de temperatura con intervalos de 2°C, en un rango de 56 a 66°C. Del lado derecho un gradiente de cloruro de magnesio que va desde 1 hasta 2.5mM. En ambos geles se empleó marcador de peso molecular en escalera de 100pb hasta llegar a 1000pb.

Posteriormente y con el objetivo de emplear lo menos posible de las muestras biológicas, se realizó prueba de distintas cantidades de ADN templado y los resultados de esta prueba se muestran en la figura 22.

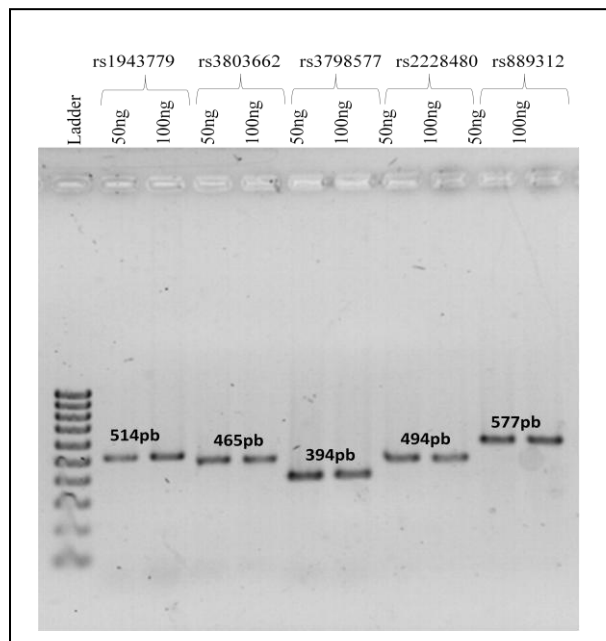


Figura 22. Prueba de cantidad de ADN a utilizar en la PCR. Cada una de las amplificaciones fue probada con 50 y 100ng de ADN templado, logrando amplificar con la menor cantidad de ADN probado.

Al finalizar la estandarización, se establecieron las siguientes condiciones para la genotipificación de estos SNPs.

Condiciones de PCR		Programa de termociclado	
Reactivo	Concentración		
Buffer 10X	1X	94°C	5min.
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	94°C	30seg.
dNTPs	200mM	58/60°C	30seg. 35 ciclos
Primer Forward	200µM	72°C	1min.
Primer Reverse	200µM	72°C	10min.
ADN templado	50ng		

#### 3.10.4 Digestión con enzimas de restricción

Para realizar las digestiones, se utilizaron 10µL del producto de PCR, 1U de enzima de restricción, 2µL de buffer específico para cada enzima (10x) y 1X BSA (100µg/mL), en un volumen total de 20µL. Las digestiones se realizaron a 37°C por 2 horas y se tomó la mitad del volumen para su verificación en geles de agarosa al 2%. El resto de la reacción de restricción se analizó a las 12 horas para verificar que los patrones de heterocigocidad no se debían a digestiones enzimáticas parciales. Se obtuvieron los patrones de acuerdo a lo predicho *in silico*, pudiendo diferenciar perfectamente los tres genotipos posibles: homocigoto normal, heterocigoto y homocigoto variante. En las figuras de la 23 a la 27 se muestran las digestiones obtenidas para cada uno de los SNPs.

- ❖ Gen ESR1: SNP rs2228480, enzima utilizada BtgI, fragmentos generados del alelo normal: 325, 102, 51 y 14pb; del alelo variante: 427, 51, 14pb.

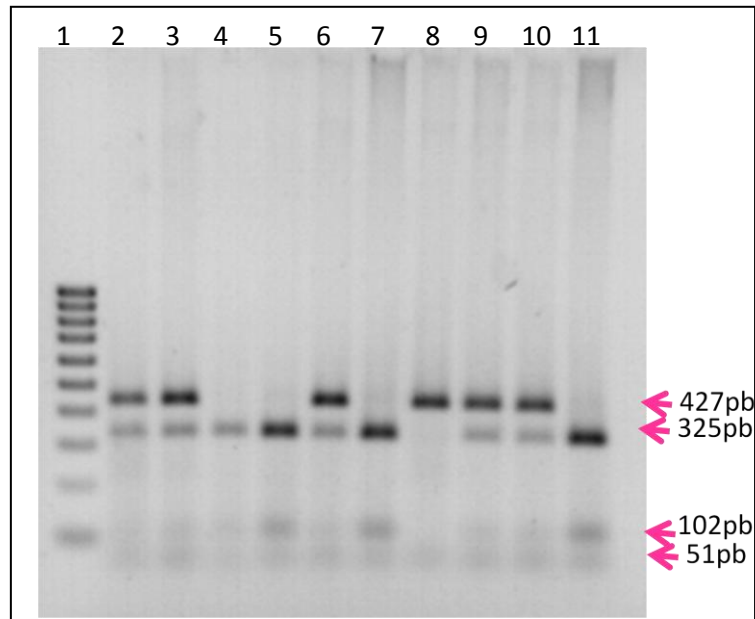


Figura 23. Digestión del SNP rs2228480, 1) marcador de peso molecular en escalera de 100pb hasta llegar a 1000pb 2, 3, 6, 9 y 10) de muestras heterocigotas, 4, 5, 7 y 11) de muestras homocigotas normales y 8) de muestra homocigoto variante.

- ❖ Gen ESR1: SNP rs3798577, enzima utilizada ScaI, fragmentos generados del alelo normal: 297 y 95pb; del alelo variante: no existe corte.

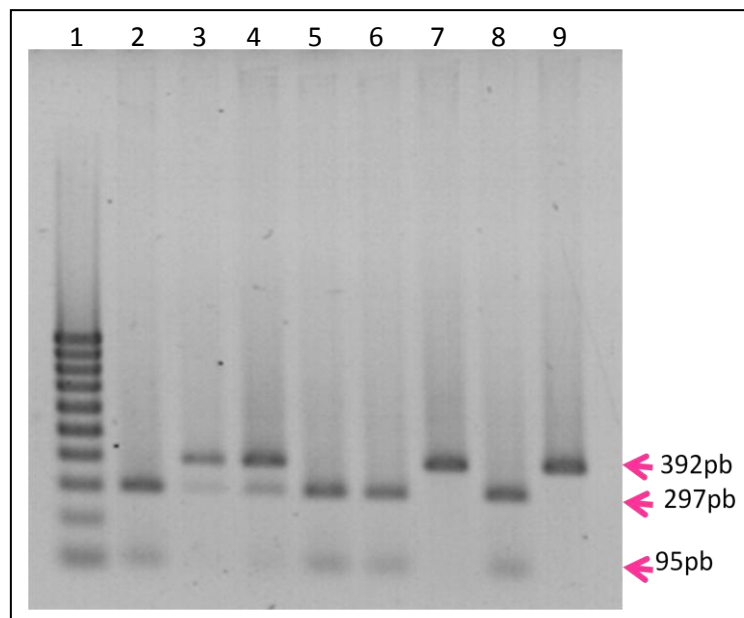


Figura 24. Digestión del SNP rs3798577, 1) marcador de peso molecular en escalera de 100pb hasta llegar a 1000pb, 5, 6 y 8) de muestras homocigotas normales, 3 y 4) de muestras heterocigotas y 2, 7 y 9) de muestra homocigoto variante.

- ❖ Gen MAP3K1: SNP rs889312, enzima utilizada NlaIII, fragmentos generados del alelo normal: 421, 114 y 42pb; del alelo variante: 276, 145, 114 y 42.

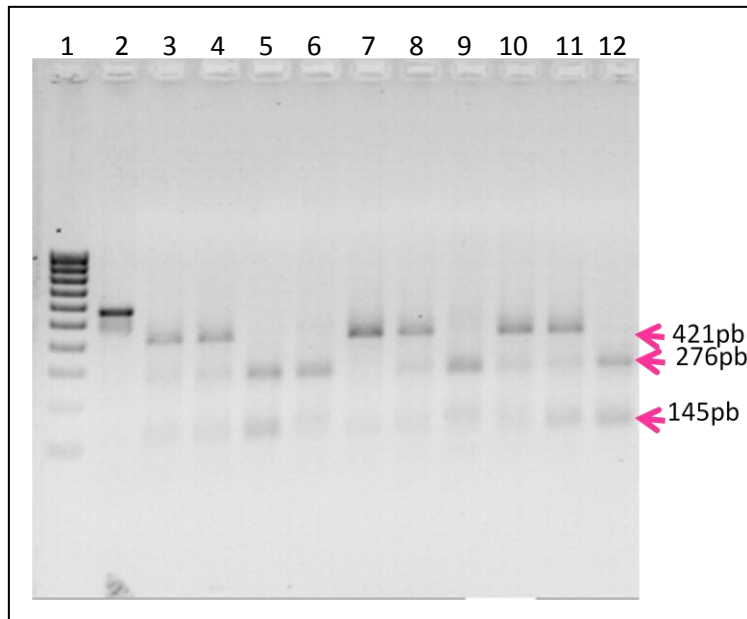


Figura 25. Digestión del SNP rs889312, 1) marcador de peso molecular en escalera de 100pb hasta llegar a 1000pb 2) fragmento sin digerir, 3, 4, 8, 10 y 11) de muestras heterocigotas, 7) de muestra homocigotas normales y 5, 6, 9 y 12) de muestra homocigoto variante.

- ❖ Gen MMP7: SNP rs1943779, enzima utilizada HpyCH4IV, fragmentos generados del alelo normal: 328 y 184pb; del alelo variante: no existe corte.

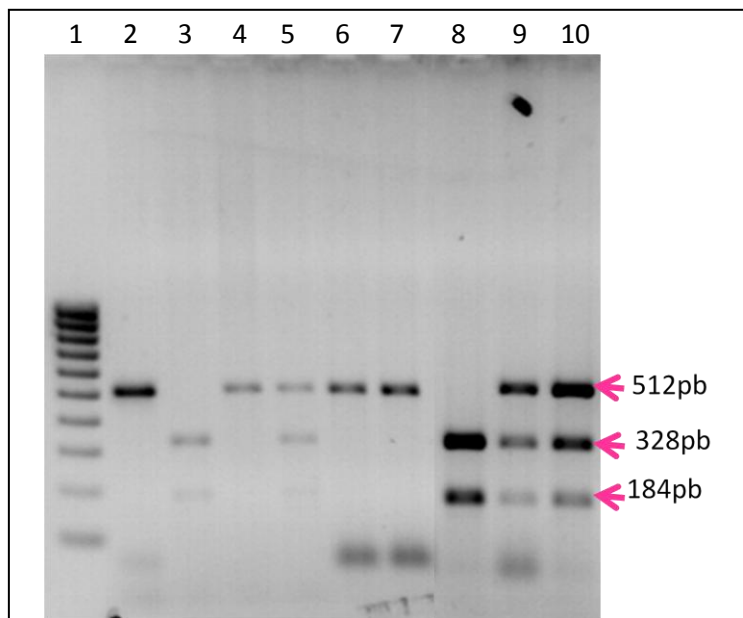


Figura 26. Digestión del SNP rs1943779, 1) marcador de peso molecular en escalera de 100pb hasta llegar a 1000p, 2, 4, 6 y 7) de muestra homocigoto variante, 5, 9 y 10) de muestras heterocigotas y 3 y 8) de muestra homocigotas normales.

- ❖ Gen TOX3: SNP rs3803662, enzima utilizada Bpu10I, fragmentos generados del alelo normal: 298 y 167pb; del alelo variante: no existe corte.

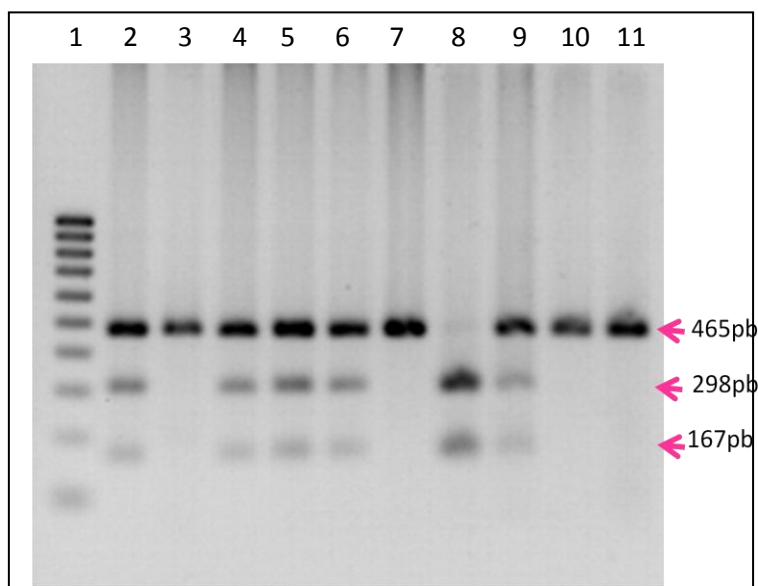


Figura 27. Digestión del SNP rs3803662, 1) marcador de peso molecular en escalera de 100pb hasta llegar a 1000p, 2, 4, 5, 6 y 9) de muestras heterocigotas, 3, 7, 10 y 11) de muestras homocigotas variantes y 8) muestra homocigota normal.

### 3.10.5 Genotipificación por PCR tiempo real.

Debido a que los SNPs en el gen FGFR2 (rs1219648 y rs11200014) no son posibles de detectar por la metodología de RFLPs ya que la variante no altera patrones de corte enzimáticos. La detección dichos polimorfismos se realizó por la metodología TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays [36]. Esta tecnología se eligió por ser altamente sensible y específica, además de obtener los resultados en cortos períodos de tiempo. El diseño para detectar los SNPs de interés (rs1219648 y rs11200014) se encuentran disponibles comercialmente por Applied Biosystem bajo los números de identificación: C\_29171314\_20, C\_2917305\_10, respectivamente.

La detección de los genotipos se realizó utilizando el software del equipo, el cual permite detectar mujeres homocigotas para la ausencia, heterocigotas y homocigotas para la presencia del alelo variante de cada uno de los SNPs de interés (Figura 28). La discriminación entre estos grupos es posible debido a que la reacción de PCR se lleva a cabo en presencia de dos sondas la primera para el alelo normal marcado con el fluorocromo VIC y la segunda para el alelo variante marcada con el fluorocromo FAM, al realizarse la síntesis de cada fragmento de ADN ya sea del alelo normal o variante se libera la fluorescencia de la sonda correspondiente a cada alelo.

Dicha fluorescencia es detectada por equipo, y el software de este agrupa a las muestras según la fluorescencia que emiten, ya sea solo por un fluorocromo indicando homocigocidad, o ambos indicando que la muestra es heterocigota para este SNP. La imagen a continuación nos muestra la ventana de resultados arrojada por el equipo 7900HT Fast, (marca Applied biosystems).

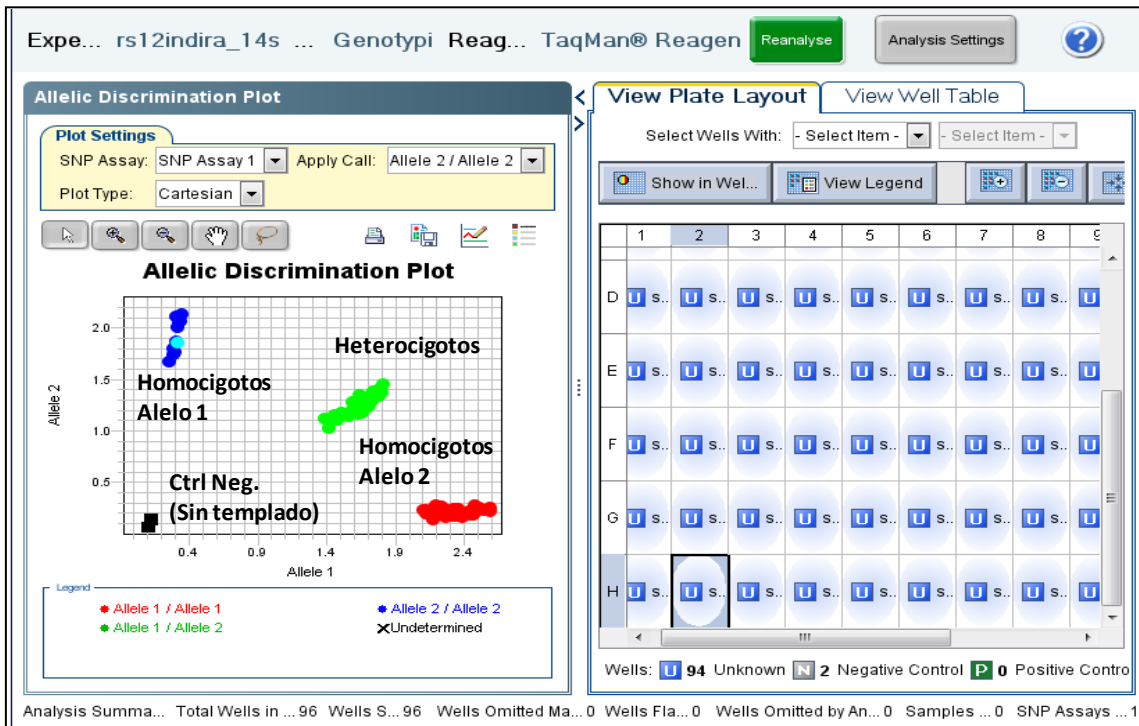


Figura 28. Genotificación por PCR-Tiempo real. Vista de los resultados arrojados por el equipo de PCR-tiempo real, observando la agrupación de los tres genotipos posibles: homocigotos alelo 1 (Normales), homocigotos alelo 2 (variantes) y heterocigotos.

## Capítulo IV. Resultados

### 4.1 Prueba piloto para cálculo de tamaño de muestra

Para llevar a cabo el cálculo del tamaño de muestra de nuestro estudio, se realizó una prueba piloto en la que se incluyeron 113 estudiantes de la Facultad de Enfermería de la UANL a los cuales se les genotificaron los SNPs a analizar por RFLPs. Se decidió analizar en este paso únicamente los SNPs por esta técnica dado que el costo es menor y las frecuencias alélicas de los SNPs a analizar por qPCR están dentro del rango que cubren estos polimorfismos. Esto con la finalidad de conocer la frecuencia de los polimorfismos en población general, dato que es necesario para poder llevar a cabo un estudio de asociación entre variantes genéticas y el desarrollo de cierta enfermedad, en nuestro caso el CM. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Cuadro 6: Frecuencias alélicas (%) prueba piloto.

Frecuencia Alélica					
	rs1943779	rs889312	rs2228480	rs3798577	rs3803662
Alelo Silvestre	25.66	52.21	69.47	46.46	46.90
Alelo Variante	74.34	47.79	30.53	53.54	53.10

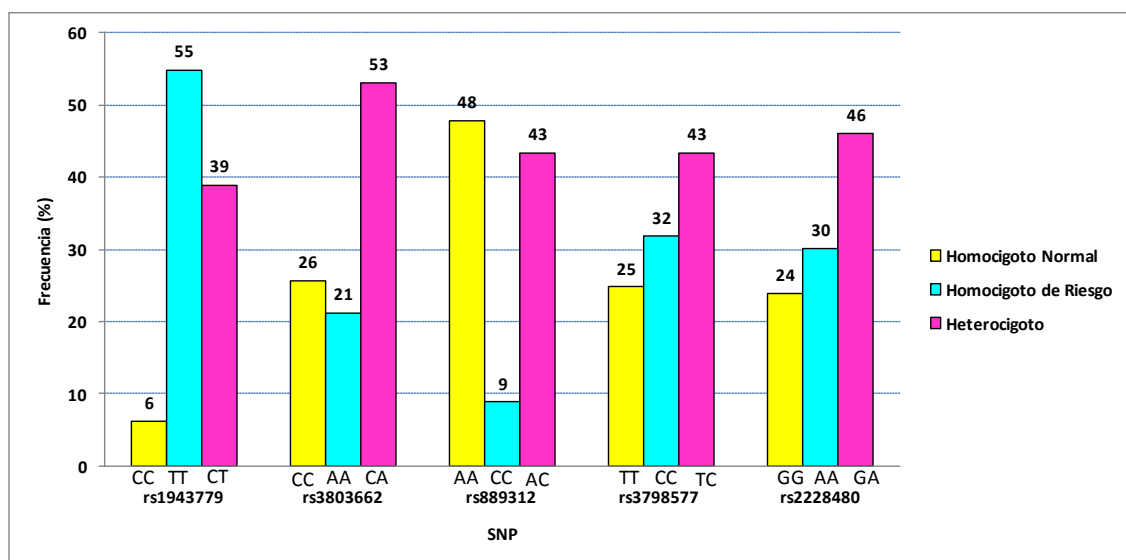


Figura 30. Frecuencia de los SNPs de riesgo para CM revelados por la prueba piloto en los voluntarios.

Basados en los resultados anteriores y con ayuda del programa estadístico Quanto, el cual considera variables genéticas y epidemiológicas de la enfermedad, se llevó a



cabo el cálculo de la N, el cual osciló para todos los polimorfismos entre 200 y 280 muestras, por lo que el número designado fue de 300 pacientes.

#### 4.2 Resultados epidemiológicos

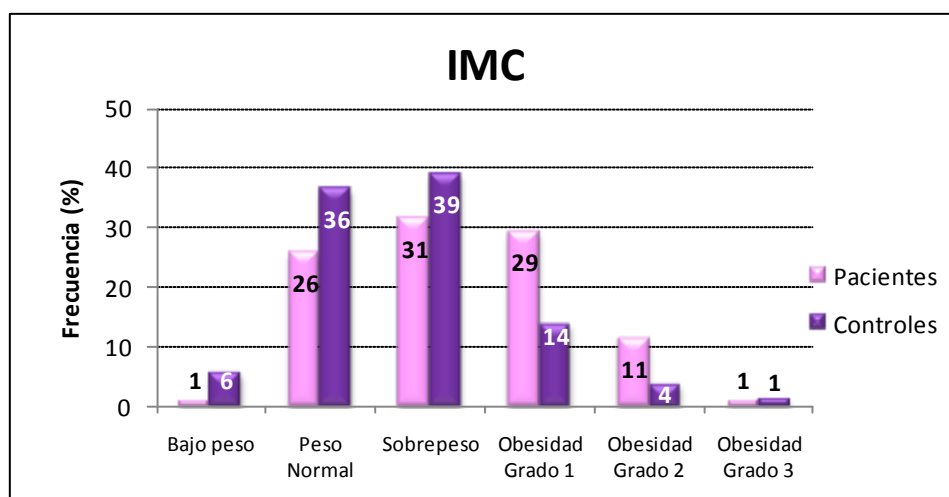
Se realizaron análisis de los datos epidemiológicos recolectados tanto de las pacientes, como de los controles, así como las comparaciones entre ambos grupos.

La edad de las pacientes estuvo en un rango de entre 20 a 90 años, con una media de 52.3. Mientras que las de los controles oscilaron entre los 18 y 86 años, con una media de 46.8. La procedencia de ambos grupos fue principalmente de los estados de Nuevo León, Coahuila, Durango, San Luis Potosí y Tamaulipas, con poca participación de otros estados aledaños (Cuadro 7).

Cuadro 7. Procedencia de las mujeres que participaron en el estudio

Procedencia		Estado	Frecuencia
		<b>Pacientes</b>	
		Coahuila	65 (21.75%)
		Tamaulipas	25 (8.42%)
		San Luis Potosí	23 (7.72%)
		Veracruz	11(3.51%)
		DF	8 (2.8%)
		Durango	6 (2.11%)
		Zacatecas	6 (2.11%)
		Jalisco	5 (1.75%)
		Querétaro	1 (0.35%)
		Michoacán	1 (0.35%)
		Texas	1 (0.35%)
<b>Controles</b>		Nuevo León	105 (52.69%)
		Durango	17 (8.6%)
		Coahuila	16 (8.06%)
		San Luis Potosí	17 (8.6%)
		Tamaulipas	12 (5.91%)
		DF	6 (2.69%)
		Zacatecas	4 (2.15%)
		Chihuahua	2 (1.08%)
		Veracruz	1 (0.54%)
		Puebla	1 (0.54%)
		Querétaro	1 (0.54%)
		Michoacán	1 (0.54%)
		Sonora	1 (0.54%)
		Guanajuato	1 (0.54%)

El índice de masa corporal (IMC) fue uno de los factores de riesgo que resultaron mayormente asociados con riesgo para CM, ya que se obtuvo que las mujeres que padecen este tipo de neoplasias también tienen un IMC más alto con relación a los controles (Figura 30), lo que se traduce en un riesgo incrementado para CM. Las mujeres con sobrepeso, obesidad grado 1 y obesidad grado 2, tienen un riesgo incrementado con respecto a mujeres con peso normal de 1.1, 2.87 y 3.81 veces, respectivamente [ $p=0.01$ ].

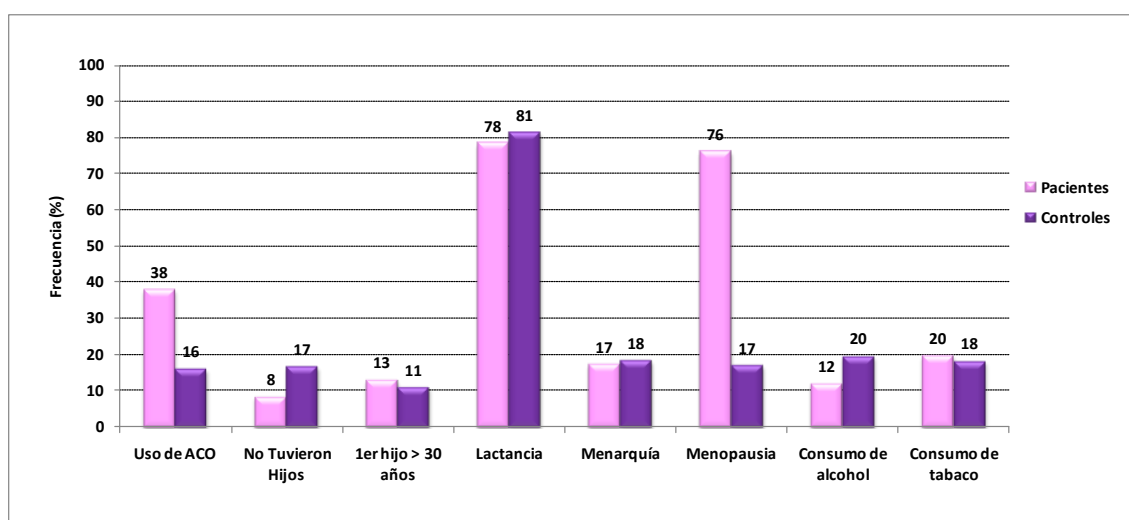


**Figura 30. Frecuencia de problemas de sobrepeso entre las mujeres del estudio.** Se muestran los diferentes grados de exceso de peso tanto en las pacientes como en los controles.

Se analizaron otros factores de riesgo previamente reportados, como son el uso de anticonceptivos orales (ACO), observándose que las pacientes tienen una mayor frecuencia en su uso con un 38.73%, mientras que en los controles este valor resultó de 16.13%. Con estos datos se dedujo que las mujeres que consumen ACO incrementan el riesgo de CM en un 331%, con respecto a las mujeres que no los usan. Por el contrario, se observó un mayor consumo de terapia de remplazo hormonal en controles que en pacientes con un 9.6 contra un 6.7%. El no tener hijos fue más frecuente en los controles con un 16.66%, mientras que las pacientes mostraron un 8.42%; sin embargo, las pacientes tuvieron su primer hijo después de los 30 años con mayor frecuencia (13.04%) y las controles con menor frecuencia (10.93%). En el amamantamiento el comportamiento de ambos grupos fue muy similar, con un 78.26% para pacientes y un 81.25% para controles. Esto mismo se observó en la edad de la menarquía, ya que el 17.26% y el 18.34% de pacientes y controles, respectivamente, tuvieron una menarquía temprana (antes de los 12 años). En el estado menopáusico se observó una gran brecha,

ya que el 82.5% de los controles no habían pasado por esta etapa, mientras que sólo 23.84% de las pacientes no la habían experimentado. En ambos grupos, de las mujeres que ya habían pasado la menopausia, el 25.8% de los controles y el 23.07% de las pacientes lo hicieron antes de los 50 años. Los controles consumían más alcohol con un 19.55% contra un 12.05% de las pacientes. En el consumo de tabaco el comportamiento fue muy similar entre ambos grupos, con un 18.18% para controles contra un 19.71% de las pacientes. Estas comparaciones se ilustran en la figura 31.

Parámetro:	Uso de ACO	No Hijos	Hijo despues de 30 años	Lactancia	Menarquía	Menopausia	Consumo de alcohol	Consumo de tabaco
Pacientes	116 (38.73%)	25 (8.42%)	36 (13.04%)	216 (78.26%)	35 (17.26%)	152 (76.16%)	39 (19.55%)	39 (19.71%)
Controles	32 (16.13%)	33 (16.66%)	14 (10.93%)	128 (81.25%)	55 (18.34%)	35 (17.5%)	24 (12.05%)	36 (18.18%)



**Figura 31. Comparación de variables epidemiológicas entre pacientes y controles.** Se observa una tendencia superior en los casos al uso de ACO y al haber pasado la menopausia, mientras el resto de los parámetros estudiados no muestran tendencia preferencial para ninguno de ambos grupos.

### 4.3 Comportamiento de la enfermedad

El CM en las pacientes apareció principalmente en el seno izquierdo (52.44%), seguido por el derecho (44.75%) y en mucho menor proporción bilateralmente (2.79%). El tipo histológico más frecuente resultó ser el adenocarcinoma ductal infiltrante con el 67% del total. El cáncer se distribuyó mayormente en los estadios II y III (Figura 32). Un 21.33% de las pacientes habían sufrido metástasis al momento de aceptar participar en nuestro estudio. El 97% de las pacientes fueron sometidas a algún tipo de cirugía, siendo la más común la mastectomía radical modificada que se les practicó al 69.49% de estas pacientes, seguida por la cuadrantectomía que se les realizó al 13.89% de estas mujeres.

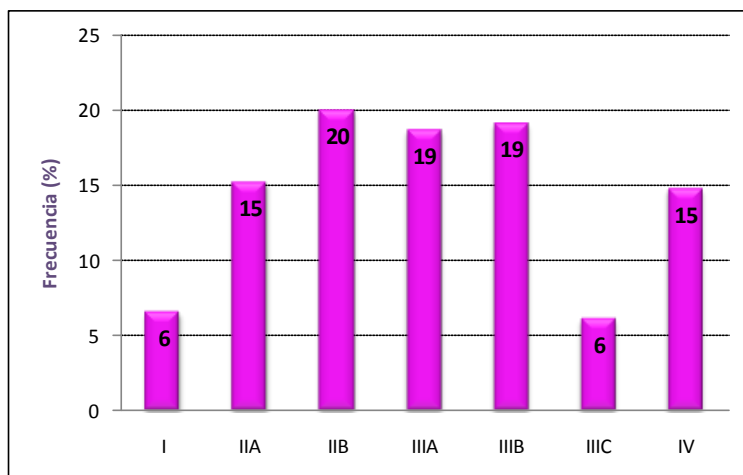


Figura 32. Estadio clínico de las pacientes. Se muestra la distribución del estadio clínico de las pacientes en el cual se observa que únicamente el 6% se encuentra en el primer estadio, mientras que el 35% en el estadio II, el 44% en el estadio III y un 15%, en el estadio IV.

En lo que respecta al estado hormonal de las pacientes, un 67.33% resultaron ser postmenopáusicas, de las cuales un 19.7% tuvieron CM triple negativo, mientras que un 25.77% de las pacientes premenopáusicas tuvo este mismo tipo de CM. Es importante mencionar que los resultados para los análisis de estados de receptores hormonales sólo se obtuvieron para 240 pacientes, debido a que no todas llevaron a cabo su tratamiento desde el inicio en el Hospital Universitario, por lo que dichos resultados fueron imposibles de localizar o en algunos casos ni siquiera existieron. Los resultados que se pudieron obtener se resumen en el cuadro 8 de a continuación:

Cuadro 8. Resultados de los receptores hormonales de las pacientes con CM.

Receptores Hormonales	(N=240)	Positivos	Negativos
Estrógenos (RE)		130 (54%)	110 (46%)
Progesterona (PR)		96 (40%)	144 (60%)
Her2neu		89 (37%)	151 (63%)
Triple Marcador (RE,PR,Her2neu)		26 (11%)	52 (22%)

Es importante definir que de las pacientes postmenopáusicas, un 59.47% fueron positivas para RE, contra únicamente un 34% de las premenopáusicas.

#### 4.4 Resultados de la genotipificación

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas y genotípicas en los 7 SNPs en los cinco genes investigados. En el cuadro 9 se encuentran las frecuencias encontradas en nuestro estudio, comparadas con las previamente reportadas para población caucásica, resaltando aquellos en los que dichas frecuencias difieren entre sí.

Cuadro 9. Frecuencias Alélicas encontradas.

Gen	SNP	Alelo	Frecuencia alélica %	
			Pacientes N=300	Controles N=200
TOX3	rs3803662	Silvestre C	46.39 (71*)	54 (74*)
		Variante A	<b>53.61 (29*)</b>	<b>46 (26*)</b>
ESR1	rs2228480	Silvestre G	67.49 (80*)	75.5 (77*)
		Variante A	<b>32.51 (20*)</b>	<b>24.5 (23*)</b>
	rs3798577	Silvestre T	48.29 (51*)	56 (53*)
		Variante C	<b>51.71 (49*)</b>	<b>44 (47*)</b>
MMP7	rs1943779	Silvestre C	30.99 (29*)	34 (30*)
		Variante T	69.01 (71*)	66 (70*)
MAP3K1	rs889312	Silvestre A	46.39 (69*)	45.5 (66*)
		Variante C	<b>53.61 (31*)</b>	<b>54.5 (34*)</b>
FGFR2	rs11200014	Silvestre G	59.13 (52*)	67 (57*)
		Variante A	<b>40.87 (48*)</b>	<b>33 (43*)</b>
	rs1219248	Silvestre A	56.27 (51*)	31 (54*)
		Variante G	43.73 (49*)	69 (46*)

\*Frecuencias reportadas por Tapper, et al. [53], para población caucásica.

En cuanto a las frecuencias genotípicas, estas se muestran en el cuadro 10, resaltando en amarillo aquellas que resultaron significativas para el incremento del riesgo para CM.

Gen	SNP	Alelo	Genotipo	Frecuencia Genotípica %		p	OD
				Pacientes N=300	Controles N=200		
TOX3	rs3803662	Silvestre C	Homocigoto C	31.55	38.50	0.07	1
		Variante A	Homocigoto A	19.33	16.00		1.46
		Heterocigoto C/A		59.32	44.50		1.08
ESR1	rs2228480	Silvestre G	Homocigoto G	13.66	21	0.47	1
		Variante A	Homocigoto A	23.66	21.5		1.68
		Heterocigoto G/A		38.40	58.00		1.69
	rs3798577	Silvestre T	<b>Homocigoto T</b>	<b>21.29</b>	<b>31.00</b>	<b>0.000015</b>	<b>1</b>
		Variante C	<b>Homocigoto C</b>	<b>24.71</b>	<b>19.00</b>		<b>2.82</b>
		<b>Heterocigoto T/C</b>		<b>53.99</b>	<b>50.00</b>		<b>2.80</b>
MMP7	rs1943779	Silvestre C	Homocigoto C	20.00	21.5	0.87	1
		Variante T	Homocigoto T	29.00	29.5		1.12
		Heterocigoto C/T		51.66	49.5		1.06
MAP3K1	rs889312	Silvestre A	Homocigoto A	22.33	27.5	0.19	1
		Variante C	Homocigoto C	25.00	25.0		1.33
		Heterocigoto A/C		53.33	49.5		1.23
FGFR2	rs11200014	Silvestre G	<b>Homocigoto G</b>	<b>15.66</b>	<b>34.00</b>	<b>0.002</b>	<b>1</b>
		Variante A	<b>Homocigoto A</b>	<b>39.33</b>	<b>34.00</b>		<b>2.51</b>
		<b>Heterocigoto G/A</b>		<b>48.66</b>	<b>43.00</b>		<b>2.46</b>
	rs1219248	Silvestre A	Homocigoto A	20.66	23.00	<b>0.76</b>	<b>1</b>
		Variante G	Homocigoto G	24.66	22.00		<b>1.12</b>
		Heterocigoto A/G		55.33	55.00		<b>1.22</b>

Cuadro 10. Frecuencias y genotípicas encontradas

## CAPITULO V. DISCUSIÓN

El incremento de los casos de CM a nivel mundial ha generado un vuelco de la investigación hacia esta enfermedad, principalmente para tratar de entender el origen de la misma. Conjuntado esto con el creciente auge de la investigación genómica, se ha buscado identificar las causas genéticas que predisponen a las mujeres al padecimiento de esta neoplasia, por lo que múltiples estudios genómicos se han llevado a cabo con el fin de ubicar los genes que juegan un papel importante en esta enfermedad.

Con este mismo fin, Tapper, *et al.*, [53] realizaron un estudio GWAS, en el cual investigaron 30 posibles genes blanco que podrían asociarse a la enfermedad incluyendo a una población de 899 casos contra 2980 controles, encontrando a los genes TOX3 y ERS1 significativamente asociados a CM. Basados en este resultado previo, para el presente trabajo se tomó la decisión de incluir estos genes [53].

Sin embargo, contrastando con el resultado previo, no se encontró asociación entre el alelo A del SNP rs3803662 y el riesgo de CM. Este hallazgo coincide con lo reportado por Zheng *et al.*, quienes analizaron un grupo de siete SNPs del gen TOX3 en mujeres europeas y mujeres africanas. Otro grupo de estas últimas mujeres también fue estudiado por Ruiz-Narvaez, *et al.* Siendo que los resultados encontrados en estos dos últimos estudios tampoco confirman una asociación entre este gen y el riesgo de padecer CM [54-55].

El gen MAP3K1 incluido en este trabajo y que no resultó estar asociado a CM, ha sido previamente estudiado en distintas poblaciones como en mujeres caucásicas, rusas, europeas, asiáticas, australianas y norteamericanas [56-58]. Sin embargo, los resultados de los estudios son discordantes entre sí, ya que inclusive los realizados entre las mismas poblaciones no reportan los mismos resultados. Por ejemplo, Rebbeck, *et al.*, reporta una asociación positiva, mientras que Barnholtz-Sloan, *et al.*, no encontraron asociación ambos estudios en mujeres blancas y afroamericanas [59-60]. Con el fin de aclarar los resultados de dichos estudios, Lu PH, *et al.*, realizaron meta-análisis incluyendo los resultados de seis estudios previos [42, 56-58, 60-61] sobre los polimorfismos de este gen, logrando captar la información de 26,015 casos y 33,962 controles. Con toda esta vasta información, se encontró que el alelo C del SNP rs889312 del gen MAP3K1, es un factor de riesgo de baja penetrancia para el desarrollo de CM [62]. Dado que esto contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo, se

deduce que es necesario incrementar la población estudiada para poder afirmar o descartar a este gen como de riesgo para esta neoplasia.

En el gen ESR1 se encontró una asociación positiva con el alelo C del rs3798577, ya que la presencia de este alelo incrementa el riesgo de padecer CM 2.8 veces, en comparación con la ausencia de dicho alelo. Este resultado concuerda con lo reportado por Tapper, *et al.*, [53] aunque el incremento del riesgo reportado por este grupo fue de solo 1.11 veces.

En el gen FGFR2, que recientemente ha sido ampliamente estudiado por su relación con el CM, se han reportado SNPs dentro del segundo intron como asociados al desarrollo de esta enfermedad [32]. En este estudio se incluyeron dos de estos: rs11200014 y rs1219648, de los cuales únicamente el alelo A del SNP rs11200014 se asoció positivamente a la enfermedad, incrementando el riesgo 2.5 veces.

El no haber encontrado asociación en el SNP rs1219648 concuerda con lo reportado por Rebbeck, *et al.*, [35] pero contrasta con lo encontrado por Zheng, *et al.*, y Liang, *et al.*, quienes reportan una asociación entre el alelo G y esta neoplasia, con sus resultados arrojando un riesgo incrementado 1.24 veces para las mujeres heterocigotas y 1.56 veces para mujeres homocigotas GG.

Los reportes en este tema alrededor del mundo difieren mucho entre sí, lo que puede explicarse debido a la disparidad en carga genética ancestral. Sin embargo, las discrepancias entre la misma población, pueden adjudicarse a la variabilidad en el diseño de los experimentos. Por lo que es necesario llevar a cabo nuevos análisis colaborativos en los cuales sea posible incluir números de muestras cada vez mayores, para evitar que los resultados se vean alterados por algún tipo de sesgo poblacional.



## CAPITULO VI. CONCLUSIONES

El uso de ACO incrementa 3.31 veces ( $p=1 \times 10^{-7}$ ) el riesgo a cáncer de mama (CM).

Se observó un aumento en el riesgo a CM conforme se incrementa el IMC, teniendo las mujeres con sobrepeso, obesidad grado 1 y grado 2, un riesgo incrementado en 1.1, 2.87 y 3.81 ( $p=0.01$ ) veces de desarrollar la enfermedad, respectivamente.

Las mujeres de nuestro análisis que tuvieron su primer hijo después de los 30 años, mostraron 1.81 ( $p=0.04$ ) veces mayor riesgo a CM.

Por tanto, se confirmaron el uso de ACO, el incremento del peso y el tener el primer hijo después de los 30 años, como factores de riesgo para CM.

Se encontró una frecuencia de 22% en CM Triple Negativo. Dado que lo reportado internacionalmente oscila entre 15 y 24%, nuestra población de ubica entre las que presentan CM más agresivo y con menos respuesta al tratamiento.

Contrariamente a lo reportado anteriormente en nuestro laboratorio por Calderón-Garcidueñas *et al.*, en nuestro caso no se encontró protección contra el CM en las mujeres que amamantaron. Esto pudiera deberse al cambio de hábitos reproductivos en la población, lo que podría anular factores protectores reportados previamente.

La presencia del alelo variante C en el SNP rs3798577 del gen ESR1 (presente en 237 de 300 pxs) mostró incremento en el riesgo a CM en 2.8 veces. Lo que es mayor a lo reportado por Tapper *et al.*, para población caucásica, donde el incremento fue de 1.11 veces ( $p=0.0441$ ).

De igual manera, el SNP rs11200014 del gen FGFR2 (presente en 267 de 300pxs) aumentó el riesgo a CM 2.46 veces para heterocigotos (AG) ( $p=0.002$ ) y 2.51 veces para homocigotos (AA) ( $p=0.002$ ).

Contrariamente, los alelos de riesgo en los SNPs rs3803662 del gen TOX3, rs2228480 del gen ERS1 y rs1219248 del gen FGFR2, reportados por Tapper *et al.*, y Hunter *et al.*, no resultaron significativamente asociados al CM en nuestra población.

El SNP rs11200014 del gen FGFR2 y el rs3798577 del ERS1, resultaron con valor predictivo para el desarrollo de CM, lo que será de utilidad para identificar a mujeres que tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en nuestra población.

Los SNPs en los genes MAP3K1, MMP7, TOX3 y ERS1, no resultaron útiles como predictores de riesgo a CM en nuestra población.

El conocer el riesgo incrementado por las variantes genéticas, combinado con la exposición a factores de riesgo ambientales, permitirá ubicar a aquellas mujeres con

mayor probabilidad de padecer la enfermedad y poder llevar a cabo medidas preventivas que redundan en un mejor combate a la enfermedad.

## Referencias

1. Wolk, A., et al., *A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden)*. *Cancer Causes Control*, 2001. **12**(1): p. 13-21.
2. Sorisky, A., *Molecular links between obesity and cardiovascular disease*. *Am J Ther*, 2002. **9**(6): p. 516-21.
3. Daling, J.R., et al., *Relation of body mass index to tumor markers and survival among young women with invasive ductal breast carcinoma*. *Cancer*, 2001. **92**(4): p. 720-9.
4. Chlebowski, R.T., et al., *Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(6): p. 573-87.
5. CDC, *All you need to know about breast cancer*, D.o.h.a.h.s. USA, Editor. 2010, National Cancer Institute.
6. Hayes, D.F., *Clinical practice. Follow-up of patients with early breast cancer*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(24): p. 2505-13.
7. Carlson, R.W., et al., *Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2009. **7**(2): p. 122-92.
8. OMS. *World Cancer Day 2009*. 2009 [cited 2010; Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>].
9. Ries LAG, K.C., Hankey BF, Miller BA, Edwards BK, *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1995*. Bethesda: National Cancer Institute, 1998.
10. Knaul, F.M., et al., *[Breast cancer in Mexico: an urgent priority]*. *Salud Publica Mex*, 2009. **51 Suppl 2**: p. s335-44.
11. Martínez-Montañez, O.G., P. Uribe-Zuniga, and M. Hernández-Avila, *[Public policies for the detection of breast cancer in Mexico]*. *Salud Publica Mex*, 2009. **51 Suppl 2**: p. s350-60.
12. Franco-Marina, F., E. Lazcano-Ponce, and L. López-Carrillo, *Breast cancer mortality in Mexico: an age-period-cohort analysis*. *Salud Publica Mex*, 2009. **51 Suppl 2**: p. s157-64.
13. Cox, A., et al., *A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk*. *Nat Genet*, 2007. **39**(3): p. 352-8.
14. Pharoah, P.D., et al., *Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Int J Cancer*, 1997. **71**(5): p. 800-9.
15. Miki, Y., et al., *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. *Science*, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
16. Wooster, R., et al., *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. *Nature*, 1995. **378**(6559): p. 789-92.
17. Ouchi, T., et al., *BRCA1 regulates p53-dependent gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(5): p. 2302-6.
18. Zhang, H., et al., *BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity*. *Oncogene*, 1998. **16**(13): p. 1713-21.
19. Easton, D.F., et al., *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1087-93.
20. Walsh, T. and M.C. King, *Ten genes for inherited breast cancer*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(2): p. 103-5.
21. Hidalgo-Miranda, A. and G. Jiménez-Sánchez, *Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada*. *Salud Publica de Mexico*, 2008. **51**(2).
22. Kuperstein, G., et al., *A rapid fluorescent multiplexed-PCR analysis (FMPA) for founder mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes*. *Clin Genet*, 2000. **57**(3): p. 213-20.
23. Mangia, A., et al., *BRCA1 expression and molecular alterations in familial breast cancer*. *Histol Histopathol*, 2009. **24**(1): p. 69-76.

24. Zhang, S., G. Kuperstein, and S.A. Narod, *Mutation screening using fluorescence multiplex denaturing gradient gel electrophoresis (FMD): detecting mutations in the BRCA1 gene*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 3101-10.
25. Ruiz-Flores, P., et al., *BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of early-onset and familial breast cancer cases in Mexico*. Hum Mutat, 2002. **20**(6): p. 474-5.
26. Rodriguez, R.C., et al., *Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Cuba*. Fam Cancer, 2008. **7**(3): p. 275-9.
27. Gallardo, M., et al., [*Determination of a BRCA1 gene mutation in a family with hereditary breast cancer*]. Rev Med Chil, 2004. **132**(2): p. 203-10.
28. Tommasi, S., et al., *BRCA1 mutations and polymorphisms in a hospital-based consecutive series of breast cancer patients from Apulia, Italy*. Mutat Res, 2005. **578**(1-2): p. 395-405.
29. Roa, B.B., et al., *Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 185-7.
30. Struewing, J.P., et al., *The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews*. N Engl J Med, 1997. **336**(20): p. 1401-8.
31. Stacey, S.N., et al., *Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 865-9.
32. Hunter, D.J., et al., *A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 870-4.
33. Gold, B., et al., *Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4340-5.
34. Meyer, K.B., et al., *Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer*. PLoS Biol, 2008. **6**(5): p. e108.
35. Liang, J., et al., *Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women*. Carcinogenesis, 2008. **29**(12): p. 2341-6.
36. Raskin, L., et al., *FGFR2 is a breast cancer susceptibility gene in Jewish and Arab Israeli populations*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(5): p. 1060-5.
37. Rennert, G., et al., *Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations*. N Engl J Med, 2007. **357**(2): p. 115-23.
38. Soumitra, N., et al., *Molecular genetics analysis of hereditary breast and ovarian cancer patients in India*. Hered Cancer Clin Pract, 2009. **7**(1): p. 13.
39. Eccles, D., et al., *Prospective study of Outcomes in Sporadic versus Hereditary breast cancer (POSH): study protocol*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 160.
40. O'Flaherty, E. and J. Kaye, *TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins*. BMC Genomics, 2003. **4**(1): p. 13.
41. Smid, M., et al., *Genes associated with breast cancer metastatic to bone*. J Clin Oncol, 2006. **24**(15): p. 2261-7.
42. Antoniou, A.C., et al., *Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(4): p. 937-48.
43. Xia, Y., et al., *JNK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension*. Genes Dev, 1998. **12**(21): p. 3369-81.
44. Vinik, B.S., E.S. Kay, and F.T. Fiedorek, Jr., *Mapping of the MEK kinase gene (Mekk) to mouse chromosome 13 and human chromosome 5*. Mamm Genome, 1995. **6**(11): p. 782-3.

45. Pearlman, A., et al., *Mutations in MAP3K1 cause 46,XY disorders of sex development and implicate a common signal transduction pathway in human testis determination*. Am J Hum Genet, 2010. **87**(6): p. 898-904.
46. Muller, D., et al., *The collagenase gene family in humans consists of at least four members*. Biochem J, 1988. **253**(1): p. 187-92.
47. Gaire, M., et al., *Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2032-40.
48. Pendas, A.M., et al., *Fine physical mapping of the human matrix metalloproteinase genes clustered on chromosome 11q22.3*. Genomics, 1996. **37**(2): p. 266-8.
49. Sluysers, M. and J. Mester, *Oncogenes homologous to steroid receptors?* Nature, 1985. **315**(6020): p. 546.
50. Scott, G.K., et al., *Truncated forms of DNA-binding estrogen receptors in human breast cancer*. J Clin Invest, 1991. **88**(2): p. 700-6.
51. Fejerman, L., et al., *Genetic Ancestry and Risk of Breast Cancer among US Latinas*. Cancer Research, 2008. **68**(23): p. 9723-9728.
52. Sambrook J, F.E., Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2a ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
53. Tapper, W., et al., *The influence of genetic variation in 30 selected genes on the clinical characteristics of early onset breast cancer*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(6): p. R108.
54. Zheng, W., et al., *Evaluation of 11 breast cancer susceptibility loci in African-American women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(10): p. 2761-4.
55. Ruiz-Narvaez, E.A., et al., *Polymorphisms in the TOX3/LOC643714 locus and risk of breast cancer in African-American women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010. **19**(5): p. 1320-7.
56. Latif, A., et al., *Breast cancer susceptibility variants alter risks in familial disease*. J Med Genet, 2010. **47**(2): p. 126-31.
57. Gorodnova, T.V., et al., *Distribution of FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1, and 8q24 alleles in genetically enriched breast cancer patients versus elderly tumor-free women*. Cancer Genet Cytogenet, 2010. **199**(1): p. 69-72.
58. Garcia-Closas, M., et al., *Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics*. PLoS Genet, 2008. **4**(4): p. e1000054.
59. Rebbeck, T.R., et al., *Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women*. Carcinogenesis, 2009. **30**(2): p. 269-74.
60. Barnholtz-Sloan, J.S., et al., *FGFR2 and other loci identified in genome-wide association studies are associated with breast cancer in African-American and younger women*. Carcinogenesis, 2010. **31**(8): p. 1417-23.
61. Tamimi, R.M., et al., *Birth weight, breast cancer susceptibility loci, and breast cancer risk*. Cancer Causes Control, 2010. **21**(5): p. 689-96.
62. Lu PH, Y.J., Li C, Wei MX, Shen W, Shi LP, Jiang ZY, Zhou N, Tao GQ., *Association between mitogen-activated protein kinase kinase 1 rs889312 polymorphism and breast cancer risk: evidence from 59,977 subjects*. Breast Cancer Res Treat. , 2010.

ANEXO 1

Carta de aprobación del comité de ética.



**UANL** Comité de Ética y Comité de Investigación

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Comité de Ética

Dr. José Gerardo Garza Leal  
Presidente

Dr. Jorge E. Cruz Flores  
Secretario

Dr. med. Oscar de la Garza Castro  
Tesorero

Walter

Dr. Alejandro Martí Sierra

Dr. María del Carmen Escobedo Sánchez

Dr. Raquel Coronado Garza

Lic. Susana Vignos de Zambrano

Lic. Ivete Torres Álvarez

Comité de Investigación

Dr. José Gerardo Garza Leal  
Presidente

Dr. Irma Rivera Mancos  
Secretario

Walter

Dr. Guadalupe Guzmán González

Dr. Héctor R. Martínez Rodríguez

Dr. Alberto Rodríguez García

Dr. Juan Rodríguez Salazar

Dr. med. Carlos Alberto Muñoz Cortés

Dr. Norberto López Sierra

**DR. en C. MARIA DE LOURDES GARZA RODRIGUEZ**  
Investigador Principal  
Departamento de Bioquímica  
Presente.-

Estimada Dra. Martínez:

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 **"Bioanálisis genómicos de predicción de riesgo y respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de mama"**, participando además Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña, Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, Dr. Juan Francisco González Guerrero, Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado y la Dra. Raquel Garza Guajardo como Co-Investigadores.

Su proyecto quedó registrado en esta Subdirección con la clave **B110-002**. Este número es necesario para la autorización de los servicios de apoyo a la investigación

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

Sin más por el momento, me despido de usted.

Atentamente,  
"Aere Flammam Veritatis"  
Monterrey N.L., a 17 de Marzo del 2010

  
**DR. JOSÉ GERARDO GARZA LEAL**  
Secretario de Investigación Clínica  
Presidente del Comité de Ética e 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 UANL, planta baja  
Av. Francisco I. Madero Pte. sur y Dr. E. Aguero Pasquel, Col. Mitras Centro, C.P. 64460 Monterrey, N.L., México  
Tel./Fax (+52) (832) 4050 Ext. 2073 y 2074. Correo Electrónico: [investigacion@hu.uanl.mx](mailto:investigacion@hu.uanl.mx)

## ANEXO 2

### Hoja de Recolección de Datos

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

#### DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Lugar de recolección de datos: \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Procedencia: \_\_\_\_\_ # expediente: \_\_\_\_\_

Sexo: M  F  Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Estado de Nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_

Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Teléfono Opcional: \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

Antecedente de cáncer:

Mama: SI\_\_NO\_\_ Ovario: SI\_\_NO\_\_ Colon: SI\_\_NO\_\_ Otro: SI\_\_NO\_\_

Cuantos familiares? \_\_\_\_\_

Tipo de cáncer \_\_\_\_\_ quien \_\_\_\_\_ materno\_\_ paterno\_\_ ambos\_\_ edad\_\_

Tipo de cáncer \_\_\_\_\_ quien \_\_\_\_\_ materno\_\_ paterno\_\_ ambos\_\_ edad\_\_

Antecedente de cáncer de mama en hombres \_\_\_\_\_.

Observaciones \_\_\_\_\_

## ANTECEDENTES PATOLÓGICOS

Fecha de diagnóstico de cáncer de mama \_\_\_\_\_

Lado del cáncer \_\_\_\_\_ Tipo histológico \_\_\_\_\_ Cáncer contralateral: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Si es afirmativo, ¿hace cuánto tiempo? \_\_\_\_\_ Tratamiento recibido \_\_\_\_\_

Metástasis \_\_\_\_\_

Tratamientos recibidos:

Qt \_\_\_\_\_ Rt \_\_\_\_\_

Tiempo de tratamiento \_\_\_\_\_

Recaída: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿cuál tratamiento? \_\_\_\_\_

¿cuánto tiempo llevaba de tratamiento? \_\_\_\_\_

¿Se le practicaron estudios de ER o PR?: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Resultado \_\_\_\_\_

¿Se le realizó cirugía?: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Tipo de cirugía: \_\_\_\_\_

Estadio clínico: \_\_\_\_\_

TNM \_\_\_\_\_

Bloom- Richardson. \_\_\_\_\_

## ANTECEDENTES PREVENTIVOS

¿Se practicaba mamografías anuales? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_



## FACTORES DE RIESGO

¿Usa anticonceptivos orales?: SI\_\_ NO\_\_ ¿Por cuánto tiempo?\_\_\_\_\_

¿Y de reemplazo hormonal?: SI\_\_ NO\_\_ ¿Por cuánto tiempo?\_\_\_\_\_

¿Tiene hijos? SI\_\_ NO\_\_ ¿Cuántos? \_\_\_\_ ¿a qué edad tuvo su primer hijo?\_\_\_\_\_

¿Amamanto? SI\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_ ¿cuánto tiempo?\_\_\_\_\_

Edad de menarquía\_\_\_\_\_

Edad de menopausia (si aplica)\_\_\_\_\_

¿Consume alcohol?: SI \_\_ NO\_\_ ¿Cuánto?\_\_\_\_\_ ¿cada cuando?  
\_\_\_\_\_

¿Fuma o ha fumado?: SI\_\_ NO \_\_ Edad de inicio \_\_\_\_ ¿Cuánto tiempo fumo?\_\_\_\_  
¿Cuántos cigarros al día?\_\_\_\_\_

Consume alguna otra droga: SI\_\_ NO\_\_ Cual?\_\_\_\_\_

Ha estado expuesta a radiación: SI\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_ ¿Por cuánto tiempo?\_\_\_\_\_

Cosanguinidad (comunidad cerrada)\_\_\_\_\_

## GENEALOGÍA

Procedencia del padre\_\_\_\_\_

Procedencia de la madre\_\_\_\_\_

Procedencia del abuelo paterno\_\_\_\_\_

Procedencia de la abuela paterna\_\_\_\_\_

Procedencia del abuelo materno\_\_\_\_\_

Procedencia de la abuela materna\_\_\_\_\_

## **ANEXO 3**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO.**

#### Proyecto de Investigación

Bioanálisis genómicos de predicción de riesgo y respuesta al tratamiento en  
pacientes con cáncer de mama

#### **Información general:**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un proyecto de investigación en mujeres con cáncer de mama que se está llevando a cabo en este centro y al que se le invita a participar. Es importante que conozca que este proyecto de investigación ha sido ya revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta información con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

#### **Descripción y objetivo del estudio:**

El cáncer de mama es el crecimiento acelerado, anormal y desorganizado de las células que constituyen el tejido mamario. Actualmente el cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres mexicanas. El cáncer de mama es el resultado de múltiples factores que pueden ser genéticos y/o ambientales. Las investigaciones indican que hay genes que se heredan y que pueden influir en el desarrollo del cáncer y en la respuesta de cada persona a diferentes tratamientos.

En este protocolo de investigación se planea realizar análisis genéticos que permitan identificar genes que hacen susceptibles a la personas a padecer el cáncer de mama. Además se realizarán estudios genéticos adicionales en las pacientes con cáncer de mama que reciban tratamiento con los medicamentos tamoxifeno o capecitabina con el fin de analizar la respuesta al tratamiento.

**Procedimientos del estudio:**

La duración total esperada de la participación en el estudio es una sola visita para toma de su historia clínica y la toma de una muestra de sangre. Durante su visita de valoración se revisará su expediente clínico para determinar si es candidato a participar en el estudio. Si usted acepta participar se le realizará una toma de sangre para realizar estudios genéticos. Todas las muestras serán salvaguardadas en un almacén refrigerado (Biobanco). Estas muestras podrán utilizarse en investigaciones futuras en cáncer de mama. Toda información recabada y los resultados de los estudios serán manejados con estricta confidencialidad y solo para los fines ya descritos.

**Riesgos asociados al estudio:**

Los riesgos de esta prueba son muy raros y no ponen en peligro la vida del paciente. El mayor riesgo podría ser algún moretón en el sitio de extracción de la muestra de sangre.

**Beneficios que aportara el estudio al paciente:**

- a) Inmediatos: Realización de pruebas diagnosticas de genes relacionados al cáncer de mama. Si usted va a recibir o está recibiendo tratamiento con tamoxifeno o capecitabina se le realizarán estudios adicionales para evaluar la respuesta al tratamiento.
- b) Mediatos: De acuerdo a los resultados, el médico tratante podría elegir los medicamentos adecuados y así, el paciente tiene mayores posibilidades de mejorar. Se espera que se obtengan, por medio de este estudio, nuevos conocimientos que me puedan beneficiar a usted y a otras mujeres con cáncer de mama.

**Participación voluntaria**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación que solicite en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además, entiendo que estoy en libertad de retirarme en el momento que lo desee y si tomara esta decisión no me afectara en futuros tratamientos que requiera en el

Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL.

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

Además el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la U.A.N.L. estará en 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.

**Responsables de la investigación:**

Investigador Principal:

Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña, Depto. de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina de la UANL (Tel: 83294174 Ext 2591)

Investigadores asociados:

Dra. en C. María de Lourdes Garza Rodríguez (Tel.- 83294174 Ext 2824)

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

Paciente.

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma

Testigo

Nombre y Firma \_\_\_\_\_

Investigador: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma

#### ANEXO 4

Extracción de ADN de alta calidad con TSNT a partir 3 ml de sangre.

19. Coloque 3 ml de la sangre en un tubo cónico de 15 ml.
20. Agregue 1.2ml de buffer de lisis TSNT y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
21. Agregue 3 ml de fenol saturado y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
22. Agregue 0.6 ml de sevag y mezcle en vórtex a velocidad baja o media durante 1 minuto.
23. Agregue 2 ml de TE 1X y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
24. Centrifugue 20 min a 10 000 rpm.
25. Transfiera la fase acuosa a un tubo cónico de 15 ml.
26. Agregue 2 ml de fenol saturado y mezcle por inversión o en vórtex a velocidad baja o media durante 30 segundos.
27. Agregue 0.6 ml de sevag y mezcle en vórtex a velocidad baja o media durante 1 minuto.
28. Centrifugue 20 min a 10 000 rpm.
29. Transfiera la fase acuosa a un tubo cónico de 15 ml.
30. Agregue 1 volumen de isopropanol y mezcle gentilmente por inversión.
31. Transferir la hebra con 500 de sobrenadante a tubos eppendorf de 1.5ml.
32. Centrifugue 8 min a 14 000 rpm y decante el sobrenadante.
33. Lave la pastilla agregando 1ml de etanol al 70%.
34. Centrifugue 8 min a 14 000 rpm.
35. Secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente de 20 min.
36. Resuspenda la pastilla en 200µl de TE 1X.