

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Tesis para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Médicas

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO PRESENTES EN
CÁNCER DE MAMA DE PRESENTACIÓN ESPORÁDICA EN MUJERES
MEXICANAS DERECHO-HABIENTES DEL INSTITUTO MEXICANO DEL
SEGURO SOCIAL.**

Alumno.

Carlos Alberto Yam Ontiveros

drcarlosyam@yahoo.com.mx

Tutores.

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez

fabio.salamanca@imss.gob.mx

Dr. Diego J. Arenas Aranda

arenasdi@gmail.com

Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana; Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social. Av. Cuauhtémoc 330. Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc. CP. 06720. Distrito Federal, México



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO PARA EXAMEN DE GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez.

Coordinador de Investigación en Salud IMSS
Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. Diego J. Arenas Aranda

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana.
Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Dra. Rosenda I. Peñaloza Espinosa

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Mónica Aguinaga Ríos

Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"
Departamento de Genética Médica

Dr. Alejandro M. García Carranca

Instituto Nacional de Cancerología

FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio fue posible ya que se contó con pacientes que cubrieron los criterios de inclusión en la consulta externa del servicio de Cáncer de Mama del Hospital de Oncología de CMN SXXI y del servicio de Cáncer de Mama del Hospital de la Mujer.

Este estudio fue evaluado y autorizado por la Comisión Nacional de Investigación

Científica con número de registro.

ÍNDICE.

	Página
Resumen estructurado	5
Antecedentes	6
Justificación	18
Pregunta de Investigación	19
Objetivos	20
Diseño del Estudio	21
Métodos	21
Diseño muestral	21
Definición Operacional de Variables	22
Criterios de Selección	22
Procesamiento de muestras	23
Resultados	28
Conclusiones	29
Bibliografía	31
Anexos	35

RESUMEN ESTRUCTURADO.

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO PRESENTES EN CÁNCER DE MAMA DE PRESENTACIÓN ESPORÁDICA EN MUJERES MEXICANAS DERECHO-HABIENTES DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL. Introducción. Las neoplasias malignas se han incrementado significativamente de forma global. Las enfermedades oncológicas son uno de los principales problemas de Salud Pública que enfrentan los países en el mundo ^{1,2}. Según la Organización Mundial de la Salud en su última revisión de marzo de 2011 el cáncer obtuvo el 13% del total de muertes a nivel mundial con 7.9 millones de defunciones registradas ³. Sólo un pequeño porcentaje de los casos de cáncer forma parte alteraciones genéticas hereditarias en la forma clásica o mendeliana, siendo mucho más frecuente la forma esporádica en donde la interacción del genoma con el ambiente juega el principal papel para el desarrollo de la patología. ⁴ Todo proceso neoplásico se desarrolla a través del tiempo, incluso varios años, en el desarrollo de dicho proceso hay una sucesión de eventos genéticos que favorecen el crecimiento, proliferación y pérdida de diferenciación celular. ^{3,4} El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en el mundo, estimando que al año se diagnostican 1.3 millones de mujeres con esta neoplasia; solo en el año 2004 la OMS calculó un total de 1,200,000 casos nuevos, lo que corresponde al 12% del total de cánceres en la mujer ⁷. De acuerdo a las causas de muerte en mujeres en México el cáncer de mama ocupó en el año 2008 el puesto número 10 con un total de 4,818 defunciones, una tasa mortalidad de 8.9 y colocándola como el 2% de la mortalidad general de mujeres, sin embargo analizando las estadísticas globales de mortalidad tenemos que los tumores malignos ocupan el tercer puesto como causa de muerte general en la población mexicana siendo el cáncer de mama el primero en posicionarse en este grupo en el año 2010, ocupando entonces el primer lugar como causa de muerte en el grupo de tumores malignos en mujeres mayores a 35 años de edad con un total de 17% ¹⁰. La tendencia va en aumento de acuerdo con el registro histopatológico de neoplasias malignas de la secretaría de salud. Se estima que el 15% a 20% de mujeres con cáncer de mama tienen historia familiar de la enfermedad. El cáncer intraductal es el tipo de cáncer mamario más frecuente asociado al desarrollo de esta neoplasia en forma esporádica. ⁷

Justificación y Planteamiento del Problema. El cáncer de mama es un problema de salud a nivel nacional, ya que ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años y se espera que en la próxima década sea la principal causa de muerte de dicho grupo poblacional en México. Aún cuando se conocen algunos genes y proteínas asociados al origen del cáncer de mama con predisposición hereditaria, el origen y el desarrollo de todas formas de presentación esporádica son poco conocidas y estudiadas en nuestro país. **Objetivos.** 1. Determinar mediante microarreglos de genotipificación los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en mujeres mexicanas con cáncer de mama de presentación esporádica. 2. Determinar si los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en el tejido neoplásico mamario son los mismos que se encuentren en sangre periférica de las mujeres estudiadas con cáncer de mama de presentación esporádica. **Metodología.** Se trabajó con tejido fresco (tejido tumoral y tejido adyacente sano) de 50 pacientes que acudieron de forma consecutiva a toma de biopsia y/o manejo quirúrgico de tumor mamario (cáncer de mama esporádico) en el Hospital de Oncología de CMN Siglo XXI IMSS independientemente del estadio y clasificación. **Resultados.** Posterior al análisis mediante las herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos para la plataforma de microarreglo GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 5.0 Nsp/Sty (Affymetrix) con 500,000 SNPs se determinaron más de 3000 posibles variables entre las secuencias de DNA correspondientes a tumor y las correspondientes a tejido sano adyacente. Con dichos resultados se consideró la necesidad de validar aquellas secuencias que se encontraron en el tejido tumoral y que han sido reportadas en otros estudios a nivel internacional como SNPs que confieren riesgo para el desarrollo de cáncer de mama eligiendo SNPs, *CASP8* D302H, *PGR* V660L y *TGFBI* L10P. Las secuencias han sido previamente referidas en la metodología. **CONCLUSIONES.** Con el presente estudio demostramos la alta variabilidad genómica que existe entre el tejido mamario que ha desarrollado neoplasia y el tejido adyacente sano, con lo cual resulta imperativo considerar a la inestabilidad genómica como un factor determinante para los cambios que se describen en el trabajo.

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO PRESENTES EN CÁNCER DE MAMA DE PRESENTACIÓN ESPORÁDICA EN MUJERES MEXICANAS DERECHO-HABIENTES DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

Antecedentes.

Las neoplasias malignas se han incrementado significativamente de forma global. Las enfermedades oncológicas son uno de los principales problemas de Salud Pública que enfrentan los países en el mundo [1,2]. El cáncer se desarrolla cuando una célula en cualquier tejido escapa a los procesos normales de control y se multiplica rápidamente superando todas las defensas del cuerpo. Desde el punto de vista médico el cáncer es un conjunto de síntomas de pronóstico y tratamiento diferentes, que depende principalmente de su localización, el tipo celular o histológico del que proceda. [3].

El cáncer es una enfermedad genética en donde diversos factores ambientales favorecen su manifestación. Se conocen la mayoría de los factores de riesgo, siendo el principal la edad, dos terceras partes de todos los cánceres ocurren en personas mayores de 65 años; le siguen el tabaquismo, la dieta, localización geográfica, paridad, raza, ejercicio físico, la exposición solar, y estilos de vida poco saludables. Sólo un pequeño porcentaje de los cánceres son una enfermedad hereditaria, debido a que el mecanismo de producción del cáncer subyace en los genes [1,2].

Todo proceso neoplásico se desarrolla a través del tiempo, incluso varios años, en el desarrollo de dicho proceso hay una sucesión de eventos genéticos que favorecen el crecimiento, proliferación y pérdida de diferenciación celular [4,5]. Describiendo de forma general las alteraciones que ocurren para que se presente un desarrollo neoplásico son las siguientes: A. Alteraciones en la señalización celular que es mediado por polipéptidos, hormonas lipofílicas como esteroides, retinoides y hormonas tiroideas que potentes regulares del comportamiento celular; B. Alteraciones en la regulación del ciclo celular, todas las células eucariotas presentan una regulación de su ciclo celular mediado por la activación periódica de ciclinas dependientes de cinasas (Cdk), mismas que

al presentar alteraciones generan una disregulación del ciclo celular con tendencia hacia la división y crecimiento desorganizados; C. Inestabilidad genética y alteraciones en la reparación del DNA, el camino hacia la neoplasia envuelve una acumulación de daño genético que no fue reparado y que se preservando a través de sucesivas divisiones generando una expansión clonal. D. Alteración de las telomerasas, las células somáticas presentan un reloj molecular que es el acortamiento telomérico, los telómeros son capuchas protectoras en el final de los cromosomas que se componen de secuencias repetidas en tándem ricas en guanina (GGGTTAn), las telomerasas son ribonucleoproteínas con acción enzimática que contribuyen a la regulación de la longitud del telómero posterior a cada evento de división celular. E. Alteraciones en apoptosis, cuando a pesar de que existe un daño celular, lo que normalmente es mediado por vías preapoptóticas hacia una senescencia y/o muerte celular, es tolerado y la célula sigue su división normal con cierto cúmulo de alteraciones genómicas establecidas. F. Alteración en adhesión celular y angiogénesis, que intervienen en el crecimiento desorganizado de diferentes procesos neoplásicos.

Por lo anterior, a nivel genómico el cáncer es producido por errores en la programación génica normal que guía la multiplicación, especialización y muerte celular. La teoría del daño múltiple sugiere que las células acumulan mutaciones aleatorias en sus genes. Las mutaciones pueden afectar genes críticos que normalmente controlan rigurosamente la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células (protooncogenes, genes supresores tumorales o genes de reparación del DNA). Si alguna célula acumula suficientes mutaciones que pueden ir de cinco a diez mutaciones, convirtiéndose en el transcurso de varios años en un fenotipo maligno, dando lugar a clones celulares que proliferan de forma descontrolada generando así una neoplasia [1,6]. (Fig. 1)

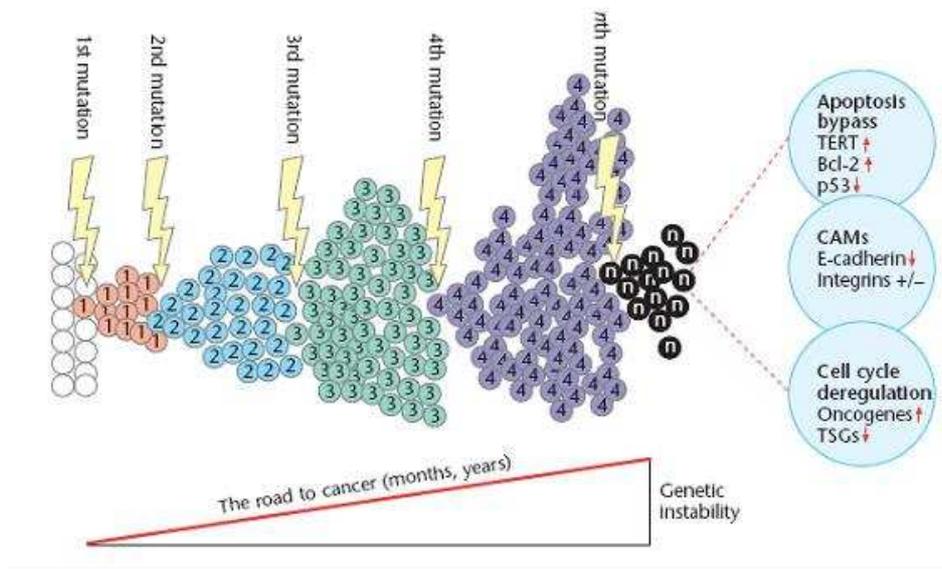


Fig. 1 Desarrollo de un proceso neoplásico. (ELS 2005)

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en el mundo, en el año 2004 la OMS calculó un total de 1,200,000 casos nuevos, lo que corresponde al 12% del total de cánceres en la mujer. Tiene una frecuencia que varía ampliamente entre diferentes regiones del mundo, siendo los países europeos y Norteamérica los que presentan las más altas incidencias mientras que países que corresponden a Asia y África demuestran una tasa menor. En América latina existen países en los cuales la incidencia llega a ser tan elevada como en Europa y Norteamérica siendo principalmente en Uruguay y Argentina, mientras el resto de los países latinoamericanos presentan tasas menores, lo cual se ha tratado de explicar en base a modelos de origen étnico con mayor panmixia en la mayoría de los países latinoamericanos incluyendo a México. En Estados Unidos el cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente, se estimaron 211,300 nuevos casos hasta el año 2006 que representaron el 32% del total de cánceres de la mujer en ese país. [10-11].

En nuestro país el cáncer de mama ocupa el segundo lugar como causa de muerte, principalmente en mujeres mayores de 35 años, con un 17% y con una tendencia al aumento de la mortalidad de acuerdo al registro histopatológico de

neoplasias malignas de la secretaría de salud. Se estima que el 15% a 20% de mujeres con cáncer de mama tienen historia familiar de la enfermedad. El cáncer intraductal es el tipo de cáncer mamario más frecuente asociado al desarrollo de esta neoplasia en forma esporádica. Dos genes principales han sido identificados para susceptibilidad de cáncer de mama *BRCA1* y *BRCA2* [10-12].

El estudio de esta neoplasia se ha dificultado debido a la gran heterogeneidad histológica, molecular, fenotípica y clínica que presenta. La incapacidad de clasificar los tumores en grupos clínicos y biológicos relativamente homogéneos, obstaculiza el diagnóstico y la búsqueda de terapias efectivas. La amplia diversidad de tumores, aún los que derivan del mismo tejido, presentan un reto para un diagnóstico temprano y acertado. La identificación y el entendimiento de los genes involucrados en esta patología, sus interacciones génicas, las alteraciones bioquímicas y genéticas resultan de trascendental importancia [13,14].

Se han descrito otros factores asociados al desarrollo de esta neoplasia en forma esporádica, que es la forma más común de este cáncer. Un factor digno de consideración son los anticonceptivos hormonales; algunas investigaciones sugieren que hay una conexión entre el uso de los anticonceptivos y un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Otras causas asociadas al cáncer mamario esporádico descritas son: nuliparidad, menarca prematura, edad avanzada, antecedentes familiares de cáncer de mama y mutaciones en los genes *P53*, *ATM* (ataxia-telangiectasia), *Myc*, *Her2/neu*, progesterona, *ER alpha* y *ER* [15-17]

Clasificación patológica del Cáncer de Mama

El cancer de mama es un adenocarcinoma que puede iniciar de dos formas, carcinoma ductal y/o lobular, en el que la neoplasia se desarrolla en los conductos de la mama o en los lóbulos respectivamente. Las mayoría de los casos de cáncer de mama son de origen ductal. Otra clave para la clasificación patológica es entre adenocarcinoma in situ y carcinoma invasivo, lo cual depende de la limitación al conducto o el lóbulo (etapa 0, o in situ) o de su expansión a nivel microscópico al parénquima mamario adyacente (invasivo o infiltrativo).

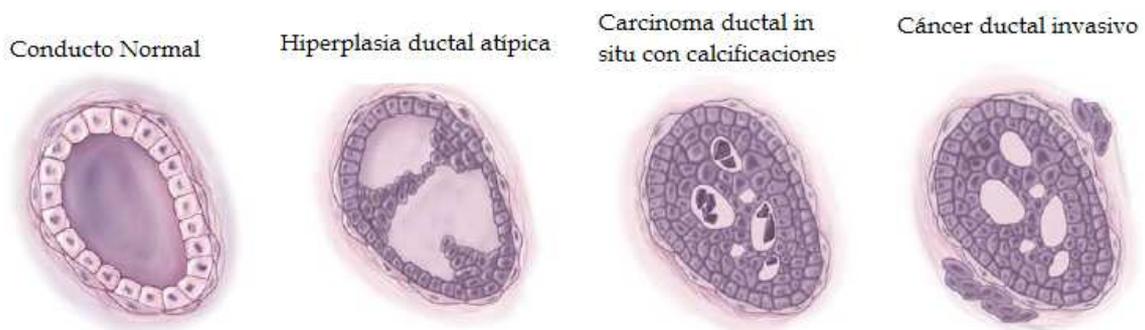


Fig. 2. Progresión morfológica del cáncer de mama ductal.

La estadificación del cáncer de mama se basa en el sistema TNM, definido por el American Joint Committee on Cancer, el cual toma en cuenta el tamaño del tumor (T), el compromiso de nódulos linfáticos regionales (N), y la presencia o ausencia de metástasis más allá de los nódulos linfáticos regionales (M). Usando este sistema los estadios van desde la etapa 0 a la IV. (Tabla 1). La etapa 0 corresponde a cáncer in situ, mientras que las etapas I a IV corresponden a cáncer invasivo, siendo la etapa IV la que implica metástasis.

Criterio para estadificar los tumores de mama de acuerdo con el American Joint Committee on Cancer Clasificación TNM			
	Tumor Primario (T)	Estado de nódulos linfáticos regionales (N)	Metástasis a Distancia (M)
Etapa 0	Carcinoma in situ	Sin evidencia de cáncer en nódulos regionales	No
Etapa I	Tumor ≤ 2 cm	Sin evidencia de cáncer en nódulos regionales	No
Etapa IIA	Sin evidencia de tumor primario	Metástasis de 1 - 3 nódulos	No
	Tumor ≤ 2 cm	Metástasis de 1 - 3 nódulos	No
Etapa IIB	Tumor > 2 cm pero ≤ 5 cm	Sin evidencia de cáncer en nódulos regionales	No
	Tumor > 2 cm pero ≤ 5 cm	Metástasis de 1 - 3 nódulos	No
	Tumor > 5 cm	Sin evidencia de cáncer en nódulos regionales	No
Etapa IIIA	Sin evidencia de tumor primario	Metástasis de 4 - 10 nódulos	No
	Tumor ≤ 2 cm	Metástasis de 4 - 10 nódulos	No
	Tumor > 2 cm pero ≤ 5 cm	Metástasis de 4 - 10 nódulos	No
	Tumor > 5 cm	Metástasis de 1 - 3 nódulos	No
	Tumor > 5 cm	Metástasis de 4 - 10 nódulos	No
Etapa IIIB	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared costal o piel	Sin evidencia de cáncer en nódulos regionales	No
	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared costal o piel	Metástasis de 1 - 3 nódulos	No
	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared costal o piel	Metástasis de 4 - 10 nódulos	No
Etapa IIIC	Cualquier característica de tumor	Metástasis de > 10 nódulos	No
Etapa IV	Cualquier característica de tumor	Cualquier implicación de nódulos linfáticos	Sí

Tabla 1. Clasificación TNM.

Riesgo de cáncer de mama esporádico y polimorfismos de nucleótido único (SNP).

Se ha demostrado que existe una predisposición dominante que confiere un riesgo aumentado para el desarrollo de cáncer de mama al estudiar los genes BRCA1 y BRCA2, las mutaciones en ambos se relaciona fuertemente con un incremento dramático en el riesgo de cáncer de mama cuando existen antecedentes familiares (menos del 5% de los casos), sin embargo, no presentan la misma asociación cuando se presenta la forma esporádica, pero hay evidencia de que los polimorfismos de nucleótido único (SNP) muestran una contribución en el incremento del riesgo de cáncer de mama esporádico. [8,9]

Aunque el efecto de un SNP de forma individual es generalmente pequeño, el efecto de una combinación de SNP relativamente funcionales puede ser aditivo o sinérgico para contribuir al aumento de riesgo de cáncer de mama, lo cual puede ser explicado mediante epistasis, interacción gen-gen y modelos poligénicos que confieran mayor susceptibilidad al desarrollo de dicha neoplasia.

Un polimorfismo de nucleótido único de sus siglas en inglés SNP (Single Nucleotide Polymorphism) constituye una forma de variación en la secuencia del genoma que involucra una sola par de bases que es alternativa (T,C,G,A) y que presenta una frecuencia de más de 1% en la población sin generar directamente un fenotipo patológico específico. En principio, dos, tres o cuatro nucleótidos alternativos en cualquier locus en particular puede ser clasificado como un SNP, únicamente cuatro diferentes SNP's bialélicos existen: una transición (T/C) y tres transversiones (T/A, T/G, C/G), las otras dos sustituciones (A/G, A/C) son el complemento de la cadena representada por las dos primeras indicadas (T/C, T/G). Se estima que el genoma en el ser humano presenta cuatro a cinco SNPs por cada 1 000 bases, lo cual, si se calcula todo el genoma humano, corresponde a más de 10 000 000 de SNPs. Los SNP's contribuyen a la variación fenotípica, por ejemplo presión arterial, metabolismo de fármacos, susceptibilidad a enfermedades, de una forma que aún no se ha comprendido totalmente. [13].

Los efectos fenotípicos de los polimorfismos se basan en efectos genéticos directos, interacciones gen-gen así como interacciones gen-ambiente, afectando diferentes mecanismos de aumento o reducción de transcripción, alteraciones postranscripcionales o actividad postraduccional, así como cambios en la estructura terciaria del producto proteico.

Actualmente el valor clínico que tienen los SNPs en el diagnóstico de cáncer de mama es para considerar posibilidades de riesgo comparados con marcadores tradicionales como son los antecedentes familiares e índice de masa corporal. Por lo cual las consecuencias clínicas que su estudio ha generado repercuten en el tipo de dieta de las pacientes, la optimización del índice de masa corporal, la realización de ejercicio físico, evitar el consumo de alcohol y ciertos fármacos, como los anticonceptivos orales y terapias hormonales de reemplazo, la participación de las mujeres en programas de tamizaje para la detección de cáncer de mama esporádico entre las edades de 50 y 70 años. Medidas más drásticas como lo son la mastectomía radical o anejo con tratamientos antineoplásicos no están indicados al establecer un riesgo en base al análisis de SNPs.

Las asociaciones entre los SNPs y el cáncer de mama esporádico generalmente se realiza por estudios de asociación, existen, sin embargo, estudios de casos y controles anidados suficientemente grandes y prospectivos como son el Nurses' Health Study, The Physicians' Health Study y el Framingham Offspring Study, dichos estudios han establecido varios SNPs como pequeños pero significantes factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama esporádico, por ejemplo en el receptor de andrógenos, en el receptor de progesterona, en el receptor de vitamina D y en genes que intervienen en la reparación del DNA.

Hefler y cols, encontraron mediante una investigación de asociación 10 SNP involucrados en la vía del metabolismo de estrógenos en 396 pacientes con cáncer de mama comparada con sus controles. Kaklamani demostraron una alta evidencia de asociación entre el cáncer de mama y el SNP *GA en el factor de crecimiento transformante b (*TGFBR*). En un meta-análisis de siete estudios de asociación, ellos encontraron que las portadoras del polimorfismo *TGFBR1**6^a presentaron un riesgo de desarrollo de cáncer (OR 1.48; 95% CI 1.11-1.96) con efecto de dosis génica, siendo el riesgo mayor en homocigotas que en heterocigotas.

Diferentes estudios han demostrado la asociación entre el cáncer de mama esporádico y polimorfismos, siendo los más representativos: en el receptor de andrógenos el polimorfismo repetido CAG con un incremento de a 70% de cáncer de mama (OR 1.7; 95% CI 1.2–2.4); en el gen *FOK1* (OR 1.34; 95% CI 1.06–1.69); en genes de reparación de DNA *XRCC1* Arg194Trp y *XRCC2* Arg188His (OR 0.34; 95% CI 0.16–0.72).

En la tabla 1 se muestran los SNP que han sido reportados asociados a un incremento en el riesgo de cáncer de mama.

XPD-[Lys751Gln]	IL1A-[Ala114Ser]	
COMT-[Met108/158Val]	GADD45-[C(IVS3+168)T]	BARD1-[Pro24Ser]
GSTP1-[Ile105Val]	PTEN-[(IVS4+109)ins/del5]	IL13-[Arg130Gln]
MTHFR-[Ala222Val]	ESR1-[Ser105Ser]	p27-[Val109Gly]
CCND1-[Pro241Pro]	G-CSF-[Leu185Leu]	GSTM3-[4595 (3bp ins/del)]
MMP1-[IG(-1607)2G]	ESR1-[Pro325Pro]	TNFA-[G(-308)A]
IL10-[G(-1082)A]		CYP17-[C(518)T]

Tabla 2. SNP relacionados con aumento de riesgo de cáncer de Mama (BMC cáncer 2006).

Existe dificultad en como identificar cuáles de los miles de genes expresados por una célula neoplásica típica, solos o en combinación, son los implicados en el proceso neoplásico. La mayoría de los diferentes tipos de cáncer tienen tal cantidad de cambios moleculares que es difícil distinguir entre aquellos que son críticos, en la progresión tumoral y aquellos que son por epifenómenos de inestabilidad génica o anomalías en la reparación del DNA. Definir el número de genes implicados en diferentes procesos neoplásicos permitirá preguntar cuántos de ellos presentan una expresión en un tejido o particular, qué variación existe en los niveles relativos de expresión, y cuántos de estos genes se expresan de manera única en una célula, cuáles son letales o cuales esenciales. La identificación de los eventos tempranos en la carcinogénesis debe ser la mejor esperanza, así será posible identificar los eventos que predisponen a otros cambios secundarios antes de que ocurran [60,61].

Genotipificación de SNP.

El principal objetivo de la investigación en genómica es identificar genes que contribuyen al desarrollo de alguna enfermedad en combinación con ambiente determinado. El conocimiento de dichos genes y su mecanismo molecular dará lugar al desarrollo de mejores estrategias para métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades, en este caso el cáncer de mama.

Debido a las características previamente descritas de los SNPs resultan relativamente fáciles de analizar en una forma automatizada. Una forma automatizada lo constituyen los microarreglos. Un microarreglo de DNA se integra por conjuntos de clonas de DNA diferentes colocados estratégicamente en sitios separados en la superficie de un protaobjetos para microscopio especificando coordenadas x,y precisas en una parrilla miniaturizada, con la finalidad de hibridar secuencias blanco de algún tejido en específico.

Actualmente existen dos métodos que son usados frecuentemente en el análisis de SNP mediante microarreglos: microarreglos de oligonucleótidos de hibridación templada a fase sólida (microarreglos en GeneChip); Microarreglos de extensión en primers de DNA (microarreglos APEX). Los más usados son los primeros descritos, por lo cual se describirán a continuación. Los microarreglos en GeneChip, distribuidos por Affymetrix (TM) utilizan dos colores de hibridación ensayo por ensayo para cada base. Mediante la cohibridación la secuencia de referencia y la secuencia blanco en conjunto es posible observar sitios polimórficos en una pantalla mediante el análisis con un software determinado, con lo cual es posible la identificación del SNP y la base normal.(Fig. 3 y 4)

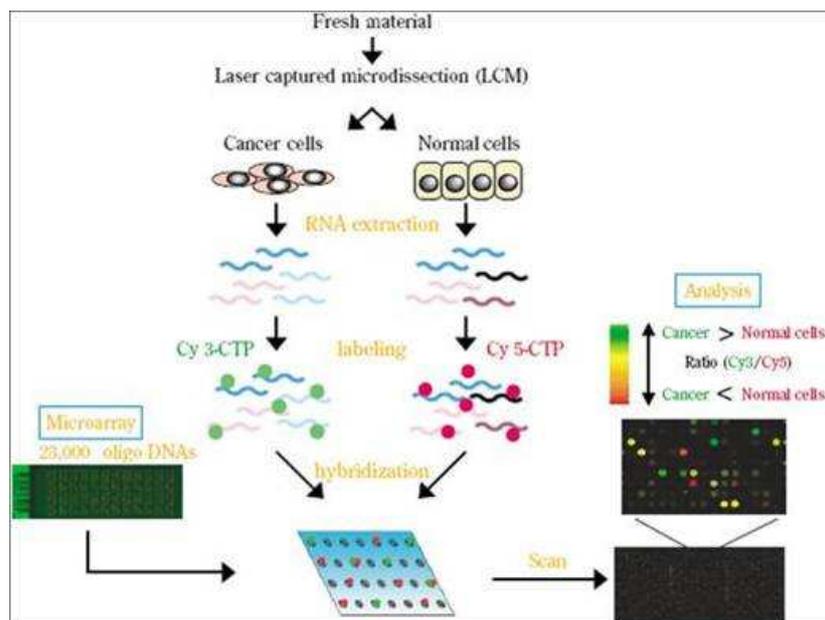


Fig. 3. Procedimiento para la obtención de Microarreglo de una secuencia de DNA de células neoplásicas y células normales.

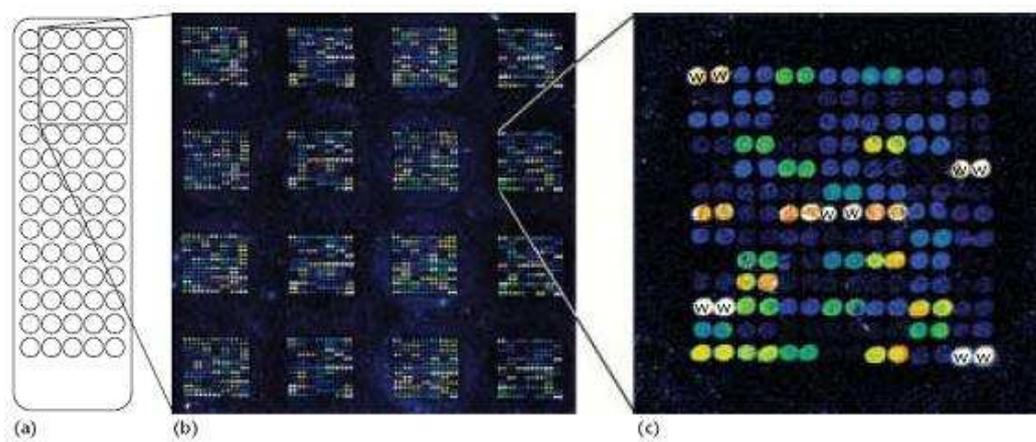


Fig. 4. Microarreglo de una secuencia de DNA. (a) vista esquemática del portaobjetos de microscopio dividido en 80 subarreglos. (b) Imagen de la fluorescencia de 16 subarreglos. (c) imagen de fluorescencia de una reacción, detectando el polimorfismo específico.

Sistemas de análisis masivo

El conocimiento en el ámbito molecular de los cambios necesarios para el avance del cáncer es una de las áreas de mayor desarrollo en la investigación biomédica actual, por lo que han surgido nuevas tecnologías útiles en la comprensión de enfermedades complejas como el cáncer. Los métodos tradicionales de la Biología Molecular trabajan básicamente sobre un gen en un experimento, esto es limitado ya que las interacciones de éste gen con otros son difíciles de conocer, por lo que es necesario un análisis sistemático de los patrones de expresión que permitan revelar funciones y rutas de los genes. Métodos de análisis masivo como: el microarreglo ("Microarray") que miden la expresión de cientos a miles de genes simultáneamente (a veces referido como perfiles de expresión génica), el análisis serial de la expresión génica (SAGE), aislamiento de secuencias expresadas (ETS's) o expresión diferencial ("Differential display"), permiten estudiar el desarrollo neoplásico desde un punto de vista integral [1,13,62,63].

Perfiles génicos de expresión.

El perfil molecular, la clasificación de tejidos u otros especímenes para propósitos de diagnóstico, pronóstico y predicción basados en la expresión de múltiples genes, es una tecnología que da grandes promesas para optimizar el manejo de pacientes con cáncer. En teoría, este conocimiento puede llevar al manejo individualizado y optimizado de los pacientes. Por ejemplo, la toxicidad puede ser disminuida evitando terapias innecesarias en pacientes que podrían tener un excelente pronóstico sin tratamiento y en aquellos que no responderán a regímenes disponibles [64]. Los estudios de análisis masivo se han utilizado para redefinir la clasificación del cáncer, mediante la generación de perfiles moleculares de pacientes con cáncer de mamá. Existe una influencia del tipo celular sobre los perfiles de expresión, cada célula posee una firma genética o huella genética que les caracteriza [65].

Estos perfiles han revelado varios genes que son críticos en la progresión de una célula normal en un fenotipo oncogénico, lo cual contribuye con una subclasificación de los tumores en nuevos grupos, en el pronóstico, y en general en el entendimiento del cáncer. Los microarreglos son una tecnología en transición de aplicación de ciencia básica al uso en la clínica. Los microarreglos pueden determinar la regulación génica global de un individuo con cáncer, lo cual puede ser útil en formular nuevos marcadores potenciales en el diagnóstico y la respuesta terapéutica, con una terapia de marcadores individualizada para el paciente [1,14,66]. Por ejemplo, introducir genes en tejidos específicos a manera de terapia y revertir padecimientos oncológicos [67].

En los últimos años varias publicaciones han descrito el uso de arreglos de gran escala para perfilar diferencias en patrones de expresión entre cáncer y células normales, estos cánceres incluyen linfoma [68], mama [13,69] carcinoma de colon [70], próstata [71], cáncer gástrico [72]. Los resultados han emergido con enorme variabilidad en los patrones de expresión. Una característica distintiva descubierta en todos estos estudios es que, todos los cánceres de diferentes individuos difieren extensivamente en sus patrones de

expresión, sin embargo los agrupamientos de los patrones de expresión que fueron detectados, indican la existencia de sub-grupos de cáncer lo cual difiere en sus orígenes celulares o estado de diferenciación. Selecciones de arreglos de alto rendimiento probablemente serán integrales a la patología molecular que será creciente [69,73].

Perou *et al*, en el 2000, revisan el progreso en la investigación que utiliza patrones de expresión genética mediante microarreglos para distinguir subtipos biológicamente significativos de tumores, y demuestran el adelanto que ha sido hecho para desarrollar plantillas de perfiles dada la amplia diversidad de tumores, lo cual puede reflejar un beneficio central para un pronóstico temprano y acertado. Existe una influencia del tipo celular sobre los perfiles de expresión, aunque cada célula posee una firma genética que caracteriza a éstos. La heterogeneidad celular de tumores sólidos (en donde diferentes partes de un tumor pueden mostrar diferentes perfiles) permite la valoración de la contribución relativa de los diferentes tipos celulares para un perfil global [13].

García *et al*, en el 2005, en un estudio con tumores sólidos mediante microarreglos de cDNA, desarrollan perfiles por diferencias o similitudes, encuentran diferencias entre el diagnóstico histopatológico y los perfiles a nivel molecular, en donde carcinomas mamarios etapa II se comportan molecularmente como carcinomas etapa III y viceversa, además. Esto permite conocer el estado del proceso celular, la co-expresión de genes y/o encontrar nuevos genes que den pistas de ganancia o pérdida de función entre los tumores y el tejido no neoplásico [73].

Justificación y Planteamiento del Problema.

El cáncer de mama es un problema de salud a nivel nacional, ya que ocupa el segundo lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años y se espera que en la próxima década sea la principal causa de muerte de dicho grupo poblacional en México. Aún cuando se conocen algunos genes y

proteínas asociados al origen del cáncer de mama con predisposición hereditaria, el origen y el desarrollo de todas formas de presentación esporádica son poco conocidas y estudiadas en nuestro país.

El estudio de las neoplasias se ha dificultado debido a la gran heterogeneidad histológica y clínica que presentan. La identificación y el entendimiento de los genes involucrados en estas patologías, sus interacciones génicas, las alteraciones bioquímicas y genéticas resultan de trascendental importancia. A partir de la información generada mediante perfiles de expresión es posible continuar con la caracterización de esta enfermedad en el ámbito molecular al nivel de proteínas. El conocimiento en el ámbito molecular de los cambios necesarios para el avance del cáncer es una de las áreas de mayor desarrollo en la investigación biomédica actual. El uso de las metodologías genómicas planteadas en nuestro estudio permitirá conocer con precisión estas enfermedades y definir en un futuro posibles biomarcadores moleculares que las caractericen.

Dado que el frecuente empalme alternativo esencial en la complejidad fisiológica y que por otra parte, los efectos fenotípicos dependen de una sutil y permanente interacción de los factores genéticos con los ambientales, la medicina post-genómica permite generar catálogos completos y precisos de los genes humanos y las redes de su regulación. Una de las revoluciones de la Medicina Genómica y Post-Genómica es el advenimiento de una atención preventiva plenamente individualizada, en la que se descifren los factores de susceptibilidad genética y su interacción con variables de índole ambiental. Con relación al cáncer no se han realizado estudios de este tipo y de esta magnitud en nuestra población. El presente protocolo de investigación se avoca originalmente a profundizar en estos aspectos con una orientación preventiva.

Pregunta de investigación.

1. ¿Cuáles polimorfismos de nucleótido único (SNPs) están presentes en mujeres mexicanas con cáncer de mama de presentación esporádica?
2. ¿Los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en el tejido neoplásico mamario son los mismos encontrados en sangre periférica de las mujeres con cáncer de mama de presentación esporádica estudiadas?

Objetivos.

1. Determinar mediante microarreglos de genotipificación los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en mujeres mexicanas con cáncer de mama de presentación esporádica.
2. Determinar si los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en el tejido neoplásico mamario son los mismos que se encuentren en sangre periférica de las mujeres estudiadas con cáncer de mama de presentación esporádica.

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Observacional.

Transversal.

MÉTODOS.

El estudio se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, en colaboración con el Hospital de Oncología del mismo complejo hospitalario. En la cita de primera vez de la consulta externa de cáncer de mama del Hospital de Oncología se explicó el protocolo de estudio y posterior a la firma de la carta de consentimiento informado se realizaron los procedimientos que posteriormente se describen. Se analizaron 50 tumores mamarios esporádicos, vírgenes a tratamiento, en cualquier estadio. Como control para los SNPs se utilizó tejido adyacente sano de las mismas pacientes estudiadas. Las muestras de tumores mamarios fueron obtenidas de las biopsias realizadas para estudio histopatológico de aquellas mujeres con sospecha de cáncer de mama de presentación esporádica y posteriormente confirmados mediante estudio histopatológico y marcadores tumorales específicos.

DISEÑO MUESTRAL.

Muestreo no probabilístico consecutivo de las pacientes que acudieron a la consulta externa de cáncer de mama en el Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, que cubrieran los criterios de inclusión.

Tamaño de la muestra: 50 pacientes con cáncer de mama esporádico en quien se estudiará tejido mamario (tumoral y tejido adyacente sano)

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES.

Cáncer de mama.

1. Definición conceptual. Enfermedad neoplásica maligna del tejido de la mama.
2. Definición operacional. Enfermedad neoplásica maligna del tejido de la mama diagnosticado mediante estudio histopatológico.
3. Tipo de variable. Cualitativa.
4. Escala de medición. Nominal, dicotómica.

Polimorfismo de nucleótido único (SNP)

1. Definición conceptual. Variación en la secuencia genómica que involucra a un solo nucleótido y que presenta una frecuencia en la población de más de 1%.
2. Definición operacional. Variación en la secuencia genómica que involucra a un solo nucleótido, que presenta una frecuencia de más de 1% de la población en estudio.
3. Tipo de variable. Cualitativa.
4. Escala de medición. Nominal, dicotómica.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

1. Mujeres mayores de 18 años con diagnóstico de cáncer de mama de presentación esporádica (Sin antecedentes familiares de cáncer de mama en 2 generaciones, así como tampoco síndromes de cáncer familiar) en cualquier estadio y vírgenes a tratamiento.
2. Que tuvieran al menos 3 generaciones previas en México.
3. Que aceptaran ingresar al estudio mediante firma de la carta de consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

1. Mujeres en quienes no fue suficiente el material otorgado en la biopsia para la extracción del DNA.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.

Se trabajó con tejido fresco (tejido tumoral y tejido adyacente sano) de 50 pacientes que acudieron de forma consecutiva a toma de biopsia y/o manejo quirúrgico de tumor mamario (cáncer de mama esporádico) en el Hospital de Oncología de CMN Siglo XXI IMSS independientemente del estadio y clasificación. El traslado de los tejidos frescos (tejido tumoral y tejido adyacente sano) fue en un contenedor de nitrógeno líquido y se almacenará en ultracongeladores a -80°C , se resguardó en el laboratorio de Genética Molecular del Hospital de Pediatría, de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, CMN SXXI. (Tabla 3).

Número	Edad en años	Muestra	Clasificación	Estudio histopatológico
1	43	CA Mama Izquierda	T3N0M0	Carcinoma ductal infiltrante
2	56	CA Mama Izquierda	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
3	48	CA Mama Derecha	T3BN1M0	Carcinoma ductal infiltrante
4	55	CA Mama Derecha	T3N0M0	Carcinoma ductal infiltrante
5	60	CA Mama Derecha	T4BN1M0	Carcinoma ductal infiltrante
6	40	CA Mama Izquierda	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
7	39	CA Mama Derecha	T3N0M0	Carcinoma ductal infiltrante
8	41	CA Mama Derecha	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
9	36	Ca Mama Derecha	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
10	33	Ca Mama Izquierda	T4BN0M0	Carcinoma ductal infiltrante
11	52	CA Mama Derecha	T2N0M0	Carcinoma ductal infiltrante
12	35	CA Mama Derecha	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
13	34	CA Mama Izquierda	T2N0M0	Carcinoma intraductal
14	42	CA Mama Izquierda	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
15	45	CA Mama Derecha	T3BN1M0	Carcinoma Lobulillar Infiltrante
16	34	CA Mama Izquierda	T2N0M0	Carcinoma ductal infiltrante
17	59	CA Mama Izquierda	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
18	62	CA Mama izquierda	T4N0M0	Carcinoma ductal infiltrante
19	32	CA Mama derecha	T3N1M0	Carcinoma Ductal Infiltrante
20	49	CA Mama derecha	T3N0M0 EC IIB	Carcinoma Ductal Infiltrante
21	36	CA Mama derecha	EC III A	Carcinoma Ductal Infiltrante
22	56	CA Mama izquierda	T2N2M0 EC IIIA	Carcinoma lobulillar
23	45	CA Mama derecha	T2N2M0 EC IIIA	Carcinoma Canalicular infiltrante
24	53	CA Mama izquierda	T2N1M0 EC IIB	Carcinoma Ductal infiltrante
25	37	CA Mama derecha	T3N1M0 EC IILA	Carcinoma Ductal infiltrante
26	58	CA Mama derecha	T4BN2M1	Carcinoma lobulillar
27	60	CA Mama derecha	T4B N2M0 EC III B	Carcinoma Lobulillar Infiltrante
28	51	CA Mama izquierda	T4B N0M0 EC	Carcinoma Ductal Infiltrante
29	54	C.A Mama izquierda	T3N2M0 EC IIIA	Carcinoma Tubulolobulillar infiltrante
30	40	CA Mama derecha	T2N0M0 EC IIB	Carcinoma intraductal
31	40	CA Mama derecha	T4BN1M0 EC IIIA	Carcinoma tubular infiltrante
32	42	CA Mama izquierda	T3N1M0 EC IIIA	Carcinoma Ductal Infiltrante
33	34	CA Mama derecha	T3N1M0	Carcinoma Ductal Infiltrante
34	56	CA Mama izquierda	T2N1M0 EC IIB	Carcinoma Ductal Infiltrante
35	48	CA Mama derecha	EC III A	Carcinoma Canalicular infiltrante
36	53	CA Mama derecha	T3N1M0 EC IIIA	Carcinoma intraductal
37	59	CA Mama izquierda	T3N1M0 EC IIIA	Carcinoma Ductal Infiltrante
38	33	CA Mama derecha	T4BN2M0 EC IIIB	Carcinoma Canalicular infiltrante
39	58	CA Mama derecha	T4BN2M0 EC IIIB	Carcinoma Ductal Infiltrante
40	48	CA Mama izquierda	T4BN2M0 EC III	Carcinoma Canalicular infiltrante
41	63	CA Mama izquierda	T4BN1M0 EC IIIB	Carcinoma Ductal Infiltrante
42	60	CA Mama derecha	T3N1M0	Carcinoma Ductal Infiltrante
43	47	CA Mama derecha	T3N1M0 EC IIA	Cambios celulares columnares
44	29	CA Mama izquierda	T3N2M0 EC IIIB	Carcinoma Ductal infiltrante
45	76	CA Mama derecha	T4BN2M0 EC IIIB	Carcinoma Ductal Infiltrante
46	45	CA Mama izquierda	T2N0M0 EC IIA	Carcinoma Ductal Infiltrante
47	38	CA Mama derecha	T2N2M0	Carcinoma Ductal Infiltrante
48	54	CA Mama derecha	T1N0M0	Carcinoma lobulillar
49	62	CA mama izquierda	T3N1M0	Carcinoma ductal infiltrante
50	68	CA mama izquierda	T2N1M0	carcinoma intraductal

Tabla 3. Muestras de tumores estudiadas.

Obtención de DNA.

Para la extracción de DNA a partir de tumor, se pesó la muestra tanto de tejido tumoral como de tejido adyacente sano, el tejido congelado fue colocado posteriormente sobre un mortero, en presencia de nitrógeno líquido, utilizando proteínasa K y el paquete comercial QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante, donde fue molido, cortado y fraccionado en pequeñas piezas para obtener 20 mg de tejido correspondiente. Se llevó a cabo la extracción de DNA de tejido tumoral y adyacente sano en un sistema automatizado para la purificación de ácidos nucleicos QIAcube (Quiagen), asegurando concentraciones y pureza similar entre las muestras. Se verificaron las concentraciones e integridad de las muestras de DNA, mediante espectrometría (nanodrop technologies) y electroforesis en geles de agarosa. Las muestras de DNA fueron almacenadas a -70°C , hasta su uso.

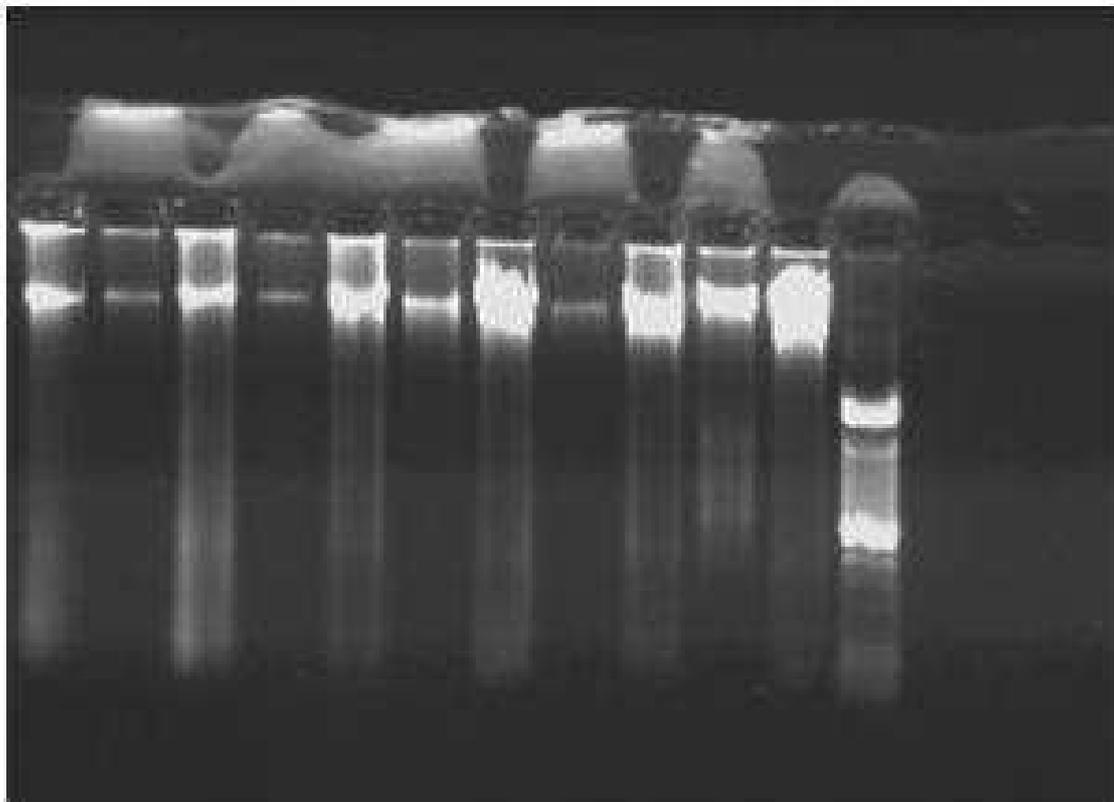


Figura. 5. Electroforesis en gel de agarosa para verificación de concentración e integridad de las muestras de DNA obtenidas.

Genotificación.

Para determinar los polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP's) se realizó en el DNA Genómico previamente purificado, digestión, fragmentación, desnaturalización y marcaje, de acuerdo al protocolo del fabricante de los microarreglos GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 5.0 Nsp/Sty (Affymetrix) con 500,000 SNPs. El marcaje e Hibridación de los microarreglos de SNP's se llevó a cabo en una estación de fluidos GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) y un horno de hibridación GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix). La lectura de los chips se llevó a cabo en GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Para el análisis e interpretación de datos se utilizaron los siguientes programas para el almacenamiento de la información GCOS administrator (Affymetrix) OrgAnización, adquisición de imagen e análisis inicial de la información GCOS Manager y el GeneChip Operating Software (Affymetrix). Para la entrega de la información, la visualización e interpretación biológica fue obtenida con Data Mining Software y NetAffx Analysis Center (Affymetrix).

VALIDACIÓN.

Una vez obtenidos los datos de los polimorfismos mediante el análisis de microarreglos GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 5.0 Nsp/Sty (Affymetrix) con 500,000 SNPs se seleccionaron aquellos que han sido reportados en la literatura internacional asociados al riesgo para desarrollar cáncer de mama de presentación esporádica, siendo elegidos por el OR correspondiente tres SNPs, *CASP8* D302H, *PGR* V660L y *TGFB1* L10P.

Para la validación de la presencia de los SNPs previamente descritos se solicitó al laboratorio UNIPARTS (MR) la síntesis de los primers específicos para su identificación (Tabla 4)

Line No.	Sequence Description	Bases Qty.	Sequence	Scale
1	Forward casp8		GCTTTGACCACGACCTTTGAAG	100nmole
2	Reverse casp8		GTTACTGTGGTCCATGAGTTGGTAGAT	100nmole
3	FAM probe (detects D)		CAAGCCCCACGATGACTGCACA	100nmole
4	TET probe (detects H)		CAAGCCCCACCATGACTGCACA	100nmole
5				
6	Forward L		TCCGGGCTGCGGCTGCTGCT	100nmole
7	Forward P		TCCGGGCTGCGGCTGCTGCC	100nmole
8	Reverse primer LP		GTTGTGGGTTTCCACCATTAGCACGC	100nmole
9				
10	Forward PR4		ATACGGTATCCATGACATGAG	100nmole
11	Forward PR4		AAGTATTTTCTTGCTAAATGCTG	100nmole

Tabla 4. Secuencia específica para la identificación de cada SNP seleccionado.

Los primers fueron entregados en estado liofilizado por lo cual fueron resuspendidos en agua desionizada (mili-Q) para llegar a un volumen total de 1nmol/L, posterior a la resuspensión se obtuvo una reserva para trabajo a una concentración de 0.1 nmol (100 picomoles) al tomar 1 microlitro de cada resuspensión y agregando 9 microlitros de agua mili-Q . para determinar la integridad de las secuencias en la dilución ya informada se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 15 minutos a 90 Volts y se observó la óptima integridad de los mismos (figura 6).

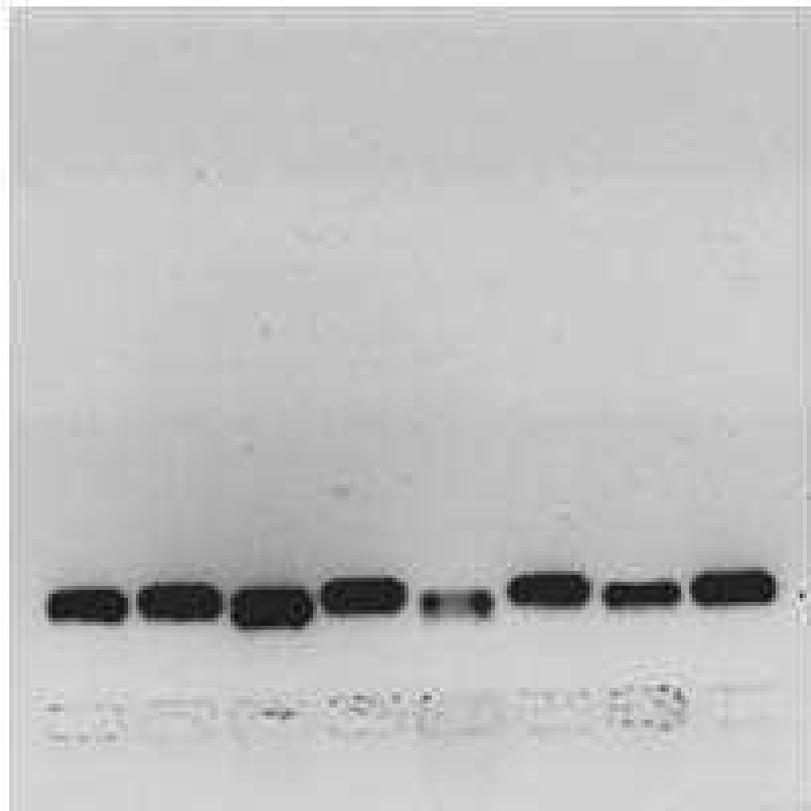


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación de la integridad de las secuencias de primers a una concentración de 0.1 nmol.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DE BIOINFORMÁTICA

La información obtenida de cada tumor y tejido adyacente mediante genotipificación se analizó con las herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos y programas de análisis estadístico desarrollados para estos protocolos con el software de las plataformas de los microarreglos el GeneChip Operating Software (Affymetrix) y bases de datos conocidas y disponibles en la red (p.e. KEGG2SBML, SBO, NCBI, SWISS PROT, ENS).

RESULTADOS.

Posterior al análisis mediante las herramientas bioinformáticas basadas en algoritmos para la plataforma de microarreglo GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 5.0 Nsp/Sty (Affymetrix) con 500,000 SNPs se determinaron más de 3000 posibles variables entre las secuencias de DNA correspondientes a tumor y las correspondientes a tejido sano adyacente. Con dichos resultados se consideró la necesidad de validar aquellas secuencias que se encontraron en el tejido tumoral y que han sido reportadas en otros estudios a nivel internacional como SNPs que confieren riesgo para el desarrollo de cáncer de mama eligiendo SNPs, *CASP8* D302H, *PGR* V660L y *TGFB1* L10P. Las secuencias han sido previamente referidas en la metodología.

Con la validación esperamos confirmar la presencia de los polimorfismos previamente descritos tanto en estado homocigoto como en heterocigoto, con lo cual posteriormente al ampliar el tamaño de muestra en un proyecto en el cual se intentará contar con un tamaño de muestras que sea representativo de la zona norte, centro y sur de la República Mexicana podremos establecer OR específicos para cada SNP y su asociación con el riesgo de desarrollo de cáncer de mama de presentación esporádica.

CONCLUSIONES.

Con el presente estudio demostramos la alta variabilidad genómica que existe entre el tejido mamario que ha desarrollado neoplasia y el tejido adyacente sano, con lo cual resulta imperativo considerar a la inestabilidad genómica como un factor determinante para los cambios ya descritos en los resultados.

Existen diferentes estudios en los cuales se le atribuye a la inestabilidad genómica como la causa principal del desarrollo del cáncer en todas sus variedades, sin embargo la dificultad subyace en el hecho de conocer el momento en el cual comienza dicha inestabilidad y más aún demostrar cuáles son los factores que pueden incidir en la misma, ya que no todos los cambios encontrados en el tejido neoplásicos son constitutivos, hemos demostrado que

algunos de los SNPs se presnetan de forma constitutiva sin embargo la mayoría de los mismos se generó en el sitio del desarrollo de la neoplasia. Lo anterior tiene grandes retos de estudio y análisis para comprender si existen cambios genómicos constitutivos que por sí mismos provean de un factor de riesgo totalmente determinable para que en etapas posteriores existan mayores posibilidades de inestabilidad genómica tejido y tiempo específico y origen en consecuencia la alteración del ciclo celular que conlleve de forma invariable al desarrollo neoplásico.

Bibliografía.

1. Kesteloot HE, Zhang J: Differences in breast cancer mortality worldwide: unsolved problems. *Eur J Cancer Prev* 2006, 15: 416-423.
2. OMS. Estadística mortalidad y situación sanitaria registro de defunciones. <http://www.who.int/es/>
3. Alison MR. Cancer. Encyclopedia of Life Sciences 2001, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net.
4. Zaridze DG. Molecular Epidemiology of Cancer. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, 73, No. 5: 532-542.
5. Satyanarayana A. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 2009, 28: 2925–2939.
6. Bertram JS: The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000, 21: 167-223.
7. Barret SV. Breast Cancer. *J R Coll Physicians Edinb* 2010; 40:335–9
8. OMS. Breast Cancer Epidemiology. <http://www.who.int/es/>
9. INEGI. Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer. 2005. www.inegi.gob.mx
10. INEGI. Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS
11. Guimarães TD. Epidemiology of Breast Cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009; 31(5):213-5
12. Wiechec E. High Resolution Melting (HRM) analysis for mutation screening of RGS1, RGS16 and RGS8 in breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2010 Dec 2.
13. Mong FY. Association of gene polymorphisms in prolactin and its receptor with breast cancer risk in Taiwanese women. *Hugo J.* 2009 Dec;3(1-4):31-40
14. Antoniou AC. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer.* 2010 Nov 29.

15. Iwasa Y, Michor F, Komarova NL, Nowak MA: Population genetics of tumor suppressor genes. *J Theor Biol* 2005, 233: 15-23
16. Beesley J, Johnatty SE. No evidence for an association between the earwax-associated polymorphism in ABCC11 and breast cancer risk in Caucasian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Dec 6
17. Fang M. Genomic differences between estrogen receptor (ER)-positive and ER-negative human breast carcinoma identified by single nucleotide polymorphism array comparative genome hybridization analysis. *Fam Cancer*. 2010 Nov 28
18. Brookes JA. Single Nucleotide Polymorphism. *Encyclopedia of Life Sciences* 2005, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net.
19. Kwok PY. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): Identification and Scoring. *Encyclopedia of Life Sciences* 2005, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net
20. Harlid S A candidate CpG SNP approach identifies a breast cancer associated ESR1-SNP. *BMC Cancer*. 2010 Nov 22;10:636.
21. Politopoulos I Genome-wide association of breast cancer: composite likelihood with imputed genotypes. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Nov 3;102(21):1618-27
22. Mealiffe ME. Assessment of clinical validity of a breast cancer risk model combining genetic and clinical information. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Oct 9.
23. The Breast Cancer Association Consortium. Commonly Studied Single-Nucleotide Polymorphisms and Breast Cancer: Results From the Breast Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1382-96
24. Schadt EE, Edwards SW, GuhaThakurta D, Holder D, Ying L, Svetnik V *et al.*: A comprehensive transcript index of the human genome generated using microarrays and computational approaches. *Genome Biol* 2004, 5: R73.
25. Zagouri F, Sargentanis TN, Zografos GC: Precursors and preinvasive lesions of the breast: the role of molecular prognostic markers in the diagnostic and therapeutic dilemma. *World J Surg Oncol* 2007, 5: 57.
26. Salamanca-Gomez F: [New genes involved in the appearance of cancer]. *Gac Med Mex* 2002, 138: 589-590.
27. Ota I, Sakurai A. *et al.* Association between Breast Cancer Risk and the Wild-type Allele of Human ABC Transporter ABCC11. *Anticancer Res*. 2010 Dec;30(12):5189-94.

28. Ren J. Lysyl Oxidase 473 G>A Polymorphism and Breast Cancer Susceptibility in Chinese Han Population. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Sep 26
29. Beeghly-Fadiel A MMP9 polymorphisms and breast cancer risk: a report from the Shanghai Breast Cancer Genetics Study. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Sep;398(2):729-36
30. Wabuyele MB Plasmonics nanoprobe: detection of single-nucleotide polymorphisms in the breast cancer BRCA1 gene. *Eur J Surg Oncol.* 2010 Sep;36 Suppl 1:S36-43
31. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA *et al.*: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406: 747-752.
32. Desai KV, Kavanaugh CJ, Calvo A, Green JE: **Chipping away at breast cancer: insights from microarray studies of human and mouse mammary cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2002, 9: 207-220
33. Kesteloot HE, Zhang J: **Differences in breast cancer mortality worldwide: unsolved problems.** *Eur J Cancer Prev* 2006, 15: 416-423.
34. Bertram JS: **The molecular biology of cancer.** *Mol Aspects Med* 2000, 21: 167-223.
35. Iwasa Y, Michor F, Komarova NL, Nowak MA: **Population genetics of tumor suppressor genes.** *J Theor Biol* 2005, 233: 15-23.
36. Zagouri F, Sargentanis TN, Zografos GC: **Precursors and preinvasive lesions of the breast: the role of molecular prognostic markers in the diagnostic and therapeutic dilemma.** *World J Surg Oncol* 2007, 5: 57
37. Salamanca-Gomez F: **[New genes involved in the appearance of cancer].** *Gac Med Mex* 2002, 138: 589-590.
38. Vogelstein B, Kinzler KW: *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 1998
39. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA *et al.*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, 406: 747-752
40. Namba R, Maglione JE, Davis RR, Baron CA, Liu S, Carmack CE *et al.*: **Heterogeneity of mammary lesions represent molecular differences.** *BMC Cancer* 2006, 6: 275.
41. Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ, Whittaker JL, Walker RA: **Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis.** *Oncogene* 1987, 1: 423-430.
42. Corzo C, Corominas JM, Tusquets I, Salido M, Bellet M, Fabregat X *et al.*: **The MYC oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma.** *Cancer Genet Cytogenet* 2006, 165: 151-156.

43. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Olsson H, Sigurdsson H: **c-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer.** *Int J Cancer* 1992, **51**: 687-691.
44. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG *et al.*: **Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci.** *Nature* 2007, **447**: 1087-1093.
45. Kruglyak L, Nickerson DA: **Variation is the spice of life.** *Nat Genet* 2001, **27**: 234-236.
46. **A haplotype map of the human genome.** *Nature* 2005, **437**: 1299-1320.
47. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD *et al.*: **Global variation in copy number in the human genome.** *Nature* 2006, **444**: 444-454
48. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G *et al.*: **A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms.** *Nature* 2001, **409**: 928-933.

Carta de Consentimiento Informado.

México D.F. a de de 200

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado **Análisis de Polimorfismos de Nucleótido Único Presentes en Cáncer de Mama de Presentación Esporádica en Mujeres Mexicanas Derecho-habientes del Instituto Mexicano del Seguro Social**. Registrado ante la CNIC con el número . El objetivo del estudio es Determinar mediante microarreglos de genotipificación los polimorfismos de nucleótido único (SNPs) presentes en mujeres mexicanas con cáncer de mama de presentación esporádica. Se me ha explicado que mi participación consistirá en otorgar una muestra de tumor mamario aproximadamente de 100 mg y tejido adyacente sano posterior a la biopsia o resección del tumor dentro de mi plan de manejo en el servicio de la Clínica de Cáncer de Mama del Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, ambas muestras de tejido serán utilizadas para el análisis de los polimorfismos (variantes genéticas) que puedan existir en mi información genética y que se puedan relacionar con mi padecimiento (cáncer de mama de presentación esporádica), estoy informada de que los datos que se obtengan serán confidenciales, sin que se revele mi identidad en ningún momento ni en las publicaciones que deriven del mismo y su uso se limitará para los fines de ésta investigación. Así mismo he sido informada de que el tejido podrá ser resguardado para futuras investigaciones relacionadas con este proyecto, todo bajo las mismas normas de confidencialidad. El resultado del estudio se me otorgará siempre y cuando yo lo solicite teniendo la seguridad de que contaré con asesoramiento genético.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna y responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

Nombre y Firma de la Participante.

Dr. Carlos Alberto Yam Ontiveros.

Médico Genetista.

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. Tel. 56 27 69 45. Tel Cel. (044) 55 30 56 47 48.

Testigo

Testigo