



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN
EN EL NÚMERO DE COPIAS (CNVS)
EN TUMORES MAMARIOS DE
MUJERES MEXICANAS, MEDIANTE
MICROARREGLOS DE DNA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MÓNICA BERENICE GARRIDO ARMAS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

COMITÉ TUTOR: DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **GARRIDO ARMAS MÓNICA BERENICE** con número de cuenta 50902184 con la tesis titulada: **"DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN EN EL NÚMERO DE COPIAS (CNV'S) EN TUMORES MAMARIOS DE MUJERES MEXICANAS MEDIANTE MICROARREGLOS DE DNA."** realizada bajo la dirección de: **DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA**

Presidente:	DRA.	LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal:	DR.	FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
Secretario:	DRA.	MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente:	DRA.	SANDRA GÓMEZ ARROYO
Suplente:	DR.	ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de septiembre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



**El presente trabajo se realizó cursando el Posgrado en Ciencias Biológicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.**



Esta tesis recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 225321 y forma parte del proyecto Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social CONACyT Salud-2009-C01-115296.



Durante la realización de este proyecto se recibió apoyo del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de folio 2010011. El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI bajo la dirección del Dr. Diego Julio Arenas Aranda, formando parte del proyecto FIS/IMSS/PROT/721.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Dr. Diego Julio Arenas Aranda por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por su apoyo, sabiduría, buenos consejos, dirección y sobre todo a la confianza en mí para la realización de ésta tesis.

A la QBP Eira Valeria Barrón Palma y a la Maestra en Ciencias María Eligia Juárez Torres, por ser una excelente guía en la realización de este proyecto, por su disposición de ayudar a pesar de sus ocupaciones, por su paciencia y sabios consejos.

A la Dra. María Dolores Vergara por otorgarme las muestras biológicas analizadas en este proyecto, su amistad, su interés, su apoyo incondicional y su calidad humana.

A la Dra. Giriola Garibaldi, por su interés en coleccionar las muestras y su amabilidad.

A la Dra. Patricia Piña Sánchez, por su apoyo en la realización de las Inmunohistoquímicas, su interés, enseñanza y dedicación.

Al Histotecnólogo Juan de Dios Moreno, por realizar los cortes para las inmunohistoquímicas, por sus pláticas y por hacerme el tiempo de laboratorio muy ameno.

Al Dr. Jaime Berumen Campos, por permitirme el uso de sus instalaciones para realizar los microarreglos.

Al Dr. Emilio Castellanos Juárez, por la interpretación patológica de los receptores y analizar el estadio clínico de las pacientes.

Al Dr. Víctor Arana Conejo, por confirmar el estadio clínico de las muestras, a pesar de sus ocupaciones, siempre estuvo en disposición de ayudar.

Al Dr. Alejandro M. García Carrancá, por sus sabios consejos en la elaboración de este proyecto, por su amabilidad y disposición en todo momento.

Al Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez, por su apoyo y dedicación durante todo este tiempo.

A Lupita Hernández Ledo, por otorgarme todos los elementos necesarios para la realización satisfactoria de este trabajo, sus pláticas y su apoyo.

CON TODO MI CORAZÓN.....

A mi adorada María Julia Armas Morales, por ser la mejor madre del mundo y padre al mismo tiempo, por su gran ejemplo, por su amor incondicional, por sus sabios consejos, por simplemente ser la mejor.

Con dedicación especial, a todos mis angelitos que no están presentes físicamente, pero que siempre me acompañan a todos los lugares, me cuidan y me guían como siempre lo hicieron en vida, siempre los tengo en mi mente.

A Gloria Armas Morales, por ser como mi segunda madre, siempre apoyarme, amarme y cuidarme. A Hugo Montealegre M. por su enorme calidad humana y su apoyo.

A Alfonso Armas M. y Fernando Armas M. por ser mis padres y apoyarme en todo momento.

A Cynthia Armas Gassós y Fernando Armas Gassós, por cuidarme siempre, por enseñarme realmente que es tener hermanos. A mis hermanitos pequeños Andy, Memo.

A mi casi hermana Alaide por estar siempre en los momentos más importantes y complejos de mi vida.

A Vinni, por compartir momentos sin igual en mi vida, por su apoyo sin importar absolutamente nada, por su comprensión y siempre darme ánimo para continuar.

A Eli, Valeria e Ingrid, por ser un apoyo moral para lograr los objetivos de la tesis y por ser más que compañeras, amigas.

A Ruth y Bety, por hacer de mi Maestría toda una experiencia de momentos divertidos, por su apoyo y amistad sincera e incondicional.

A mis amigos del alma Martha Martínez, Mónica González, Lety Cortes, Mónica Hernández, Alex García, Hugo Sánchez, Juan García, Yazmin Soriano, Mirna Chávez, Miriam Olán, Jaeson Calla, Betel Toscano, Luli Martínez y Angie Dehesa.

A mis primos, tíos, sobrinos que ocupan un lugar muy importante en mi, a toda mi familia y amigos por siempre apoyarme, pasar conmigo momentos tristes y felices de mi vida, por compartir miles de ocasiones sin igual, por siempre apoyarme en cada tropiezo y tenderme su mano para levantarme una y otra vez, por darme todo el amor necesario para sentirme plenamente FELIZ.

..... A TODOS MIL GRACIAS

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	
Figuras	2
Tablas	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	
Cáncer, generalidades	6
Cáncer de mama	7
Tipos de cáncer de mama	7
Etapas clínicas	9
Epidemiología.	11
Factores de riesgo	14
ANTECEDENTES	
Genética del cáncer de mama	17
Estudio genómico en enfermedades complejas como cáncer de mama	19
Importancia de las CNVs	21
CNVs en diferentes patologías	23
CNVs en cáncer de mama	24
HIPÓTESIS	27
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVOS	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	71
PERSPECTIVAS	71
REFERENCIAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados centígrados
CGH	Hibridación genómica comparativa
CMN SXXI	Centro Médico Nacional, Siglo XXI
CNV	Variación en el número de copias
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	2'-deoxinucleosido 5-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EB	Amortiguador de elución
GCOS	<i>Gene Chip Operating Software</i>
mmHg	milímetros de mercurio
HSDNA	DNA de esperma de arenque
IHQ	Inmunohistoquímica
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kb	Kilobases
M	Molar
Mb	Megabases
mg	miligramos
min	minutos
μl	microlitros
ml	mililitros
Nm	nanómetros
ng	nanogramos
OCR	reactivo de control de oligo
pb	pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pb	Pares de bases
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
rpm	revoluciones por minuto
SAPE	Solución estreptavidina ficoeritrina
seg	segundos
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
TA	Temperatura Ambiente
TBE	Solución amortiguadora de Tris, Borato y EDTA
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TMACL	Cloruro de amonio tetrametilo
U	Unidades
V	Voltios

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Clasificación de cáncer de mama.

Figura 2. Estimación de nuevos casos de cáncer por sexo y muertes en el mundo de los principales sitios de afectación según el nivel de desarrollo económico, 2008.

Figura 3. Mortalidad Nacional de Cáncer en México 2001-2006.

Figura 4. Porcentaje de tipos de cáncer de mama.

Figura 5. Perfil de alteraciones en el número de copias en 862 casos de tumores de mama.

Figura 6. Estrategia experimental general.

Figura 7. Funcionamiento general del programa HelixTree.

Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de los receptores de estrógeno en biopsias de cáncer de mama.

Figura 9. Integridad de DNA.

Figura 10. Digestión del DNA.

Figura 11. Ligación de productos digeridos.

Figura 12. PCR de los productos ligados.

Figura 13. Reacción de fragmentación.

Figura 14. Análisis informático de los microarreglos.

Figura 15. Imagen general de los microarreglos.

Figura 16. Distribución de SNP en los CNVs analizados.

Figura 17. Número de amplificaciones y deleciones por cromosoma de todas las muestras.

Figura 18. Ideograma de amplificaciones y deleciones por cromosoma de todas las muestras.

Figura 19. Número de amplificaciones y deleciones por muestra.

Figura 20. Ideograma de amplificaciones y deleciones por muestras.

Figura 21. Análisis de genes afectados.

TABLAS

Tabla 1. TNM, grupo de estadificación para cáncer mamario.

Tabla 2. Estudio inmunohistoquímico de los receptores RE y RP en las mujeres mexicanas estudiadas.

Tabla 3. Análisis del procedimiento de los microarreglos.

Tabla 4. Ganancias y pérdidas cromosómicas que se determinaron en cada paciente mexicana con carcinoma ductal sin tratar mediante microarreglos de DNA.

Tabla 5. Genes identificados en las regiones de las CNVs de la población con cáncer de mama estudiada.

Tabla 6. Relación de genes localizados en CNVs con alguna neoplasia.

RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad que surge debido a la acumulación de alteraciones en el genoma de las células que componen a la glándula mamaria.

En México a partir del año 2006, el cáncer de mama ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años, lugar que ocupaba el cáncer cérvicouterino. Esta afección amenaza a todos los grupos socioeconómicos. El tipo de cáncer de mama más común es el esporádico, que presenta 70% de los casos y puede deberse a la suma de alteraciones en genes, cada uno de ellos contribuyendo con riesgos a desarrollar la enfermedad.

Es de gran importancia entender enfermedades complejas como el cáncer de mama. La realización de estudios en Variación en el número de copias (CNVs), arrojan resultados muy importantes ya que estas representan la mayor variabilidad genética de los individuos, abarcan genes, que pueden tener un papel importante en enfermedades humanas, como en el caso del cáncer de mama. Es elemental, entender las bases moleculares del cáncer de mama y la aplicación de tecnología, como los microarreglos que aportan información para entender aspectos de la biología básica de la carcinogénesis mamaria. Actualmente se han realizado diversos estudios realizados con esta tecnología en diferentes poblaciones, pero aun no se han reportado en poblaciones mexicanas.

En este trabajo se logró determinar las CNVs en neoplasias mamarias en una muestra de nuestra población, comparándolos con sus controles (tejido adyacente) encontrando un total de 298 alteraciones, de las cuales el 53.69% fueron amplificaciones y 46.30% deleciones. Se localizaron 97 genes relacionados a las diferentes regiones alteradas. Muchas CNVs incluyen genes que dan lugar a los diferentes niveles de la expresión génica. Finalmente, se encontraron 5 genes ligadas a estas variaciones en la muestra de mujeres mexicanas analizadas que aun no están reportadas en relación con algún tipo de neoplasia.

Ya que el cáncer de mama es una enfermedad dependiente de hormonas, se analizaron los receptores de estrógeno y progesterona, no encontrando relación con las CNVs y la expresión de los mismos.

ABSTRACT

Breast cancer is a disease that arises due to the accumulation of alterations in the genome of the cells that make up the mammary gland.

In Mexico since 2006, breast cancer is the leading cause of death in women over 35 years, place of the cervical cancer. This condition threatens all socioeconomic groups. The type of breast cancer is the most common sporadic, which has 70% of cases may be due to alterations in the sum of genes, each contributing to the disease risk.

It is of great importance to understand complex diseases such as breast cancer. Studies on variation in copy number (CNVs), are all very important since they represent the greatest genetic variability of individuals, include genes that may play a role in human disease, as in the case of cancer breast cancer. It's elementary, understanding the molecular basis of breast cancer and the use of technology such as microarrays that provide information to understand aspects of the basic biology of mammary carcinogenesis. Currently there have been several studies using this technology in different populations, but have not yet been reported in Mexican populations. In this work we managed to identify CNVs in mammary tumors in a sample of our population, compared with controls (adjacent tissue) found a total of 298 changes, of which 53.69% were amplifications and 46.30% deletions. We identified 97 genes related to the different regions affected. Many CNVs include genes that give rise to different levels of gene expression. Finally, they found 4 genes linked to these variations in the analyzed sample of Mexican women who are not yet reported in connection with any type of malignancy. Because breast cancer is hormone-dependent disease, we analyzed estrogen and progesterone receptors and we found no relation to CNVs and the expression.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER, GENERALIDADES

La naturaleza hereditaria de todo organismo viviente es definida por su genoma. Esa información genética y los factores ambientales determinan las características fenotípicas de un organismo, incluyendo su estado patológico (Lewin, 2008).

A nivel celular, el cáncer es una enfermedad genética que se desarrolla en varias etapas, se inicia por la transformación de una célula diferenciada. Su origen, reside en la adquisición de alteraciones genéticas somáticas y en la capacidad para escapar de los mecanismos que regulan el crecimiento celular normal, llegando así a proliferar de una forma descontrolada (Diaz-Faes y Ruibal, 2006). Este escape se produce por la acumulación de alteraciones en los genes implicados (de tres a diez), incluyendo sustitución de una sola base, traslocaciones, alteraciones en el número de genes (Futreal y cols., 2004; Stuart y Sellers 2009), principalmente se dañan los genes involucrados en los mecanismos de proliferación celular (protoncogenes), los cuales actúan en conjunto con agentes que no dañan los genes pero que potencian selectivamente el crecimiento de las células tumorales, por lo que, desde este punto de vista, se puede afirmar que el cáncer tiene un origen genético (Diaz-Faes y Ruibal, 2006). Esa acumulación de alteraciones genéticas dan como resultado clones celulares que fundan una dinastía de células dañadas (Desai, 2002; Iwasa 2005) una neoplasia, escapando de los procesos de control de la proliferación y muerte (Bertram, 2000; Desai, 2002; Kesteloot, 2006).

Una característica distintiva de los tumores malignos es la capacidad que tienen las células que lo componen de invadir tejidos adyacentes, diseminarse y dar lugar a focos metastásicos en otros lugares del organismo. Este proceso de malignización imposibilita una solución quirúrgica del problema y a pesar de los avances logrados en la detección precoz y en la terapia antitumoral, constituye la causa más frecuente de muerte en pacientes con esta patología (Diaz-Faes y Ruibal, 2006)

La incidencia de enfermedades oncológicas se ha incrementado considerablemente en todo el mundo y el cáncer de mama no es la excepción. La estadística mundial señala a este último, con más de un millón de casos nuevos cada año (Ferlay y cols., 2002) por tanto, este tipo de cáncer representa un problema de salud público muy grande porque es la principal causa de muerte en mujeres en todo el mundo (Sandoval y Cárdenas, 2005).

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad que surge debido a la acumulación de alteraciones en el genoma de las células que componen a la glándula mamaria.

La glándula mamaria está constituida de lóbulos y lobulillos conectados mediante conductos, y esta enfermedad afecta a una, o ambas, de las estructuras mencionadas. Estadísticas en países donde el cáncer de mama se detecta principalmente por mamografías de escrutinio indican que del 15 al 30% de las neoplasias malignas de mama corresponden a carcinomas *in situ*, y el resto a carcinomas infiltrantes. Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares (Namba, 2006).

Una de cada ocho mujeres tiene riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida (12.2%) y una de cada 28 de morir por esta enfermedad, según la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society Surveillance Program, 2003).

TIPOS DE CÁNCER DE MAMA

Para evaluar el pronóstico y clasificar los tumores de cáncer de mama, existen parámetros que predicen la evolución o agresividad del mismo, entre estos cabe mencionar: el sitio en el que se originó el tumor (Figura 1), el grado de invasión y el grado histológico (Clark, 2001). El cáncer de mama se clasifica en los siguientes tipos:

Carcinoma *in situ* ductal

Es el tipo de cáncer más común y se nombra carcinoma intraductal. Es maligno y mientras crece, el centro del tumor comienza a sufrir necrosis porque ha sobrepasado su fuente de sangre y puede calcificarse. Estos tumores pueden clasificarse en subtipos como son: comedo, papilar, micropapilar, sólido y cribiforme. Muchos tumores presentarán una combinación de dos o más subtipos.

Carcinoma *in situ* lobulillar

En este tipo de tumor raramente se desarrolla necrosis o calcificaciones. Consiste en una acumulación de células anormales en el lóbulo de la mama.

Carcinoma ductal infiltrante

Es el tipo más común de cáncer invasor, representado el cerca de 85% de casos. Este tumor comienza en el conducto y se extiende más allá del conducto en el tejido fino normal del seno.

Carcinoma lobulillar infiltrante

Es menos común, representado cerca de 5-10% de los casos. Este tumor comienza en el lóbulo y se extiende más allá del lóbulo en el tejido fino normal.

Carcinoma medular

Es un carcinoma raro, representando solamente 5% de todos los cánceres del seno, y tiene un pronóstico muy bueno. Tienen típicamente un borde bien definido entre las células de cáncer y las células normales.

Carcinoma tubular

Es un tipo raro de cáncer del seno invasor, representando cerca del 2% de casos. No se extiende típicamente a otras áreas del cuerpo (metástasis) y se asocia a un pronóstico muy bueno.

Carcinoma mucinoso

También se llama carcinoma coloide y es un tumor de crecimiento lento. Este tumor es también raro y se nombra por el mucino (compuesto de proteína y azúcar) producido cerca de y rodeando las células del tumor. Es un carcinoma ductal invasor de bajo grado de malignidad.

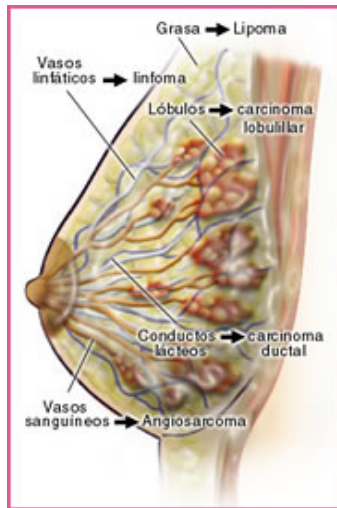


Figura 1. Clasificación de cáncer de mama. La neoplasia se nombra dependiendo del lugar donde se encuentre afectando la mama. El cáncer más frecuente es el cáncer ductal, el cual afecta a los conductos lácteos.

ETAPAS CLÍNICAS

Después de tener el diagnóstico histopatológico de cáncer se realizan estudios de laboratorio, encaminados a determinar la extensión de la enfermedad (De Vita, y cols., 2004). El pronóstico y tratamiento es individualizado y dependerá de la etapa clínica, ésta se determina dependiendo del tamaño tumoral, la presencia o ausencia de metástasis ganglionares y/o a distancia (sistema de clasificación TNM) (Cuadro 1B).

Estas etapas, de manera didáctica, se dividen en enfermedad temprana, localmente avanzada y metastásica. Es imprescindible diagnosticarlo en ausencia de síntomas, cuando su tamaño no sea mayor a los dos centímetros, ya que de esta forma se puede curar alrededor de ~90% de las mujeres (Cuadro 1A).

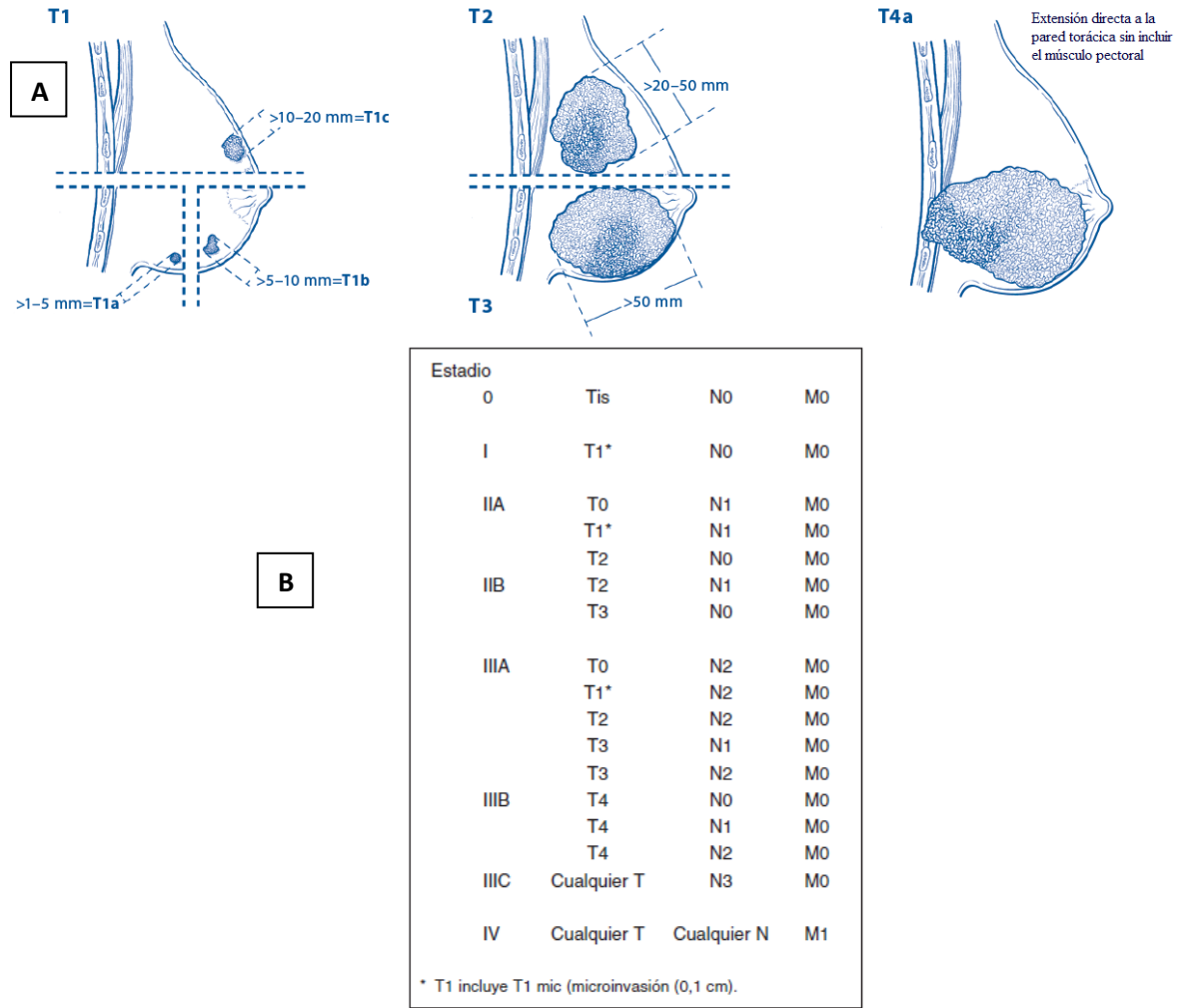


Tabla 1. TNM, grupo de estadificación para cáncer mamario. A) T es el tamaño del tumor, en el cual se indica las diferentes formas de clasificarlo. Donde: T0 es un tumor primario no evidente. *Tis Carcinoma ductal o lobulillar in situ*, acorde al tamaño del tumor; T1 Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor. T1a Más de 0.1 cm pero no más de 0.5 cm en su diámetro mayor. T1b > 0.5 a ≤ 1 cm, T1c > 1 a ≤ 2 cm, T2 Tumor > 2 cm a ≤ 5 cm. T3 Tumor > 5 cm. T4 Tumor de cualquier medida con extensión a pared torácica o piel. **B)** Donde Tis es carcinoma *in situ*, N son ganglios afectados y M indica metástasis a distancia (AJCC, 2003).

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es la principal causa de muerte en los países económicamente desarrollados y la segunda causa principal de muerte los países en desarrollo (WHO, 2008). La cantidad de personas afectadas con cáncer está aumentando en los países en vías de desarrollo económico, como resultado del envejecimiento de la población y del crecimiento, así como también, por adoptar estilos de vida nada sana como vicios, la inactividad física y las dietas occidentales (Jemal y cols., 2011).

A pesar del gran esfuerzo que se ha llevado a cabo en las últimas décadas para mejorar los métodos de detección y tratamiento, hoy en día el cáncer de mama constituye un grave problema de salud mundial (WHO, 2008). Basado en estimaciones del proyecto GLOBOCAN 2008, se estimó que hubo alrededor de 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes por cáncer, de los cuales, el 56% de los casos y el 64% de las muertes ocurrieron en países en desarrollo económico. El cáncer de mama es el cáncer más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres, representan el 23% de los casos de cáncer total y el 14% de las muertes (Figura 2). Alrededor de la mitad de los casos del cáncer de mama y el 60% de las muertes se estima que se produzcan en los países que están económicamente en desarrollo (Jemal y cols., 2011)



Figura 2. Estimación de nuevos casos de cáncer por sexo y muertes en el mundo de los principales sitios de afectación según el nivel de desarrollo económico, 2008. (GLOBOCAN 2008. Estadísticas Mundial contra el Cáncer).

Una de cada ocho mujeres tiene riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida (12.2%) y una de cada 28 de morir por esta enfermedad, según la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society Surveillance Program, 2003). Por tanto, este tipo de cáncer representa un problema de salud pública porque es la principal causa de muerte en mujeres en todo el mundo y en nuestro país, no es la excepción (Sandoval y Cardenas, 2005).

En México a partir del año 2006 (Figura 3), el cáncer de mama ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres mayores de 35 años, lugar que ocupaba el cáncer cervicouterino. Esta afección amenaza a todos los grupos socioeconómicos. Los datos sobre detección, muestran 6000 nuevos casos en 1990 y se estima un incremento cercano a 16500 nuevos casos anuales para 2020. Más aún, la mayoría de los casos se autodetecta y sólo 10% de todos los casos se identifica en etapa I (Knaul y cols., 2009).

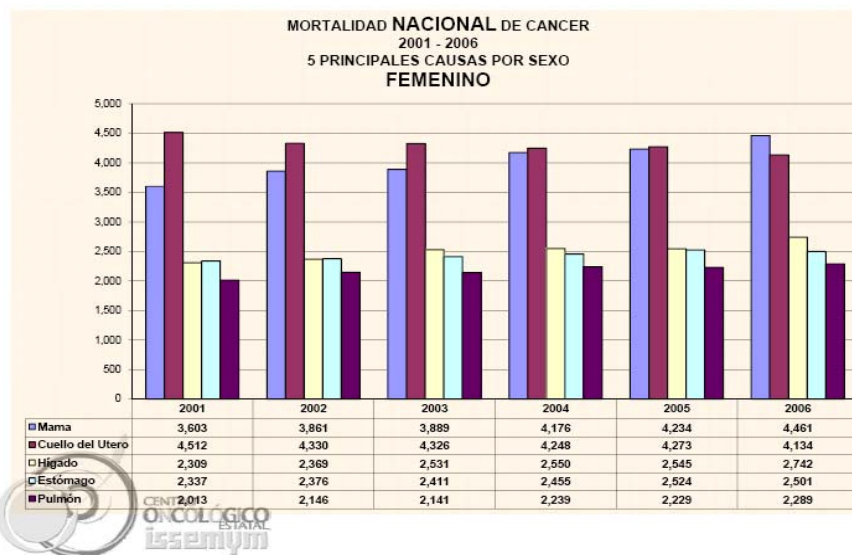


Figura 3. Mortalidad Nacional de Cáncer en México 2001-2006. Se muestra las 5 principales causas de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Del año 2001 al 2005, el cáncer Cervicouterino era la primera causa de muerte, a partir del año 2006 a la actualidad, el Cáncer de mama es la primera causa (<http://www.issemym.gob.mx/>).

FACTORES DE RIESGO

El riesgo más importante para sufrir cáncer de mama es ser mujer, la relación de cáncer de mama entre mujeres y hombres es aproximadamente de 100 a 1. La incidencia de cáncer de mama se incrementa con la edad, duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, etapa en que el ritmo de crecimiento disminuye. En el 46% de las mujeres mexicanas afectadas por el cáncer de mama éste se presenta antes de los 50 años. Esto contrasta con lo observado en Estados Unidos, donde la edad media de presentación son los 63 años y en países europeos, donde la mayor incidencia es en mujeres posmenopáusicas (Namba, 2006).

Existe la presencia de varias características que aumentan la probabilidad de contraer Cáncer de Mama como son:

FACTORES REPRODUCTIVOS Y HORMONALES

El cáncer de mama es una neoplasia que depende de hormonas y de consecuencias reproductivas, por lo que cualquier factor que aumente la exposición a estrógenos, incrementa el riesgo de padecer esta enfermedad. Entre estos podemos encontrar: menarca temprana (antes de los 12 años), menopausia tardía (después de los 51 años) (Clemons, 2001; Nilsson y cols., 2001), primer embarazo tardío (después de los 30 años aumenta el riesgo 2-5 veces con respecto a las que tienen el primer embarazo antes de los 20 años), el no lactar o bien la nuliparidad (aumenta 1.5 veces) (Gnerlich, 2009). Las hormonas juegan un papel muy importante en este tipo de neoplasia, como se explicará más adelante. En este caso la realización de actividad física es relevante, ya que puede afectar los niveles hormonales y aumenta la globulina transportadora de hormonas sexuales, reduciendo así la biodisponibilidad de estrógenos (Nilsson y cols., 2001).

OBESIDAD

Existe una relación bien establecida entre la obesidad y el cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas. Se plantea la hipótesis que esto se debe a un aumento de la concentración sérica de estradiol (estrógeno) (Kulie, 2011).

La obesidad aumenta la mortalidad. Las mujeres con este problema tienen también la mayor morbilidad, incluyendo una elevada tasa de recurrencia, hay aumento en el riesgo de contraer cáncer de mama contralateral, complicaciones de la herida después de la cirugía de mama y linfedema (Kulie, 2011).

También se puede promover el crecimiento más rápido de la metástasis debido a la inmunidad celular alterada. Existe hiperinsulinemia en algunas mujeres obesas, y puede promover la carcinogénesis y la angiogénesis mamaria debido al estímulo de factores de crecimiento en las células epiteliales mamarias (Kulie, 2011).

FACTORES AMBIENTALES

Un aumento del riesgo de cáncer de mama se asoció por ejemplo, con uso doméstico de plaguicidas, la residencia dentro de una milla de sitios de desechos peligrosos que contienen organoclorados y el contacto con algunos productos tóxicos. Se ha encontrado residuos de productos organoclorados en la leche materna y el tejido adiposo de la mama. Con la edad, estos agentes químicos, se acumulan en el cuerpo humano y tienen varias características únicas, incluyendo la unión y la estimulación del receptor de estrógenos alfa, por lo cual son productos con relacionados con esta enfermedad (Gallagher y cols., 2010).

Le exposición de la línea celular MCF-7 a metales (como cadmio, cobre, cobalto, níquel, plomo, mercurio, estaño y cromo) activa los receptores de estrógenos y estimula la proliferación celular. Por lo que hay estrecha relación entre el cáncer de mama y la exposición de mujeres a estos compuestos químicos agresivos. El cadmio, actúa como el estrógeno *in vivo*, promueve el crecimiento y el desarrollo de la glándula mamaria (Strumylaite y cols., 2010).

Entre los factores ambientales y estilos de vida, la exposición a la radiación ionizante produce lesiones en el genoma, como hidroxilación de la timina, lo que resulta en formación de dímeros de dicha base nitrogenada y rotura de una o dos cadenas de ADN. El consumo de bebidas alcohólicas se ha identificado como factor de riesgo, ya que entre sus productos se encuentra el acetaldehído, conocido como carcinógeno primario en animales. Existe controversia entre la asociación de tabaquismo y cáncer de mama, pues algunos autores señalan que sus derivados, como el benzopireno, las aminas aromáticas y nitrosaminas, están implicados en la carcinogénesis de la mama; aunque otros no han encontrado asociación (Romero, 2008).

RELACIÓN FAMILIAR

La historia familiar, mutaciones genéticas BRCA1 y BRCA2 (en aproximadamente una de cada mil mujeres), polimorfismos genéticos asociado a la síntesis de estrógenos y su metabolismo, son factores que determinan la prevalencia de cáncer mamario en una población. Aunque se debe considerar que en el 85% de los casos de cáncer mamario no hay evidencia de historia familiar, cuando ésta se presenta, el riesgo para la mujer con antecedentes familiares (madre, hermana, hija) es 2-3 veces mayor que en la población sin antecedentes familiares (Namba, 2006; Shiana, 2006).

Mujeres con antecedentes de hiperplasia epitelial atípica, patología benigna proliferativa, tienen 4-5 veces más riesgo de desarrollar cáncer mamario que las mujeres que no muestran cambios proliferativos en su mama. Si la mujer tiene antecedentes familiares de cáncer de mama en primera línea, asociados a cambios proliferativos en ella misma, su riesgo se incrementa nueve veces (Namba, 2006; Shiana, 2006).

ANTECEDENTES

GENÉTICA DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama puede tener varios orígenes, puede ser de tipo hereditario o bien de tipo esporádico (Figura 4).

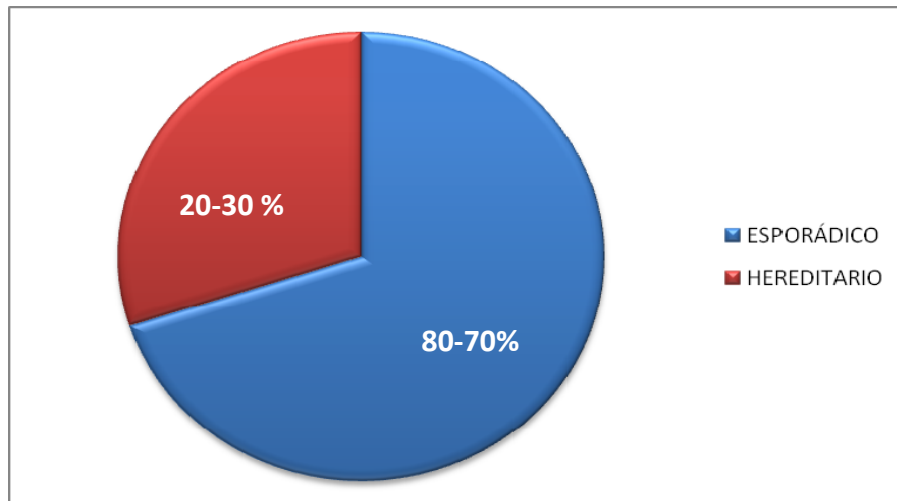


Figura 4. Porcentaje de tipos de cáncer de mama. Se observa el porcentaje en el que se presenta cada uno de los casos, siendo el más frecuente el cáncer de mama esporádico (<http://www.cicancer.org/inv-prog-unidiag-programa.php>).

Cáncer de mama hereditario

En 1866, Paul Broca fue el primero en describir una familia con una alta prevalencia de carcinoma de mama. Su esposa sufrió cáncer de mama precoz y cuando hizo un árbol genealógico de su familia, identificó cuatro generaciones con cáncer de mama. Los informes de Broca, fueron de los primeros en señalar que el cáncer de mama puede ser heredado, que pasa a través de una generación a otra. La historia familiar de cáncer de mama es un factor de riesgo establecido para el desarrollo de la enfermedad. De hecho, entre las variables que han demostrado tener una relación causal con el cáncer de mama, el mayor aumento de riesgo, después de la edad, es una historia familiar positiva de cáncer de mama, anteriormente descritos.

Se han identificado muchos factores de riesgo, sin embargo, la historia familiar de cáncer de mama se encuentran entre los más importantes para este padecimiento, teniendo aproximadamente dos veces más riesgo de desarrollar la enfermedad los familiares de primer grado de una paciente afectada. La mayoría de los casos familiares de cáncer de mama se presentan a una edad temprana, comparados con aquellos casos esporádicos y por lo tanto se considera un mayor papel de los factores genéticos en su desarrollo.

Mientras que muchos tipos de cáncer resultan de alteraciones genéticas adquiridas en células somáticas, algunos pacientes con cáncer tienen mutaciones familiares que juegan un papel etiológico muy importante en su padecimiento. Más de 50 diferentes tipos de cáncer demuestran agregación familiar sugiriendo una predisposición hereditaria, incluyendo tumores de mama, ovario, colon y próstata entre otros (Van der Groep y cols., 2011).

El cáncer de mama es considerado un desorden multifactorial causado tanto por factores genéticos como no genéticos. Una historia familiar de cáncer de mama es una contribución muy importante para el riesgo de padecerlo (Van der Groep y cols., 2011).

La presencia de varios miembros afectados con múltiples neoplasias en una familia y en diferentes generaciones se considera como cáncer familiar y está presente en 15 a 30% de todos los casos de cáncer (Van der Groep y cols., 2011).

Estudios epidemiológicos y en parejas de gemelos monocigóticos indican que el componente genético juega un papel muy relevante en la susceptibilidad para padecer cáncer de mama (Ellsworth y cols, 2010).

Sólo del 5% al 10% de todos los casos de cáncer de mama, se producen como parte de un síndrome de susceptibilidad al cáncer hereditario, causado por mutaciones en genes de alta sensibilidad de penetrancia.

Un proporción sustancial de cánceres de mama hereditarios, sobre 16%, se puede atribuir a mutaciones de línea germinal en genes como BRCA (cáncer de mama 1 y 2) cuya función principal es la reparación del DNA (Narod y Foulkes, 2004).

Los genes BRCA 1 y BRCA2, aumentan a los portadores un riesgo de padecer cáncer de mama de 10 a 30 veces mayor que a la población general. Sin embargo, se han identificado otros genes de riesgo hereditario, incluyendo CHEK2, PTEN, TP53, ATM, STK11/LKB1, CDH1, NBS1, RAD50, BRIP1 y PALB2. Algunos de estos genes están involucrados en múltiples síndromes de cáncer como el de Li-Fraumeni (TP53), de Peutz-Jeghers (STK11/LKB1) y el síndrome de Cowden (PTEN) (Hidalgo, A. y cols., 2009)

Cáncer de mama esporádico

A pesar de una búsqueda extensa, no ha sido posible encontrar genes de susceptibilidad a cáncer de mama. Tomando los factores previamente descritos, la combinación de los genes de penetrancia y riesgo alto e intermedio únicamente se puede explicar menos del 30% del total de riesgo genético para la enfermedad. Esta situación, como en el caso de la mayoría de las enfermedades complejas, ha llevado a la hipótesis de que el riesgo restante (70%) puede deberse a la suma de una gran cantidad de alelos, cada uno de ellos contribuyendo con riesgos moderados o bajos al riesgo total de desarrollar la enfermedad (Cox y cols., 2007).

Los estudios de asociación, ya sea con genes candidato o de genoma completo, analizan gran cantidad de variaciones genéticas comunes en paralelo, con la finalidad de identificar variantes específicas que se encuentren enriquecidas significativamente en los casos enfermos que en los testigos sanos (Cox y cols., 2007).

El abordaje de estudio de asociación con genes candidato ha identificado diversos marcadores en cáncer de mama, pero por ejemplo, se ha podido identificar en diversas poblaciones de forma convincente el SNP en el gen *CASP8*, el cual se asocia con una reducción moderada del riesgo de padecer cáncer de mama (Cox y cols., 2007).

ESTUDIO GENÓMICO DE ENFERMEDADES COMPLEJAS COMO CÁNCER DE MAMA

Existen diversos tipos de estudios genómicos que básicamente, los podemos agrupar en: Genómica estructural, Genómica funcional y Genómica comparativa.

La genómica funcional consiste en la recolección sistemática de información sobre la función de los genes, mediante la aplicación de aproximaciones experimentales globales que evalúen la función de los genes haciendo uso de la información y elementos de la genómica estructural, estudia los niveles de expresión génica en un grupo de células, entre células diferentes de un organismo, entre células sanas y enfermas de un tejido, etc. Se caracteriza por la combinación de metodologías experimentales a gran escala con estudios computacionales de los resultados

y también de la información obtenida mediante la secuenciación de genomas (genómica comparativa y bioinformática).

En la Genómica comparativa se determina la función génica y la filogenia, mediante la similitud y la comparación del orden de los genes de los genomas de diferentes especies, recientemente se están comparando los perfiles de expresión globales entre especies diferentes (The International HapMap Consortium, 2005).

En el caso de la genómica estructural es la rama de la genómica orientada a la caracterización y localización de las secuencias que conforman el DNA de los genes. Se estudia el DNA y las estructuras completas de proteínas, con la finalidad, de identificar las funciones y relaciones entre ellas. Dentro de los motivos estructurales se investiga diversos polimorfismos en el DNA como los SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido), las CNVs (variación en el número de copias), entre otros (The International HapMap Consortium, 2005).

Una de las promesas de la ciencia genómica es la posibilidad de descifrar las interacciones múltiples entre variantes genéticas relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar afecciones complejas. La atención se ha concentrado en los SNPs, cuya frecuencia aproximada es de 1 en 1,000 pb (International HapMap Consortium, 2005).

Existen diversas técnicas para realizar investigación genómica. Estudios de pérdida de heterocigosidad usando marcadores genéticos como microsatélites, la hibridación genómica comparativa (CGH), los microarreglos-CGH y microarreglos para identificar SNPs o CNVs, son algunas de las técnicas empleadas en estudios de Genómica estructural. Los microarreglos de cDNA o de expresión, así como la proteómica descriptiva y funcional son las tecnologías que más se usan en la Genómica funcional (Shena, 2003).

A pesar de lo anterior, en años recientes ha sido posible obtener un mejor entendimiento de las bases moleculares del cáncer de mama a través de la aplicación de tecnologías de alto rendimiento, tales como los microarreglos (Hidalgo, 2009).

Además de su utilidad para entender aspectos de la biología básica de la carcinogénesis mamaria, estas tecnologías han permitido traducir los hallazgos de la investigación básica a pruebas y herramientas con aplicación directa en la práctica clínica. De esta forma, las pruebas con base genómica permiten hoy en día calcular el riesgo personalizado de una paciente a presentar una recaída o a presentar metástasis en una ventana de 5 años con una alta confiabilidad. De hecho el cáncer de mama representa uno de los ejemplos representativos del

impacto de la genómica en el desarrollo de una atención médica más personalizada y basada en las alteraciones genéticas presentes en el tumor de cada paciente (Hidalgo, 2009).

IMPORTANCIA DE LAS CNVs

La variabilidad genómica puede estar presente en muchas formas, incluyendo polimorfismos de nucleótido único (SNPs), número variable de repeticiones en tándem (VNTR, por ejemplo, mini y microsatélites), la presencia/ausencia de elementos de transposición (como los elementos de aluminio) y alteraciones estructurales (por ejemplo, deleciones, duplicaciones e inversiones) (Freeman y cols., 2006).

Se pensaba que los SNPs en el DNA son la forma más frecuente e importante de la variación genética. Los estudios actuales revelan que las CNVs comprenden al menos tres veces el contenido total de nucleótidos de SNPs. Las CNVs pueden tener un papel importante tanto en las enfermedades humanas, como en respuesta a los fármacos (Estivill y Armengol, 2007).

Las CNVs, generan cambios estructurales en el genoma humano debido al aumento o eliminación de copias de genes o partes de ellos. A menudo, este proceso se ha asociado con la evolución del genoma, ya que podría haber jugado un papel en la evolución, al permitir a los organismos cambiar. Algunos de estos cambios podrían haber facilitado a los organismos vivir en determinados ambientes o sobrevivir en situaciones extremas, aunque en los últimos años se relaciona con algunas enfermedades, como cáncer. Los genomas varían entre sí de múltiples maneras, y la totalidad de esta variación genética sustenta la heredabilidad de los rasgos humanos (Estivill y Armengol, 2007).

Las CNVs son un nuevo tipo de polimorfismo genético y es otra fuente de alteración que puede conducir a enfermedades humanas. La amplificación local y las eliminaciones ocurren en una escala de Kilobases (kb) (10^3 bases) o Mb (10^6 bases) escalas son la causa de la CNV. Si estos hechos ocurrieron en generaciones anteriores, la CNV puede ser tratada como un marcador genético cuya transmisión puede ser rastreada en el estudio de la enfermedad de correlación de estado. Estos eventos también puede ocurrir en generaciones actuales, como mutaciones *de novo* (Li, 2009).

El desarrollo de tecnología como los microarreglos, que están basados en CGH han permitido la detección de microdeleciones o microduplicaciones o CNVs.

Estos estudios muestran la variación genética, y permiten la estimación de la relación a contribuciones de las secuencias y las variables estructurales. Las CNVs colecta todas las variaciones cuantitativas en el genoma, incluyendo en arreglos en tándem así como eliminaciones y amplificaciones (Khanna, 2004).

Estudios de re-secuenciamiento genómico han mostrado que la variación de bases más grande dentro del genoma reside en CNVs de al menos 1 kb y dentro de la población han identificado miles de CNVs. Esta clase de variación hoy en día, están poco integrados en los estudio de genética humana en todos los niveles (Khanna, 2004). Las variantes de número de copias son segmentos de DNA que se duplican o se eliminan en los genomas de organismos y varían entre los individuos. La importancia de las CNV no se conocía, ya que se pensaba que representaban una fracción muy pequeña de la variación genómica. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las CNVs son las diferencias fenotípicas más amplias entre los genomas de los individuos normales (Stratton y cols., 2009), cubriendo aproximadamente más del 12% de éste (Rendon y cols., 2006).

Se ha demostrado que las CNVs son también un factor importante en la genómica y la variación entre las especies de primates (Perry y cols. 2006).

Por lo tanto, el análisis integral de la CNVs tanto intra como interespecífica es una nueva e importante oportunidad de entender mejor la historia de la evolución y la variación fenotípica entre los primates y diferentes grupos humanos (Perry y cols., 2006).

La presencia o ausencia de una variante en el conjunto de datos es para informar, como una determinación de patogenicidad de CNVs heredadas, en comparación a tejidos o a individuos aparentemente sanos. Estos cambios pueden influir en la mayoría de los rasgos incluida la susceptibilidad a enfermedades (Khanna, 2004), como en el caso del cáncer de mama.

CNVs EN DIFERENTES PATOLOGIAS

En los últimos meses, el estudio de las CNVs ha sido ampliamente utilizado en enfermedades neurológicas y psiquiátricas que incluyen retraso mental, los trastornos autistas y esquizofrenia. Estos estudios han sugerido que varios genes implicados en vías de desarrollo neurológico similares pueden estar asociados con estas condiciones. Recientemente, se propuso que duplicones situados cerca de la translocación recurrente a puntos de ruptura en los cromosomas 9 y 22 en la leucemia mieloide crónica pueden facilitar este tumor o bien algunos pacientes (15-20%) con LMC también tienen una microdelección en el cromosoma 9 y estos pacientes tienen un pronóstico pobre (Braude, 2006).

Se sabe que algunas CNVs causan las formas mendelianas de la enfermedad de Parkinson, sobre todo en los genes SNCA y PARK2. En el caso de PARK2 tiene un modo de herencia recesiva, sin embargo, la evidencia reciente demuestra que una sola CNV en PARK2 (pero no una mutación sin sentido individual) puede aumentar el riesgo de enfermedad de Parkinson (Pankratz y cols., 2011).

Por ejemplo, existe una creciente evidencia de cómo las CNV pueden influir en la susceptibilidad a la infección por el VIH, modular la respuesta de drogas y contribuir a la genómica y los síndromes de microdelección duplicación. Junto con los SNPs, las CNVs están siendo reconocidas como otro indicador importante de las diferencias interindividuales. Las CNVs pueden causar rasgos mendelianos o esporádicos, o estar asociada con enfermedades complejas, con mecanismos como la dosis de genes, la interrupción de genes, la fusión de genes y los efectos de posición. Se ha observado que la expresión génica se altera en los genes de acompañamiento a CNVs, lo que sugiere que las CNVs puede contener elementos de regulación de estos genes cercanos. Por lo tanto, la contribución de la CNV a la variación genética y en consecuencia el impacto de diversos fenotipos resultantes de los efectos de la CNV para enfermedades complejas pueden ser mayores que lo estimado previamente (Liu y cols., 2011).

Avances tecnológicos recientes en caracterización genómica han incrementado esfuerzos sistemáticos para analizar estas alteraciones en muestras de cáncer humano (Stratton y cols., 2009).

La identificación de estas alteraciones genómicas pueden proveer claves importantes dentro de defectos celulares que causan el cáncer y posteriormente sugerir estrategias terapéuticas potenciales (Stratton y cols., 2009) por ello, es importante realizar este tipo de estudio en mujeres con cáncer de mama ya que es un problema de salud que debemos entender y en México aún no se ha realizado ningún estudio al respecto.

CNVs EN CÁNCER DE MAMA

Enfermedades como el cáncer de mama, tienen un origen multifactorial, ya que surgen como resultado de la interacción de múltiples variantes genéticas y diversos factores ambientales, razón por la cual no siguen patrones hereditarios mendelianos y se les denomina enfermedades “complejas”. Gracias al desarrollo de mapas de desequilibrio de ligamiento en el genoma humano y a la disponibilidad de metodologías de genotipificación masiva, es posible llevar a cabo estudios de asociación de genoma completo en este tipo de enfermedades (Botstein, 2003).

Los primeros reportes de aberraciones en el número de copias de DNA en tumores mamarios se basaron en la descripción de cariotipos obtenidas a partir de células de efusiones de pacientes con cáncer de mama mediante bandeos G, C y Q.

En diversos estudios se detectaron alteraciones numéricas y estructurales características que involucran el brazo largo del cromosoma 1, los cromosomas 4, 5, 7, 14, 15 y X, así como el brazo corto del cromosoma 16, la translocación 1qter-q21 y pérdida de heterocigocidad, tanto en líneas celulares como en tumores primarios y metastáticos. Otras alteraciones importantes involucran la pérdida de 3p12-p14 como un evento temprano en la formación del tumor de mama. Mediante hibridación *in situ* fluorescente, usando sondas específicas pericentroméricas de los cromosomas 1 y 17 en células en interfase, se asoció la presencia de alteraciones numéricas en estos cromosomas con la capacidad metastática de tumores mamarios.

Las metodologías de citogenética molecular, como CGH sobre metafases, permite llevar a cabo un análisis más detallado de las alteraciones en el número de copias de DNA en cáncer de mama. El primer estudio de este tipo analizo tumores primarios y líneas celulares, identificando como alteraciones más prevalentes las amplificaciones en 8q24, 11q13, 17q22-q24 y 20q13, así como ganancias de los brazos cromosómicos 1q, 8q y 20q57. Sin embargo, la limitada

resolución del método de CGH sobre metafases complicaba la identificación de genes específicos involucrados en las alteraciones en el número de copias de DNA.

El análisis de tumores de mama con distintas variedades de microarreglos, ha permitido la identificación más exacta de alteraciones citogenéticas en este tipo de tumor.

Los estudios de asociación de genoma completo han permitido identificar genes de cáncer de mama. Las variaciones en estos genes elevan de forma discreta el riesgo, pero su frecuencia es alta entre algunas poblaciones. Estos estudios se han realizado principalmente en poblaciones caucásicas y asiáticas (Easton y cols., 2007; Hunter y cols., 2007; Stacey y cols., 2007; Stacey y cols., 2008; Ahmed y cols., Gold y cols., 2008-2009; Zheng y cols., 2009).

Estos estudios han identificado 11 variantes genéticas comunes de baja penetrancia asociadas al riesgo de cáncer de mama. A pesar de que estas variantes presentan una baja penetrancia, debido al diseño experimental de estos estudios hace que la asociación estadística sea altamente significativa, además de que estas 11 variantes han sido validadas de una forma más convincente en trabajos posteriores.

La señal de asociación más fuerte que se ha detectado está localizada en la región 10q26, en el gen *FGFR2* (SNPs rs2981582 y rs1219648), seguidos por variantes en 16q12 (*TNRC9/LOC643714*), 3p24 (*NEK10/SLC4A7*), 5q12(*MAP3K1/MGC33648/MIER3*), 6q25 (*ESR1*), 2q35 (*TNP1/IGFBP5/IGFBP2/TNS1*), 8q24 (*FAM84B/c-MYC*), 5p12 (*MRPS30/FGFR10*), 11p15 (*LSP1/H19*), 17q22 (*COX11/STXBP4/TOM1L1*) y 10p14 (*CASP8*) (Chin y cols, 2007).

En realidad, la amplificación de cualquiera de estas regiones permite identificar a pacientes con una menor sobrevida y presentación de metástasis distantes al margen de otros parámetros clínicos. La figura 5 muestra un histograma de frecuencias con las regiones del genoma humano que sufren alteraciones en el número de copias en un mayor porcentaje de los tumores mamarios (Base de datos Progenetix).

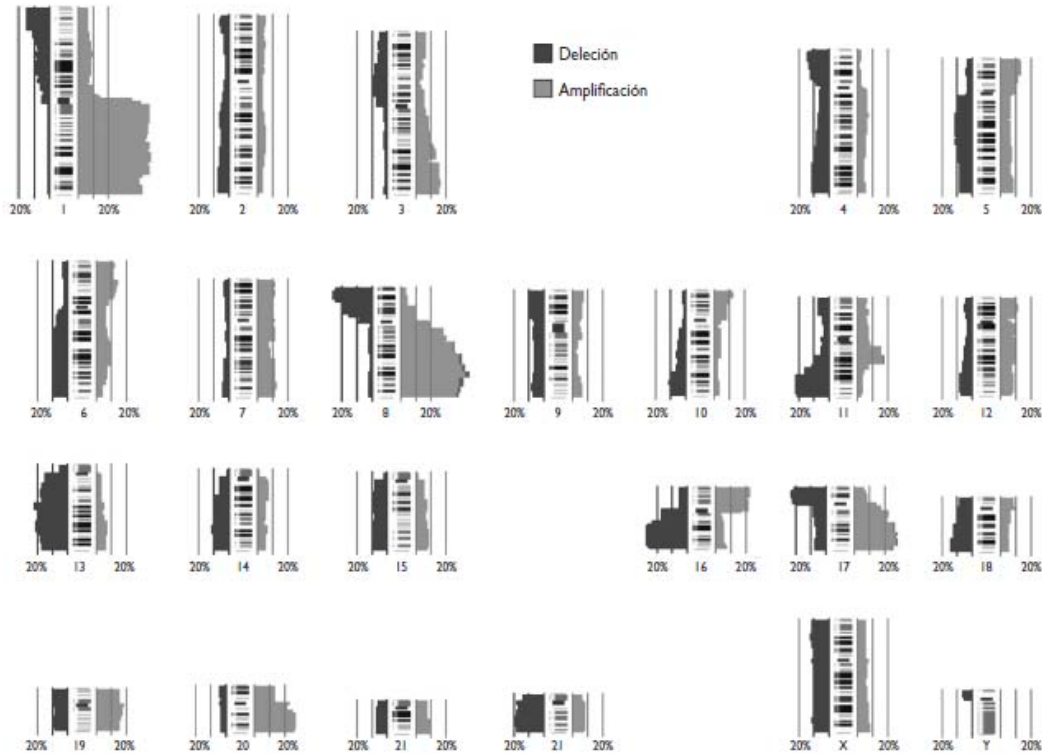


Figura 5. Perfil de alteraciones en el número de copias en 862 casos de tumores de mama. El histograma muestra la frecuencia de alteración en el número de copias a lo largo de todo el genoma humano. Las líneas a los lados del histograma representan el porcentaje de muestras con deleciones de DNA (izquierda) o amplificaciones (derecha). Las regiones con mayor frecuencia de amplificaciones (>20%) se localizan en 1q, 8q, 16p, 17q y 20p. Las regiones con mayor frecuencia de deleciones (>20%) se ubican en 8p, 11q, 13q, 16q, 17p y 22q. La figura concentra resultados derivados de experimentos de hibridación genómica comparativa (CGH) sobre metafases y sobre microarreglos y se tomó de la base de datos Pública PROGENETIX (www.progenetix.com).

El papel biológico de estas variantes en el proceso de la carcinogénesis mamaria es actualmente un área de investigación activa y podrían estar afectando diversos procesos, principalmente la tasa de expresión de los genes involucrados (Ghousaini y Pharoah, 2009).

HIPÓTESIS

Se encontrarán cambios específicos en las frecuencias de las CNVs, entre células normales y el tumor de las mujeres afectadas con la neoplasia, lo que probablemente nos permitirá encontrar zonas características de alteración donde hay genes importantes propios del tumor en nuestra población.

JUSTIFICACIÓN

Dado que el cáncer de mama es un gran problema de salud y siendo una enfermedad genética, es importante la identificación y caracterización de los genes involucrados en esta patología y sus alteraciones. Se analizará cambios específicos en las frecuencias de las CNVs relacionados con cáncer de mama, lo que nos servirá para identificar factores genómicos que pudieran asociarse a esta enfermedad en una muestra de población mexicana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la variación en el número de copias en tumores mamarios de mujeres mexicanas.

OBJETIVO PARTICULAR

Determinar mediante microarreglos de genotipificación con polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), las variaciones en el número de copias (CNVs) entre el DNA obtenido de células no afectadas respecto a las células tumorales de cada paciente, para encontrar características específicas de la neoplasia y/o factores de susceptibilidad genética, en la población mexicana.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

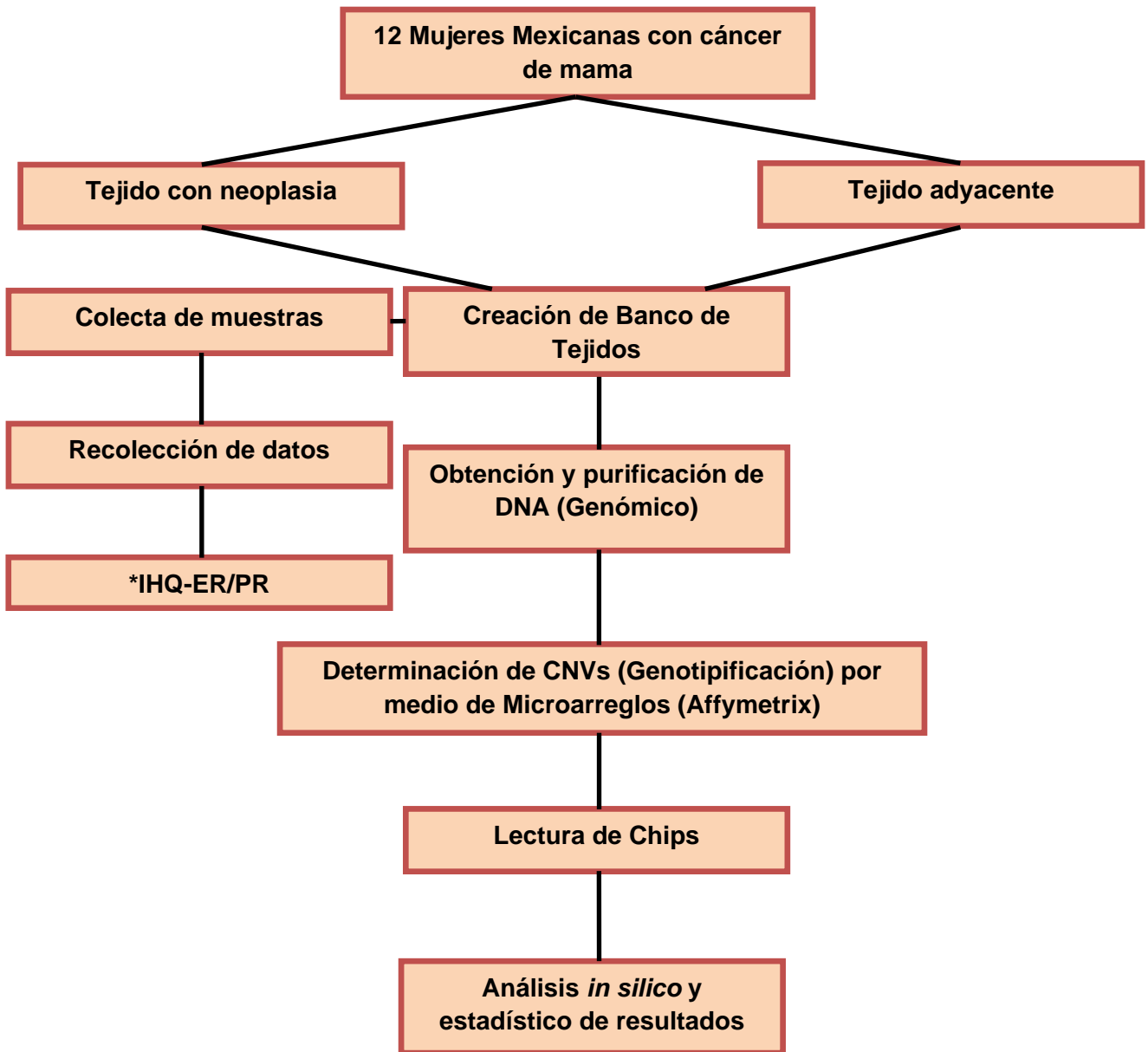


Figura 6. Estrategia experimental general.

*IHQ- Inmunohistoquímica

MATERIAL Y MÉTODO

Población de estudio

Después de la colecta de 64 muestras, se seleccionaron y analizaron únicamente 12 tumores mamarios esporádicos ya que éstos cumplieron con los criterios de inclusión; vírgenes a tratamiento, de los estadios II y III, y el tejido adyacente de cada paciente (muestras sanas). Las muestras fueron obtenidas del Hospital de la Mujer.

El traslado de los tejidos frescos se hizo en un contenedor de nitrógeno líquido y se almacenó en ultracongeladores a -80°C en el laboratorio de Genética Molecular del Hospital de Pediatría, de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, CMN S-XXI.

Criterios de inclusión

1. Mujeres mexicanas con cáncer mamario intraductal
2. Sin antecedentes familiares de cáncer de mama
3. Vírgenes a tratamiento
4. Estadios II o III de afectación
5. Porcentaje alto de células cancerosas (más del 70%)

Inmunohistoquímica

Para el determinar la expresión de los receptores tanto de estrógenos como de progesterona, se realizaron inmunohistoquímicas correspondientes a cada uno, como posteriormente se explica.

El Hospital de la Mujer (Secretaría de Salud), proporcionó los bloques de los tejidos embebidos en parafina. Los cortes histológicos se realizaron en la Unidad de Investigación del Hospital de Oncología del CMN SXXI, con un grosor de 5 μm de grosor y se montaron en laminillas electrocargadas.

Las laminillas se colocaron a 37 °C toda la noche en una placa de calentamiento, para desparafinarlas. Posteriormente se hidrataron con diferentes soluciones: xilol, xilol-etanol (1:1), etanol absoluto, etanol 90%, etanol al 70%, agua corriente y agua destilada, durante 2 minutos en cada solución. Por otro lado, se preparó el recuperador de antígenos (Laboratorios Dako) a

una concentración 1X, en el cual se colocaron las laminillas durante 10 minutos a 120 °C en el autoclave, después de ese tiempo se dejaron enfriar y las laminillas se colocaron en PBS.

Las laminillas fueron incubadas en cámara húmeda con peróxido de hidrogeno como bloqueador durante 15 minutos, después del tiempo las laminillas se lavaron con PBS. Se colocó el bloqueador de proteínas durante 15 minutos, posteriormente, se colocó el anticuerpo correspondiente (progesterona o estrógenos), cubriendo todo el tejido a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Después del tiempo transcurrido, la laminilla se lavó con PBS.

Se revelaron las laminillas con un sistema de avidina-biotina (Multilink Dako) durante 20 minutos, se enjuagó con PBS y se incubó durante 20 minutos con estreptavidina-peroxidasa. Se preparó el cromógeno y se agregó a cada laminilla revelando la reacción, observando la reacción la cual se detuvo con agua corriente. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina-eosina durante 40 segundos, se enjuagaron con agua corriente hasta quitar el colorante y se usó el tren de manera reversa, para deshidratar el tejido.

Posteriormente, se montaron las laminillas con resina y con cubreobjetos, se dejaron secar y se analizaron al microscopio.

Obtención de DNA

Para la extracción de DNA a partir de tumor y del tejido adyacente se pesó la muestra, se tomaron aproximadamente 25 mg de tejido se cortó y fue molido y fraccionado en pequeñas piezas. La extracción se realizó con el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante, donde en general se lisó el tejido, el DNA se une a la membrana de silica la cual se lava dos veces y se recuperó en el amortiguador de elución. Se verificaron las concentraciones e integridad de las muestras de DNA, mediante espectrofotometría a 260 nm analizando su grado de pureza, (Nanodrop technologies) y electroforesis en geles de agarosa al 1%, se almacenaron a -70 °C.

Electroforesis en Geles de Agarosa

El análisis de los ácidos nucleicos, se hizo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, en TBE al 0.5X, teñido con SYBER Gold al 1X o bien bromuro de etidio (1X), en todos los casos se incluyó un marcador de tamaño molecular. La reacción se realizó en una cámara de electroforesis y se utilizó como amortiguador TBE al 0.5X, con un voltaje aproximado de 100 voltios durante 30 minutos.

Microarreglos de Genotificación

Para determinar las CNVs, se analizó en el DNA genómico previamente purificado, digerido, fragmentado, desnaturalizado y marcado, de acuerdo al protocolo del fabricante de los microarreglos GeneChip Genome-Wide Human SNP Array 5.0 Nsp/Sty (Affymetrix) con 420,000 sondas no polimórficas, que permiten medir CNVs. Se usaron microarreglos de alta densidad de la marca Affymetrix, los cuales constan de una fase de digestión con las enzimas Styl y Nspl, una fase de ligación del adaptador, seguida de una amplificación por PCR. Los productos de la reacción de PCR se purificaron y se obtuvieron fragmentos de tamaños menores a 150 pb, estos fragmentos de DNA se marcaron con un anticuerpo y se hibridaron en el chip durante 18 horas; después se escanearon y se analizaron.

El marcaje e hibridación de los microarreglos de SNPs 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 el escáner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). Para el análisis e interpretación de datos se utilizaron los programas, GCOS administrator (Affymetrix) para su almacenamiento, adquisición de imagen y análisis inicial de la información GCOS Manager y el GeneChip Operating Software (Affymetrix). Para la entrega de la información, visualización e interpretación biológica el Data Mining Software y NetAffx Analysis Center (Affymetrix).

Preparación del DNA

Se determinó la cantidad del DNA genómico y se diluyó a una concentración de 50 ng/ μ l con agua de ampolleta.

Digestión

Se digirieron 500 ng de DNA genómico con cada una de las enzimas NspI o StyI. Las concentraciones y condiciones utilizadas en la reacción se muestran en los siguientes cuadros:

Mezcla de reacción	
Reactivo (Stock)	2X (μ l)
Agua	23.1
NE Buffer 3 (10X)	4
BSA (100 X)	0.4
StyI (10 U/ μ l) o NspI (10 U/ μ l)	2
Volumen final	29.5

Temperatura	Tiempo
37 °C	120 min
65 °C	20 min
4 °C	hold

Se agrega 29.5 μ l de la mezcla de reacción más 10 μ l de DNA diluido (500ng) y se incuban a las temperaturas indicadas.

Para verificar que el DNA se digirió, se corrieron en un gel de agarosa al 1%, 2 μ l sin digerir (100 ng) y 10 μ l de DNA digerido (100 ng).

Ligamiento

Los fragmentos de DNA se ligaron a una secuencia corta de nucleótidos con función de adaptador para el iniciador. Las concentraciones de la reacción y las condiciones en que se llevó a cabo se muestra a continuación.

Mezcla de reacción	
Reactivo (Stock)	1X (μ l)
Adaptador Sty (50mM) o Nsp (50mM)	0.75
Buffer T4 DNA ligasa (10X)	2.5
T4 DNA ligasa (400 U/ml)	2.0
Volumen final	5.25

Temperatura	Tiempo
16 °C	180 min
70 °C	20 min
4 °C	hold

Se agregaron 5.25 μ l de mezcla de reacción, más 19.75 μ l de DNA digerido, las cuales se incubaron a las temperaturas indicadas. Posteriormente se diluyeron las reacciones con agua (fría).

PCR

Se efectuaron tres reacciones de 100 μ l por cada muestra de DNA digerido con la enzima Styl y cuatro reacciones de 100 μ l por cada muestra de DNA digerido con la enzima Nsp I. Se muestran las concentraciones y condiciones de la reacción en los siguientes cuadros.

Mezcla de reacción	
Reactivo (Stock)	1X (µl)
Agua	39.5
TITANIUM Taq PCR Buffer (10X)	10
G-C melt (5M)	20
dNTP (2.5mM) mix	14
Primer 002 (100uM)	4.5
TITANIUM Taq DNA polimerasa (50X)	2
Volumen final	90

Ciclaje		
Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	3 min
40	94 °C	30 seg
	60 °C	45 seg
	68 °C	15 seg
1	68 °C	7 min
	4 °C	hold

Se agregaron 90 µl de mezcla de reacción más 10 µl de reacción de ligamiento diluida y se incuban a las temperaturas y condiciones indicadas.

Para verificar la reacción de PCR, se corrió un gel de agarosa al 1% para observar los productos de 250 a 1,100 pb.

Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron con el kit *minielute 96* (Qiagen). Se mezclaron las reacciones digeridas (cuatro de Styl y cinco con Nspl), se colocaron en un solo pozo y se filtraron al vacío (20-24 mmHg), hasta que el pozo quedó seco. Se realizaron dos lavados con etanol al 70% grado biología molecular. Se resuspendió con 45 µl de amortiguador EB y se agitó la placa por 20 min para asegurar la elución. La muestra se transfiere a un tubo estéril y se centrifuga, pasando únicamente el sobrenadante a otro tubo limpio.

Cuantificación

Se cuantificaron por espectrofotometría la muestra de PCR haciendo una dilución 1:100 obteniendo una concentración aproximada de 247.5 ng/45 µl.

Fragmentación

El producto de PCR purificado se diluyó en 5 μ l de buffer de fragmentación (mezcla de fragmentación), posteriormente se preparó la mezcla de reacción con las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción	
Reactivo (Stock)	1X (μl)
Agua	306
10X Buffer de fragmentación	36
Reactivo de fragmentación	18
Total	360

Temperatura	Tiempo
37 °C	35 min
95 °C	15 min
4 °C	hold

Se agregaron 50 μ l de la muestra más 5 μ l de reactivo de fragmentación diluido y se incubaron en las condiciones adecuadas. Se corrieron 3 μ l de la muestra fragmentada en un gel de agarosa al 2% para observar fragmentos menores a 180 pb.

Marcaje

Los fragmentos obtenidos en la reacción anterior se marcaron agregando 19.5 μ l de la siguiente mezcla:

Mezcla de reacción	
Reactivo (Stock)	1X (μl)
Buffer 5X TdT	14
Reactive de marcaje Gene Chip DNA	2
Enzima TdT (30U/ml)	3.5
Volumen Total	19.5

Temperatura	Tiempo
37 °C	4 horas
95 °C	15 min
4 °C	hold

Hibridación

Se preparó la siguiente mezcla de reacción y se usaron las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción	1X (μl)
MES (12x, 1.22M)	12
Solución Denhart's (50X)	13
EDTA (0.5 M)	3
HSDNA (10 mg/ml)	3
OCR 0100	2
Human Cot-1 DNA (1mg/ml)	3
Tween-20 (3%)	1
DMSO (100%)	13
TMACL	140
Volumen Total	190

Temperatura	Tiempo
95 °C	10 min
49 °C	hold

Se agregaron 190 μl del coctel de hibridación más 70 μl de la muestra marcada.

Se inyectaron 200 μl de al GeneChip y se sellaron con etiquetas en los orificios.

El marcaje e hibridación de los microarreglos de SNP's se llevó a cabo en una estación de fluidos GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix).

Se incubaron de 16 a 18 horas a 50 °C agitándose a 60 rpm en el horno de hibridación (Affymetrix).

Lavado, teñido y escaneo

Al terminar el tiempo de hibridación, se retiró el coctel de hibridación del GeneChip 5.0, posteriormente el Chip se llena con la solución de mantenimiento y se coloca la solución SAPE

(594ml Stain Buffer más 6ml de estreptavidina ficoeritrina) en la posición 1 de la estación de fluidos GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix).

Se coloca la solución de anticuerpo biotilado en la posición 2 de la estación de fluidos (594 Stain Buffer mas 6 ml de anticuerpo biotilado (0.5 mg/ml).

Se aplica 1 ml de amortiguador de mantenimiento en la posición 3 de la estación de fluidos.

Se colocan los GeneChip en la estación de fluidos y se selecciona en el programa de la computadora GCOS el método 5.0 GeneChip y el protocolo GenomeWideSNP5v1_450.

La lectura de los chips se llevó a cabo en GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix).

Análisis de microarreglos

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, visualización e interpretación biológica el Data Mining Software y NetAffx Analysis Center (Affymetrix).

Se uso el programa HelixTree (http://www.goldenhelix.com/SNP_Variation/HelixTree/html) para importar directamente los datos del chip de Affymetrix, ya que es una herramienta de procesamiento de gran alcance que permite normalizar la intensidad de la sonda, incluyendo la generación de matriz virtual para combinar "Copy Number" y las sondas de SNP o varias matrices y se obtuvieron valores de log2. En general, el programa funciona como lo indica la Figura 7.

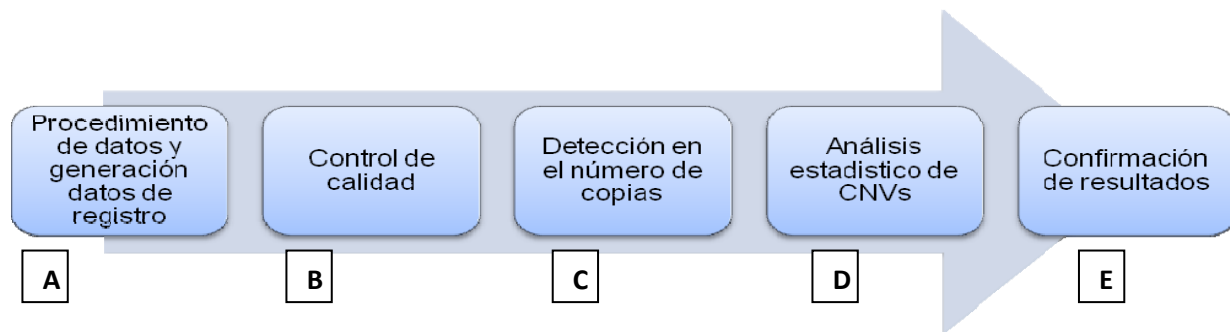


Figura 7. Funcionamiento general del programa Golden Helix (Helix Tree).

El programa HelixTree fue utilizado para **A) Normalizar los datos en bruto y Log2**. La medición que se usa más comúnmente para determinar el estado del número de copias es la "relación de registro" (LR), también llamado "log-2 ratio" o "log-R ratio" ("R" se utiliza comúnmente como una variable para representar la intensidad de la sonda). La fórmula estándar para el cálculo de LR es $\log_2(\text{intensidad observada} / \text{intensidad de referencia})$. **B) Realizar control de calidad**. Con los datos de número de copias y quita los efectos que pueden provocar "ruido" o problemas al analizar los datos. **C) Detectar las regiones el número de copias**. El objetivo de este paso es determinar las regiones en el genoma donde el valor promedio de una muestra dada de LR se diferencia de la referencia. A decir LR en torno a cero indica que la muestra tiene el mismo número de ejemplares que el de referencia. Un segmento LR decir por encima de cero por lo general significa que hay un aumento de número de copias, y un segmento LR media por debajo de cero significa que hay una pérdida de número de copias. **D) Analizar las variaciones de número de copias**. Se limitan los segmentos LR para encontrar diferencias entre dos o más grupos. **E) Confirmación de resultados**. Se realiza analizando las anotaciones genómicas.

Una vez generados los segmentos y ya normalizados en el programa HelixTree se compararon los datos obtenidos de cada una de las muestras con el programa Access (Microsoft Office, 2007), encontrando diferencias significativas entre tejido adyacente y tumores de cada paciente o bien todas las muestras de tejido adyacente contra todos los tumores y una vez que se compararon las muestras, se buscaron los genes que están involucrados con los CNVs mediante Heat Map del programa Golden Helix.

Las graficas obtenidas se realizaron en Excel (Microsoft Office, 2007) y los ideogramas se realizaron con el programa IdeogramBrowser Software Documentation (<http://www.informatik.uni-ulm.de/>.html)

RESULTADOS

Para realizar este proyecto se creó un banco de tejidos de 64 mujeres con cáncer de mama de las cuales se obtuvo una biopsia de tejido tumoral y su respectivo tejido adyacente, las muestras fueron obtenidas en el Hospital de la Mujer. Una vez colectadas las muestras se analizaron los expedientes y se eligieron las muestras indicadas para la realización de los microarreglos, de las cuales únicamente 12 de estas cumplían con los criterios de inclusión que se mencionaron anteriormente.

Con la finalidad de ayudar con su tratamiento a las mujeres que donaron las muestras, corroborar los resultados que pudieran arrojar los microarreglos y agrupar las muestras que se usaron, se determinó la expresión de receptores tanto estrogénicos, como de progestagenos, mediante Inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos. Sólo se muestran para ejemplificar, dos de las 24 inmunohistoquímicas que se realizaron (Figura 8). Por otro lado en la Tabla 2 se muestran los resultados de 20 de las inmunohistoquímicas realizadas, en el caso de dos pacientes, no ha sido posible determinar la expresión de los receptores por inmunohistoquímica.

EXTRACCIÓN DE DNA

Este DNA se obtuvo a una buena concentración, sin contaminantes ni degradación y se observa una banda ancha de gran tamaño molecular, característica principal de este tipo de ácido nucleído. El DNA de las muestras se ajustó a una concentración de 50 ng/ μ l (Figura 9).

Caso No./Clave	RE	RP
1.0109	+	+
2.0609	-- ©	-- ©
3.0809	+	+
4.1209	D	D
5.1309	+	--
6.1609	+	+
7.1909	D	D
8.2009	+	+
9.2209	--	--
10.2409	+	+
11.2709	+	+
12.4009	+	-- ©

Tabla 2. Estudio inmunohistoquímico de los receptores RE y RP en las mujeres mexicanas estudiadas. Se muestran los resultados de la inmunohistoquímica de los receptores de estrógeno y progesterona de las mujeres estudiadas, se muestra el número de muestra con la clave utilizada para su manejo, **RE** es el Receptor Estrogénico, **RP** es el Receptor de Progesterona, **+** es positivo en núcleo, **--** negativo en núcleo, **D** en determinación del resultado y **©** es positivo en citoplasma.

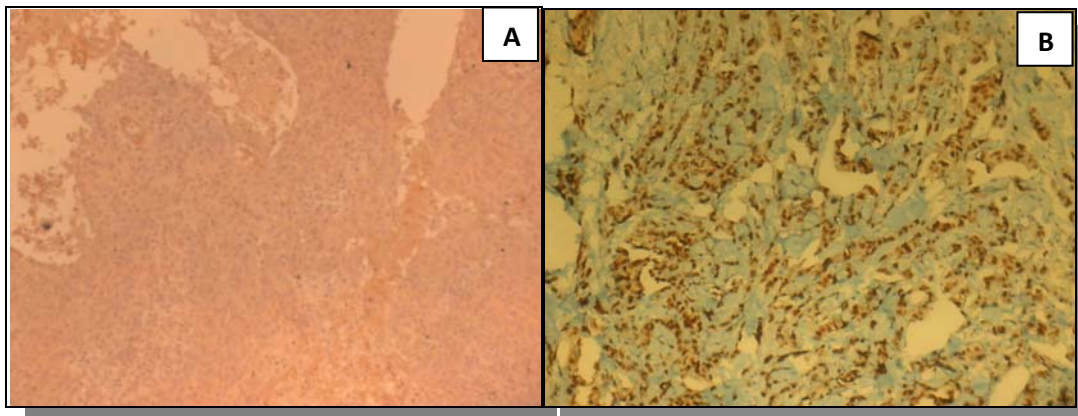


Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de los receptores de estrógeno en biopsias de cáncer de mama. A) Se muestran fotografías representativas de la inmunotinción del receptor de Estrógenos (Dako) de la muestra 2209 donde los receptores son negativos. B) Se muestra el mismo anticuerpo en la muestra 0109 donde el resultado es positivo, tiñendo los núcleos. Ambas muestras se muestran a 10X.

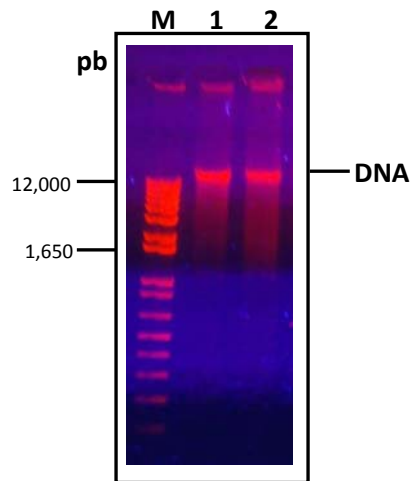


Figura 9. Integridad de DNA extraído. Se muestra como ejemplo el gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio donde se verificó la integridad del DNA genómico de la muestras 0109S y 0109T. En la imagen se muestra: **Carril M.** Marcador de peso molecular de 1 Kb. **Carril 1.** DNA de tejido adyacente 0109S. **Carril 2.** DNA de tejido Tumoral 0109T.

REALIZACIÓN DE LOS MICROARREGLOS

Cada paso en la realización de los microarreglos es crucial para continuar con el procedimiento de los mismos ya que deben cumplir ciertos lineamientos sugeridos por el proveedor (Affymetrix), por ello se tiene que checar y corroborar todos los experimentos desde la extracción de DNA como la fragmentación por medio de electroforesis en geles de agarosa a las concentraciones que se indican.

Una vez que se determinó la concentración óptima de las muestras (50 ng/ μ l), se realizó la digestión con las enzimas Styl y Nspl, como se explicó anteriormente. Para verificar que la digestión se hizo adecuadamente, se coloca como testigo el DNA sin digerir el cual se observa de alto peso molecular, seguido por la digestión de ambas enzimas, el cual es un barrido del DNA (Figura 10).

Posterior a la digestión y su verificación, se realizó la ligación de los mismos con la enzima T4 ligasa (Invitrogen) y se analizaron por electroforesis en agarosa al 2%. Se observó que los productos obtenidos de las muestras 0109 tanto como tejido adyacente como Tumoral se ligaron correctamente, se observan dos bandas menores a 100 pb (Figura 11).

Seguido a la ligación, se realiza la amplificación por PCR de los mismos, únicamente se ejemplifica la reacción de la muestra 0109 S en un gel al 1%. En esta reacción se usaron iniciadores específicos (Affymetrix) para cada enzima y la Titanium DNA polimerasa (Clontech). Se realizaron 4 reacciones para la enzima Styl y 5 reacciones para la enzima Nspl debido a que su rendimiento es bajo (Figura 12).

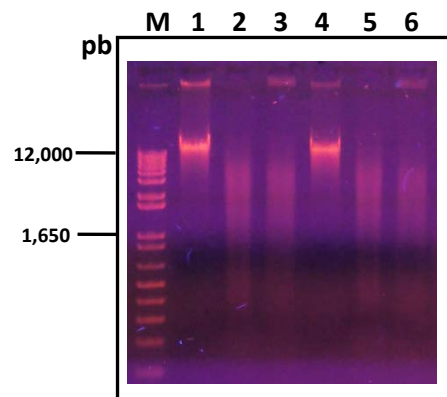


Figura 10. Digestión del DNA. Se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tinción con bromuro de etidio. Se enseña la digestión de dos muestras únicamente como ejemplo, donde: **Carril M.** Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **Carril 1.** DNA de tejido adyacente de la muestra 0109S sin digerir. **Carril 2.** Digestión del DNA 0109S con la enzima Styl. **Carril 3.** Digestión de DNA 0109S con la enzima Nspl. **Carril 4.** DNA de tejido tumoral 0109T sin digerir. **Carril 5.** Digestión del DNA del tejido tumoral 0109T con la enzima Styl. **Carril 6.** Digestión del DNA 0109T del tejido tumoral con la enzima Nspl.

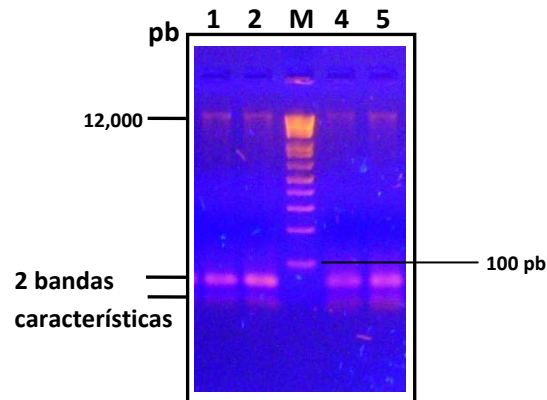


Figura 11. Ligación de productos digeridos. En esta imagen se muestra: **Carril 1.** Ligación de producto de la digestión con Styl de 0109S. **Carril 2.** Ligación de producto de la digestión con Nspl de 0109S. **M.** Marcador de peso molecular de 1Kb. **Carril 4.** Ligación de producto de la digestión con Styl de 0109T. **Carril 5.** Ligación de producto de la Digestión con Nspl de 0109S.

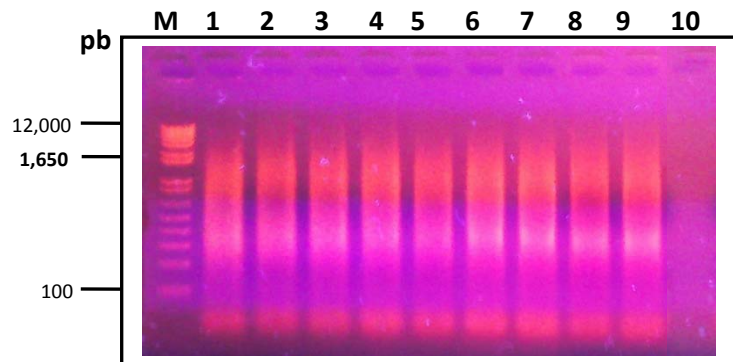


Figura 12. PCR de los productos ligados. **M.** Marcador de peso molecular de 1Kb. **Carriles 1– 4.** Reacciones con la enzima Styl. **Carriles 5 – 9.** Reacciones con la enzima Nspl. **Carril 10.** Reacción sin DNA como testigo negativo. Se observa un producto amplificado que va de 180 pb hasta 1,800 pb aproximadamente.

La siguiente reacción que se realizó es la fragmentación, en los que productos purificados de PCR reducen el tamaño de los productos de PCR por medio de una nucleasa (reactivo de fragmentación, Affymetrix) con la finalidad de que los productos sean capaces de hibridar en el chip posteriormente. Esta reacción es verificada en gel de agarosa al 1.5% (Figura 13), siendo el último paso que se puede corroborar por este método.

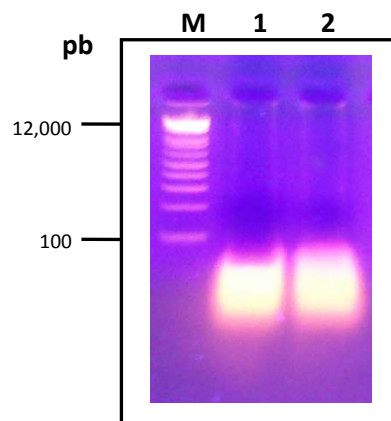


Figura 13. Reacción de fragmentación. M. Marcador de tamaño molecular de 1Kb. **Carril 1.** Fragmentación de la muestra 0109S. **Carril 2.** Fragmentación de la muestra 0109T.

Posteriormente a la verificación de la fragmentación, se continúa con la metodología marcando el DNA. Esto es para que la detección de la hibridación entre las sondas de DNA inmovilizado en el microarreglo y los fragmentos del material genético de la muestra y sean detectados.

El siguiente paso fue la hibridación de los productos marcados en el microarreglo de genotipificación, en el cual la secuencia complementaria se une a la del DNA diana.

Se lavaron los microarreglos en la estación de fluidos y posteriormente se tiñeron las plataformas en la estación de fluidos (Affymetrix). A continuación, se escaneron los microarreglos.

A partir del escaneo de los microarreglos se generan imágenes de estos en el programa “*Command console viewer*” de Affymetrix. Se realizó una evaluación visual de las muestras escaneada, donde fueron evaluadas en la consola del proveedor, verificando así la imagen general de cada microarreglo (Figura 14).

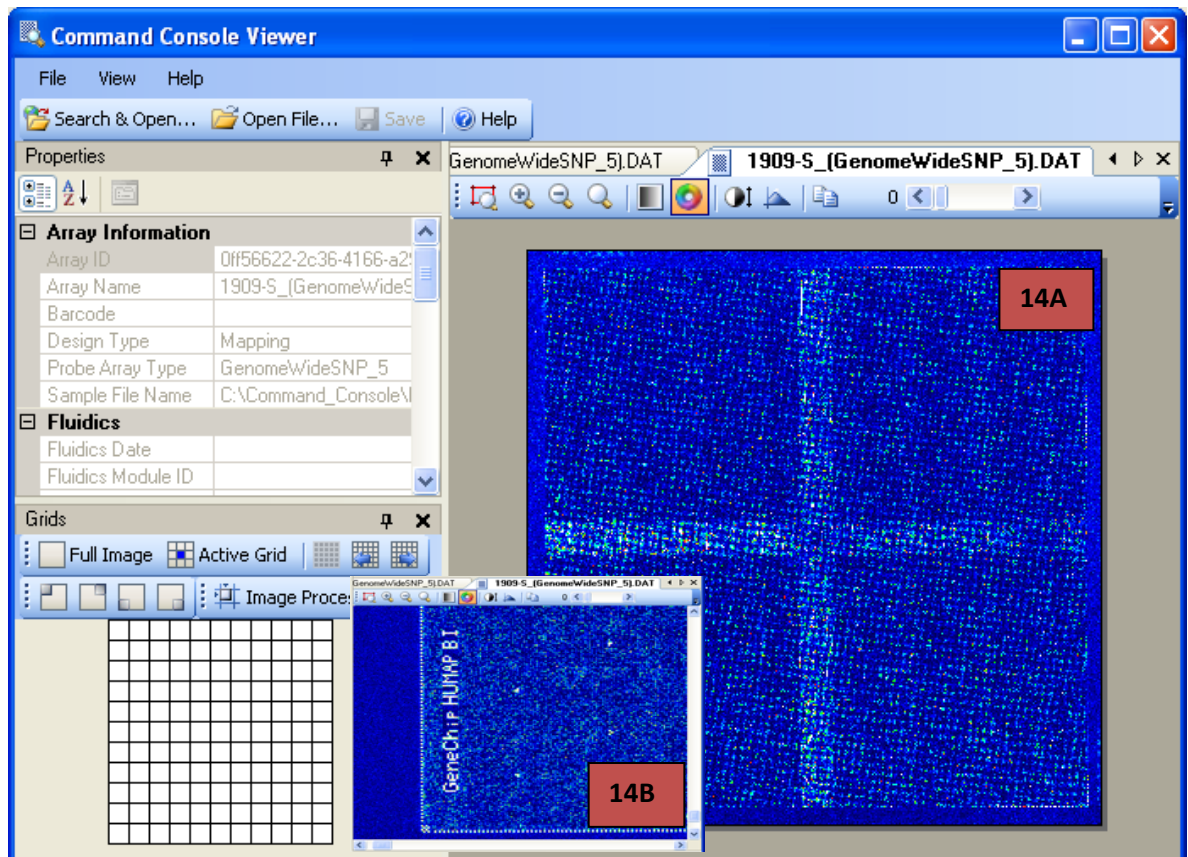


Figura 14. Análisis informático de los microarreglos. Control gráfico de imágenes generadas por la consola de Affymetrix. (Panel A), en el cual se ve que el microarreglo posee colores uniformes, al ampliar la imagen A debe observarse del lado inferior izquierdo una leyenda del chip (Panel B) indicadores que la hibridación fue realizada adecuadamente.

Otra forma de verificar el procedimiento adecuado de la realización de los microarreglos, fue usando la consola de Affymetrix ya que es posible calcular el “*call rate*” de las muestras, valores altos cercanos al 97 significan que todo el procedimiento desde la extracción del DNA hasta el escaneo se realizaron correctamente y la hibridación de las muestras en el chip son adecuadas. Se generan archivos brlmm lo que significa que se realiza un análisis múltiple del chip, que permite la estimación simultánea de los efectos de las señales de la sonda, con respecto al alelo para cada SNP. Se detectan los cromosomas sexuales, adjudicando a la muestra un género (Tabla 3).

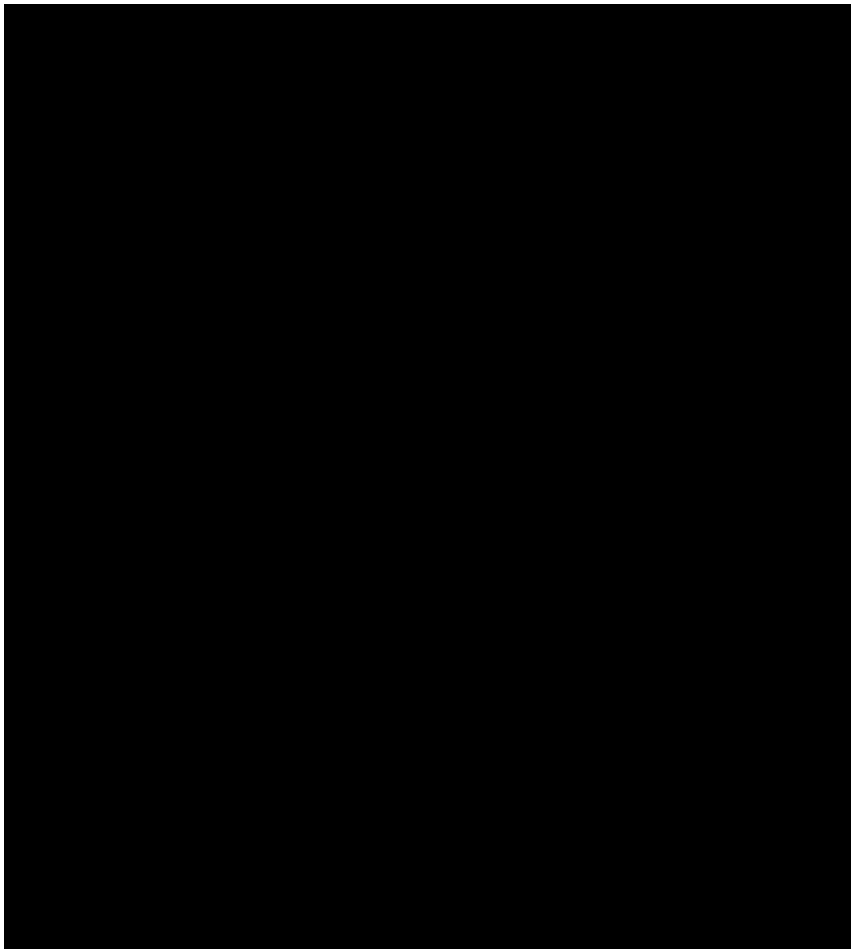
Archivo	Género	Call Rate
		

Tabla 3. Análisis del procedimiento de los microarreglos. En la tabla se muestra el nombre del archivo generado con la extensión brlmm-p.chp, el género de cada muestra y los valores del *Call rate*.

Los valores obtenidos en la Tabla 3 indican que se puede continuar con el estudio *in silico* de los microarreglos por lo que se uso el programa HelixTree.

HelixTree, usa un algoritmo de segmentación óptima para detectar CNVs y en este caso se realizó, la segmentación univariada que permite el análisis de cada muestra y localiza las variaciones de novo, normalizando la señal generada de los microarreglos (Figura 15).

Como se explicó en la Figura 7 el programa para normalizar los datos en bruto y genera valores llamados \log_2 , que es la medida más utilizada para determinar el estado de las CNVs. Realiza controles de calidad, quitando el ruido de la señal, que pudieran dar falsos positivos en el análisis. Detecta las CNVs y las variaciones que éstas poseen, llevar a cabo anotaciones genómicas, localizando genes que están involucrados con las muestras analizadas.

Con los valores generados, en el programa se pueden localizar los marcadores o SNP que están involucrados en los CNVs (Figura 16). En el panel A puede observarse que hay muchas muestras que poseen un solo SNP y la mayoría de éstas tienen menos de 2,000 aunque se encuentran algunos con más de 8,000 pero son muy pocos. En el caso del panel B, es otra forma de visualizar los marcadores, ya que representa SNP a lo largo de todas las muestras analizadas. En ambos paneles se representan los marcadores que tienen pérdida de segmentos (ubicados en los números negativos), la ganancia de estos (números positivos), pero la mayoría de los marcadores se mantiene de una forma neutral (sobre cero) sin alteraciones.

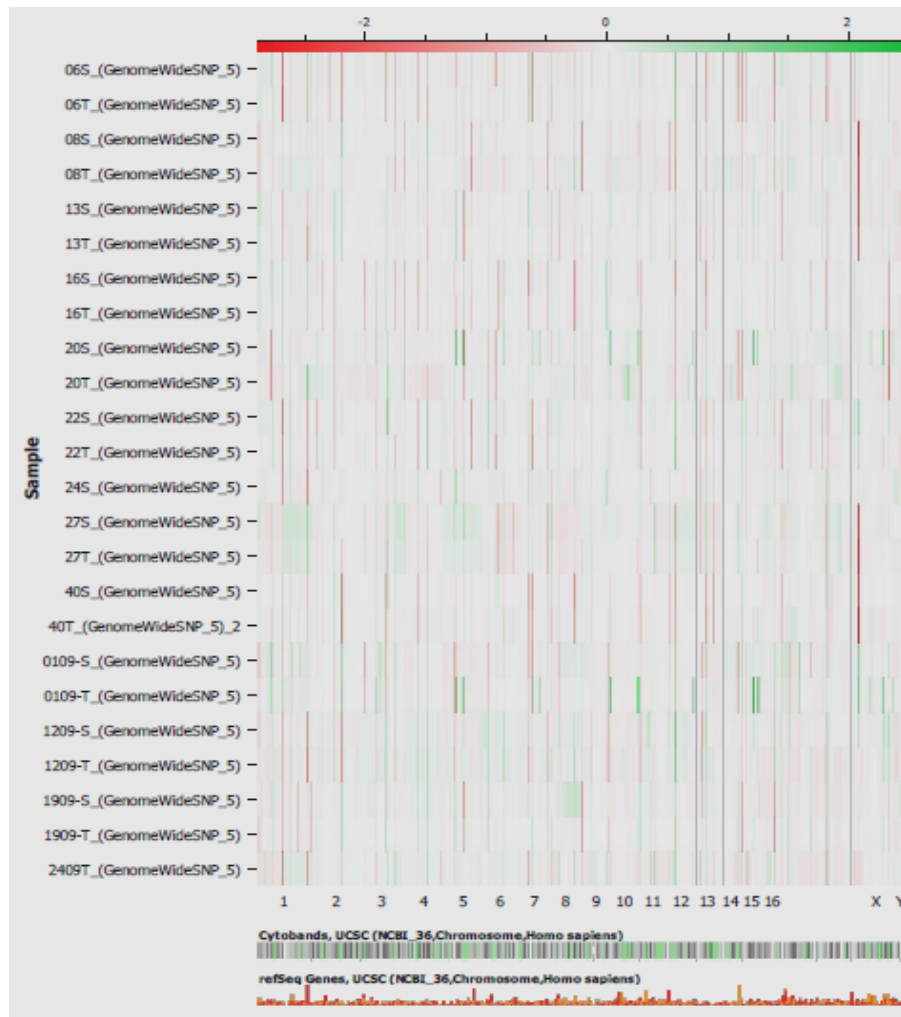


Figura 15. Imagen general de los microarreglos. En el lado izquierdo se observan las 24 muestras diferentes (tejido tumoral y adyacente de 12 mujeres) el programa localiza cada cromosoma (parte inferior), la citobanda y la cantidad de genes de referencia que están en los cromosomas. Los colores indican ya sea perdida (rojo) o ganancia (verde) de en las CNVs en las muestras (http://www.goldenhelix.com/SNP_Variation/HelixTree/index.html).

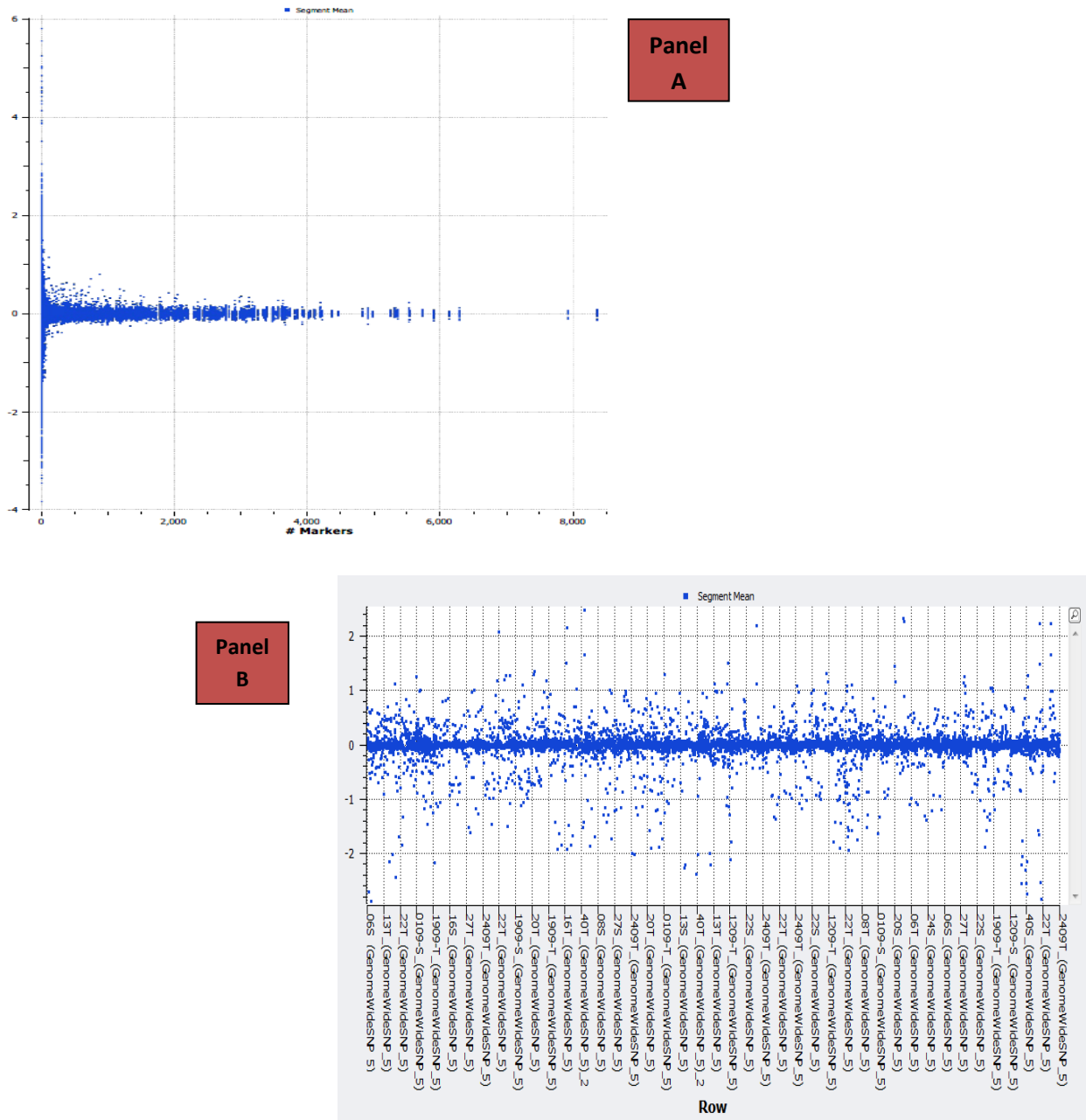


Figura 16. Distribución de SNP en los CNVs analizados. Panel A Se presenta gráficamente de manera general el número de marcadores (SNPs) en todas las muestras. **Panel B** Marcadores presentes en cada muestra. En ambos casos, valores negativos representan pérdidas, valores positivos ganancias y valores neutros están en cero.

Se compararon los valores de las CNVs obtenidos de los tejidos adyacentes contra los valores de los tumores de todas las mujeres, se encontraron alteraciones a lo largo del genoma de las mujeres con cáncer de mama, de las cuales 160 fueron amplificaciones, mientras que 138 deleciones. Haciendo esta comparación se observó que las alteraciones que predominan son las amplificaciones con un 53.69 % y en el caso de las deleciones fue un 46.30%. El cromosoma 2 es el que presenta más variaciones en comparación a todos los demás, el cromosoma 5 evidencia más deleciones, mientras que el cromosoma 2 muestra más amplificaciones (Figura 17).

Con la utilización del programa Ideogrambrowser (<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/>) fué posible representar los datos obtenidos en la Figura 17, localizándolos sobre todo el genoma humano y con ello es posible observar el tamaño de la variación sobre los cromosomas (Figura 18).

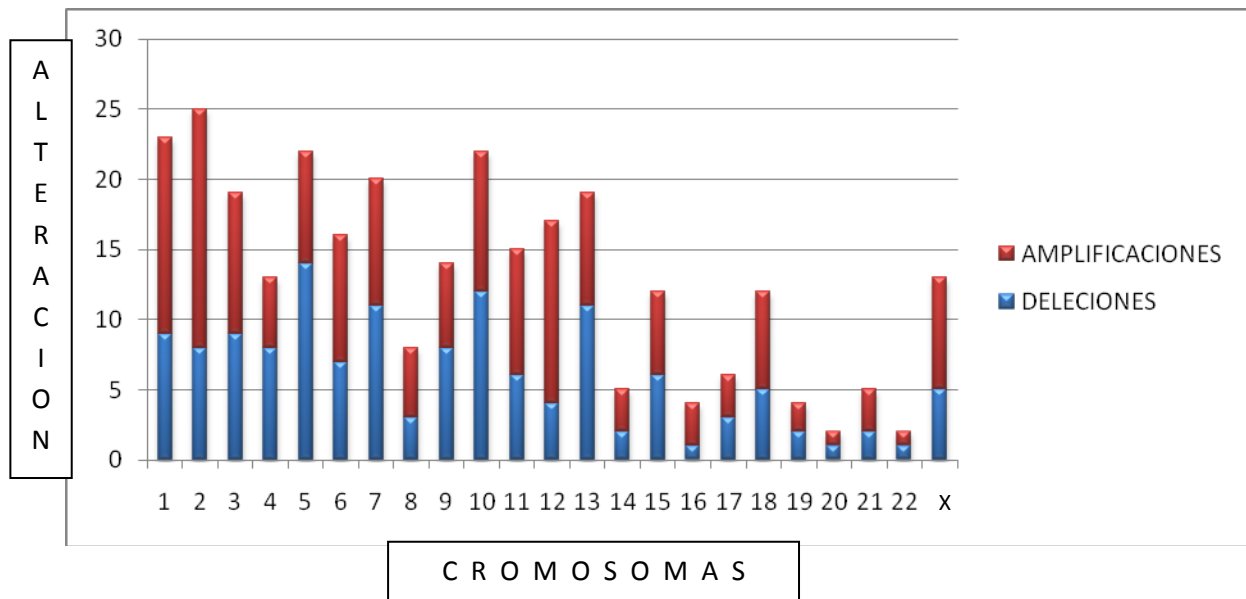


Figura 17. Número de amplificaciones y deleciones por cromosoma de todas las muestras. Sobre el eje de las X se coloca el número del cromosoma, sobre el eje Y se especifica el número de alteraciones que poseen y está representado por el tamaño de la barra, mientras que el color azul (inferior al gráfico) son deleciones y el color rojo (superior) son amplificaciones.

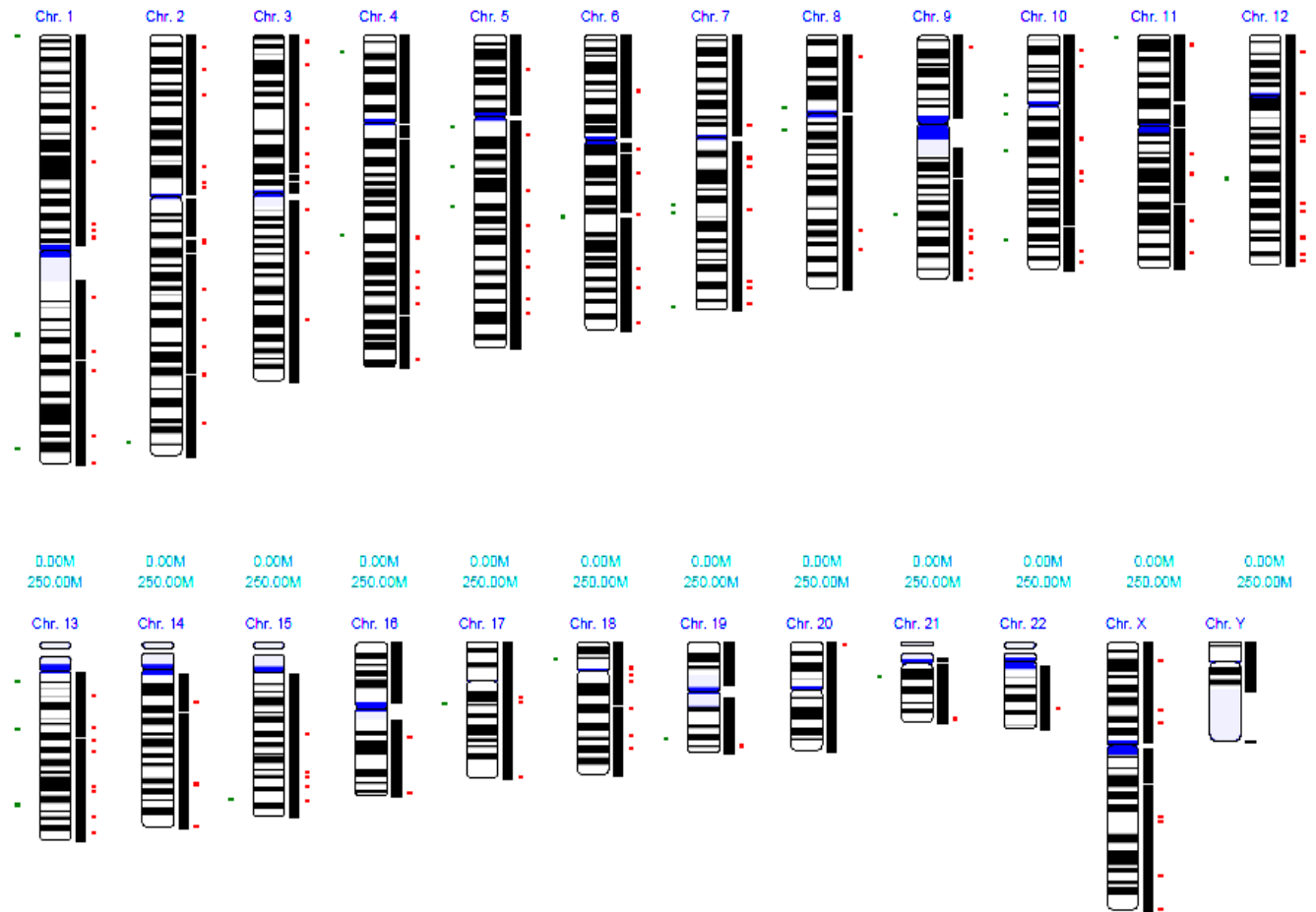


Figura 18. Ideograma de amplificaciones y deleciones por cromosoma de todas las muestras. Se localizan las 298 alteraciones en total a lo largo del genoma de las mujeres con cáncer de mama, del lado derecho de los cromosomas y de color rojo se ubican las amplificaciones, mientras que las deleciones se colocan del lado izquierdo y con coloración verde.

Otra manera de analizar los datos fue comparar los CNVs obtenidas de cada tejido tumoral contra el tejido adyacente de cada mujer, se encontraron en total 207 alteraciones donde predominan las amplificaciones, y la muestra 0109 es la más afectada, mientras que la 24 no posee ninguna diferencia, probablemente debido a que el tejido adyacente ya tenía alteraciones en el número de copias (Figura 19).

Se realizó el ideograma para representar los datos obtenidos en la figura 19, localizándolos sobre todo el genoma humano, observando las citobandas de los cromosomas y con ello es posible notar el tamaño de la variación sobre los mismos (Figura 20).

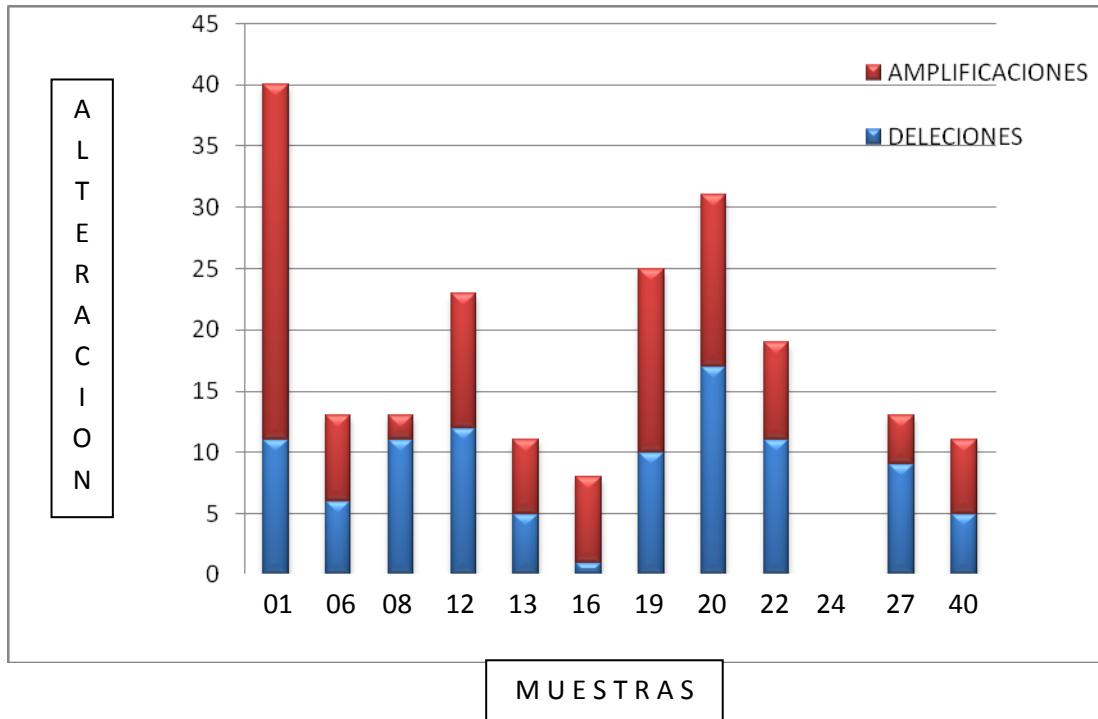


Figura 19. Número de amplificaciones y deleciones por muestra. Se compararon las CNVs de tumores contra su tejido adyacente. En esta grafica se esquematiza de color rojo (superior del gráfico) las amplificaciones y las deleciones (inferior) de color azul. Encontrando 98 deleciones y 109 amplificaciones, en total 207 CNVs.

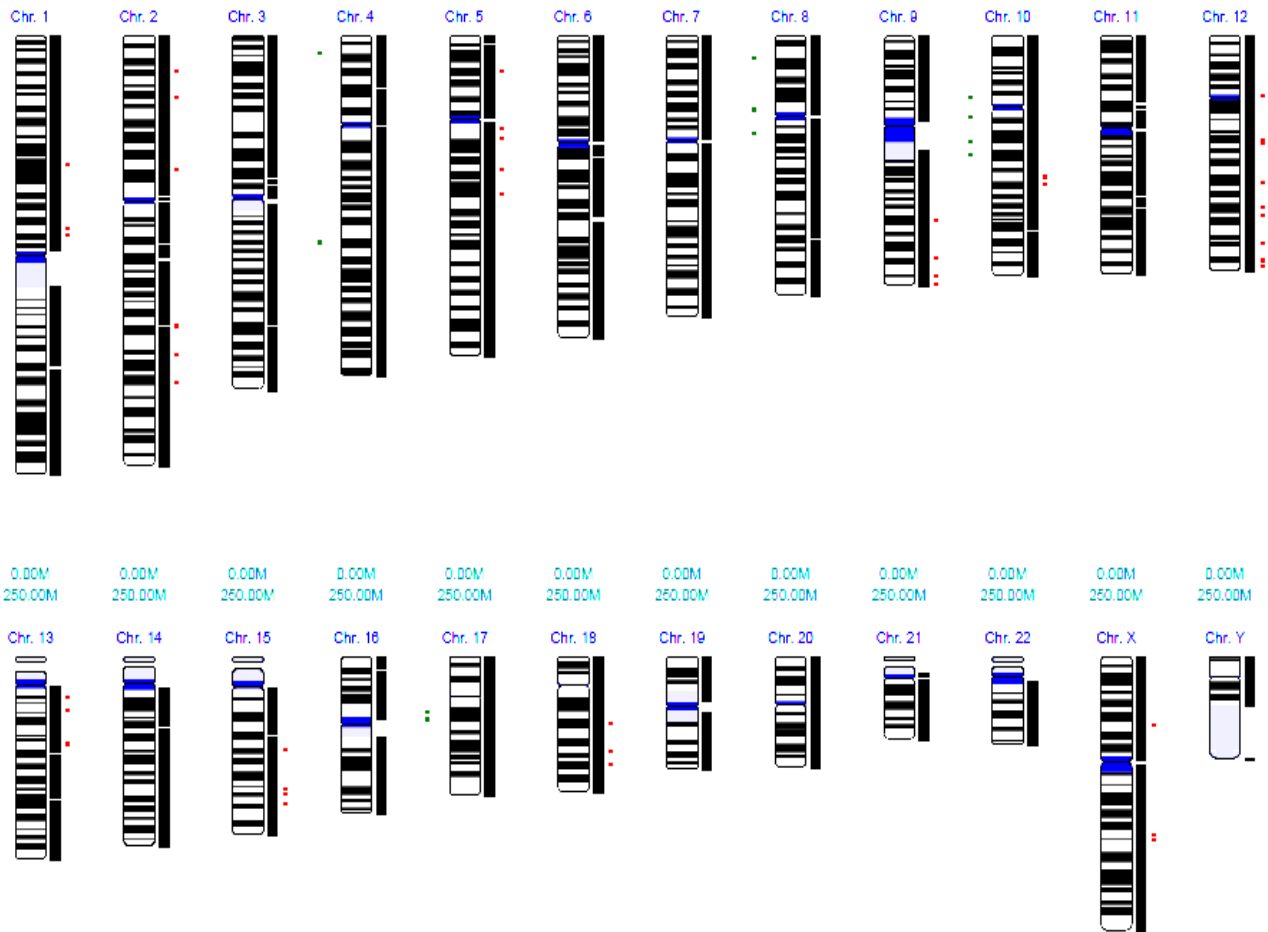


Figura 20. Ideograma de amplificaciones y deleciones por muestras. Al igual que la figura 19 se compararon las CNVs de tumores contra su tejido adyacente. Se esquematiza de color rojo y del lado derecho las amplificaciones y las deleciones de color verde del lado izquierdo de los cromosomas.

Después de localizar las amplificaciones y las deleciones de las muestras y su ubicación, se analizaron en el programa Helix Tree la secuencia de inicio y de término de cada alteración, dando como resultado la localización exacta a lo largo del genoma dando las citobandas afectadas. Estas regiones se muestran relacionadas con los datos clínicos de cada paciente, como es la edad, el estadio clínico del tumor, la expresión de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP). En el caso de la muestra 2409, no se encuentran diferencias, esto probablemente porque el tejido adyacente estaba afectado con las células tumorales y no fue tan lejano para considerarlo un tejido sano se encuentra que la muestra 0109 es la más afectada en cuanto a amplificaciones en comparación con las demás. De manera general se encuentran mayor cantidad de amplificaciones (109) y 98 deleciones, dando un total de 207 CNVs. La edad de las pacientes es en promedio de 46 años, donde la más joven es de 32 años y la de edad más avanzada es de 59 años. Los estadios clínicos analizados correspondieron a: 7 en IIIA, 2 en IIB, 1 en IIA y finalmente 2 en IIB. En cuanto a los receptores, se encontraron 6 +/+, 1 +/-, 1 -/-, 1 -@/-@, 1 +/-@, mientras en dos de los casos esta en determinación de su expresión (Tabla 4)

Posterior al análisis de cada muestra con los datos anteriormente mencionados, cada citobanda con alguna alteración en las regiones afectadas es buscada y localizada en el programa Heat Map de Golden Helix, el cual indica que genes están relacionados con la CNV analizada, como lo indica la Figura 21.

Una vez identificados los genes afectados en las CNVs, el programa Heat Map hace posible el análisis de cada gen en bases de datos informáticas como GeneCards que con lo que se analizaron las características de cada uno de ellos.

GeneCards es una base de datos integral, de los genes humanos que ofrece información concisa relacionada con la genómica en todos los genes humanos conocidos y sus estudios correspondientes.

El Programa GeneCards, es una bases de datos de genes que integra genes relacionados con la transcriptómica, genética, proteómica, información general, funcional y relación con enfermedades, presentando un resumen completo de cada gen, y proporciona los medios para obtener un profundo conocimiento de la biología, por ello su utilización. Fue posible localizar 97 genes a lo largo de todas las regiones alteradas y su posible función, aunque algunos no se conoce todavía su tarea en el genoma y no están bien caracterizados. Se localizó su función biológica y en que procesos se ven involucrados, algunos de ellos tienen relación con respuesta inmune, ciclo celular, sistema nervioso central, desarrollo embrionario, entre otras (Tabla 5)

En la Tabla 6 fueron ubicados los genes en tres grupos, los genes que tienen relación con alguna neoplasia incluyendo el cáncer de mama que son el 87.62% de estos, otro grupo es el reportado en un solo tipo de neoplasia que no es cáncer de mama en relación al 7.21 % y por último, el tercer grupo que son los genes que aún no están involucrados con algún tipo de neoplasia, relacionándolo con el 5.15% de los genes relacionados con las CNVs, tratándose de 6 genes que son: WASH7P, OR4F5, SNORD124, KRT39 y KRTAP3.

Caso No./Clave	Edad	Estadio Clínico	RE	RP	Ganancias	Perdidas
1.0109	32	IIIA	+	+	1p13.2, 2p24.1, 2q24.2, 3p14.1, 5q11.2, 5q14.3, 6p21.33, 7q11.23, 7q22.1, 9q34.2, 9q34.3, 9q33.2, 10p14, 10q26.13, 10q26.2, 12q24.22, 12q24.32, 15q21.3, 15q24.3, 15q25.1, 15q25.2, 13q12.3, 13q14.2, 13q14.3, 18q21.31, Xp11.4, Xp22.1, Xq22.2, Xq28	2p11.2, 3q26.1, 4q26, 5q23.2, 10q21.1, 11q14.1, 11q22.3, 11q13.2, 16q14.2, 19q13.3, Xq26.3
2.0609	53	IIIA	-- ⊙	-- ⊙	4q26, 6q24.2, 11q14.1, 12q21.31, 12q23.2, 14q32.33, 16q12.2	1p32.3, 1p31.1, 2p11.2, 2q31.2, 3p26.2, 8q23.3
3.0809	37	IIIA	+	+	8q23.3, 16q12.2	4p16.1, 13q14.3, 2q22.3, 3p12.1, 4q26, 5p14.3, 6q27, 10q25.3, 11q14.1, 12q23.2, 18q21.31
4.1209	51	IIB	D	D	2q14.1, 4q31.22, 6q24.2, 7q36.2, 8q23.3, 12q14.1, 12q23.2, 13q12.11, 16q12.2, 3p12.1, 15q26.1	1p13.1, 5q11.2, 2q31.2, 7q36.3, 8p11.21, 8q11.23, 12q14.1, 13q31.3, 13q33.1, 15q26.1, 17q12, 17q12-17q21.1-17q21.2
5.1309	54	IIIA	+	--	2q24.2, 8q24.13, 12q14.1, 12q21.32, 18q12.3, 18q22.1	1q36.33, 4q31.22, 7p12.1, 7q22.1, 13q12.11
6.1609	42	IIIA	+	+	1p13.3, 2q32.3, 7q34, 2q24.2, 3p24.3, 7p12.1, 12p11.1	18p11.22
7.1909	56	IIB	D	D	5q11.2, 5q33.1, 12q11.1, 12q21.31, 13q31.1, 14q31.1, 15q25.1, 15q24.2, 17q12, 3p12.1, 4q31.3, 6q24.2, 9q12, 12q14.1, 12q24.22	16q12.2, 2p11.2, 5q23.2, 7q35, 10p11.21, 10q11.21, 10q21.3, 13q14.3, 13q33.1, 18p11.22
8.2009	48	IIIA	+	+	1q24.2, 2p13.1, 5q13.3, 8q23.3, 8q24.13, 10q22.3, 10q23.1, 12q23.1, 12q24.22, 12q24.33, 13q14.3, 5q23.2	3p14.1, 5q11.2, 5q14.3, 6q16.3-6q21, 7q11.23, 7q22.1, 9q34.2, 9q34.3, 10q26.13, 10q26.2, 11p15.5, 12q14.1, 15q21.3, 15q24.3, Xq22.1, Xq22.2, Xq28
9.2209	59	IIIA	--	--	1q25.3, 5p14.3, 5q13.3, 2p22.3	1q25.1, 2q37.1, 3q21.2, 7q34

					2q24.2, 3p12.1 11p15.4, 13q14.3	8p23.1, 11q14.1 12q14.1, 13q21.31 15q25.1, 22q13.1 Xq26.3
10.2409	33	IIIB	+	+	-----	-----
11.2709	48	IIIB	+	+	5p14.3, 12q23.2 15q26.1, 13q34	1q25.1, 2q32.3 3p12.3, 4q26 5q11.2, 5q21.1 5q33.1, 7q21.3 11q13.2- 11q13.3
12.4009	38	II B	+	-- ©	1p13.3, 2q31.2 10q23.1, 8q24.13 8q11.21 16q24.2	2q14.1, 3q21.2 10p11.21, 12q21.31 19q13.33

Tabla 4. Ganancias y pérdidas cromosómicas que se determinaron en cada paciente mexicana con carcinoma ductal sin tratar mediante microarreglos de DNA. En esta tabla se presenta la clave de la muestra, la edad de las pacientes, la estadificación del tejido tumoral, la expresión de los RE y de RP donde (+) es positivo, (--) es negativo, **D** está en determinación de los resultados y (©) las muestras presentan tinción en citoplasma y no en núcleo. Y finalmente la citobanda que se ve afectada, ya sea con ganancia en el número de copias o pérdidas.

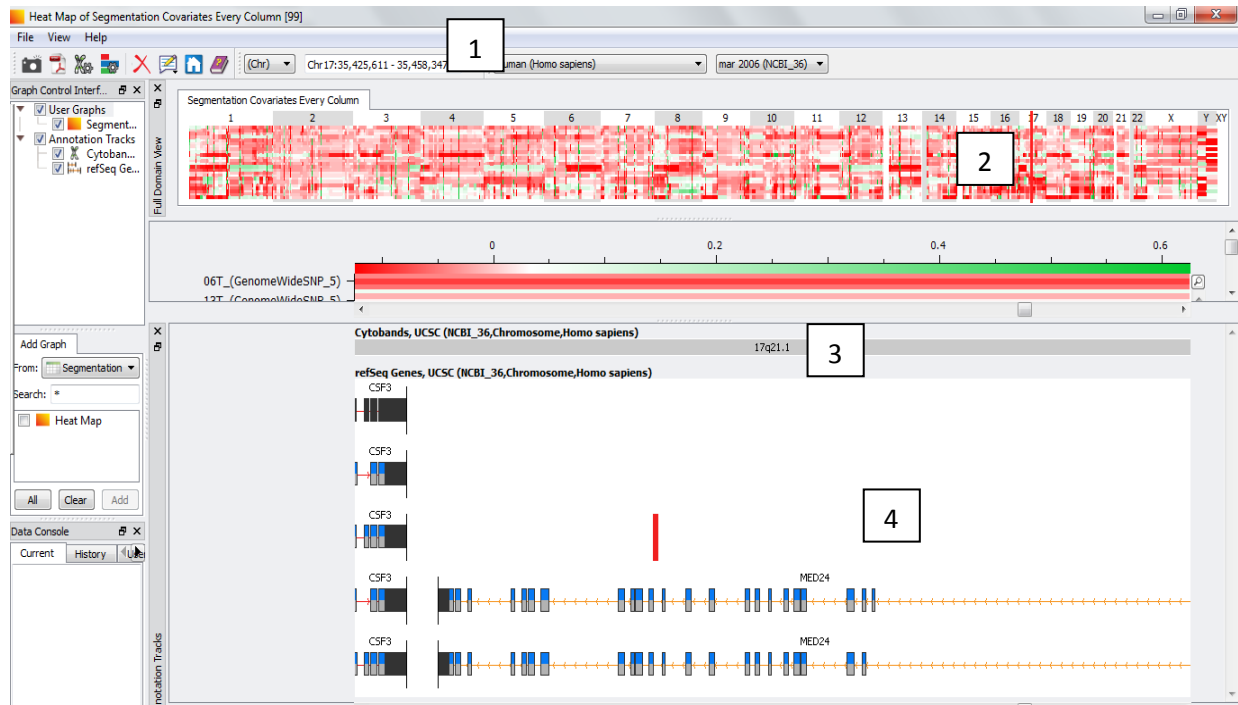


Figura 21. Análisis de genes afectados. Se presenta el análisis de las regiones que están afectadas y los genes que se involucran. **1)** En la parte superior esta la barra de herramientas del programa. **2)** se esquematiza a lo largo del genoma la zona que se está estudiando y los cromosomas. **3)** indica la citobanda que con alteración y **4)** Se señalan los genes que se afectan.

GENES	FUNCIÓN
EDEM3, RPS24, PPIF, KIAA0391	Traducción de proteínas
OR4F5	Receptor olfativo
RABGAP1L	Activador de proteínas
SLC25A24, SLC1A7, VDAC3	Transportador de solutos
VANGL1	Proteína de superficie celular
KCNH7	Liberación de neurotransmisores
TTN, ANK1, TNNT3, UTRN	Funcionamiento y componente muscular
UGT1A3,	La actividad de glucuronosiltransferasa
GALNTL2	Trasferasa
KALRN	Regulación neuronal, crecimiento y plasticidad
MND1	Acoplamiento de cromosomas homólogos y la recombinación
MOCS2	Actividad catalítica y unión de proteínas
ZNF608	Estabilización de proteínas
HACE1	La proteína ubiquitina E3 ligasa puede funcionar en la degradación de proteínas celulares
MICA	MHC
HCP5, HCG26, IKBKB, MARCH8, LSP1, CSF3, CCR7	Respuesta inmune
DPP6	Funcionamiento cerebral, modula la expresión de superficie celular y actividad del canal de potasio
MUC12	protección de las células epiteliales, modula la adhesión y señalización, regulación del crecimiento celular epitelial
SLC26A5	Transporte, percepción sensorial del sonido, regulación de la forma celular
UBE3C	poliubiquitinación proteica, ciclo de ubiquitina
UPK3B	Componente de membrana, diferenciación de células uroteliales
SFRP1	Antiapoptótico, transducción de señales, diferenciación celular
GOLGA7	Transporte de proteínas.
GIN5	Ciclo celular
AGPAT6	biosíntesis de glicerolipidos
MYST3	Empaquetamiento DNA, montaje de nucleosomas, transcripción, modificación de la cromatina, acetilación de histonas, diferenciación y mantenimiento de células mieloides, hematopoyesis embrionaria
AP3M2	Tráfico de los lisosomas
PLAT	Remodelación tisular y degradación, migración celular y neuronal
SLC20A2	Transporte de fosfato, involucrado en la matriz extracelular, cartilago y la calcificación vascular, receptor y confiere susceptibilidad a la infección de células para retrovirus
EXD3	Degradación de ácidos nucleídos
DMBT1	Supresor de tumores, sistema inmune celular y la diferenciación celular
KCNMA1	Control de tono muscular y la excitabilidad neuronal
DLG5	mantenimiento celular y transmisión de señales
POLR3A, MSL1, TOP2A	Replicación del DNA
ZCCHC24	Forma de proteínas
EIF5AL1	Traducción de proteínas, progresión del ciclo celular y regulador de la apoptosis. Extensión neuronal y la supervivencia. Desarrollo y función del cerebro, y en la diferenciación de células madre del músculo esquelético
SFTPA2	Respiración
NRG3	SNC
PARD3	Adaptador de proteínas, formación de uniones estrechas del epitelio. polaridad neuronal y formación de axones
CCTN	Organización de la estructura celular, crecimiento y transformación celular

FGF3, ANO1	Desarrollo embrionario (oído)
CCND1	Regulación del ciclo celular
PPFIA1	Regula la membrana plasmática y su interacción con el medio extracelular y asociación con sustratos
SHANK2	Sinapsis, organización estructural y funcional de la unión columna dendríticas y sinápticas
FAM19A2	Reguladores de la inmunidad y las células nerviosas
RIMBP2	Transmisión sináptica
GPC6	Componentes celulares de transporte
MGAT4C	Glicosiltransferasa
NALCN	Excitabilidad neuronal. Necesaria para el ritmo normal de las vías respiratorias y la supervivencia neonatal
SCAPER	Mantenimiento de citoplasma
CES1P1	En estudio
CDK12	Transcripción, afecta la respuesta a inhibidores de estrógeno
STARD3-StAR	Unión y transporte del colesterol. Promueve la esteroidogénesis en placenta y cerebro
PGAP3	Remodelación y maduración de lípidos
ERBB2	cambios en la expresión génica, citoesqueleto reordenamiento, anti-apoptosis y el aumento de la proliferación de células
NEUROD2	Diferenciación neuronal
IKZF3, MED24, SNORD124	Transcripción
GSDMB	secreción de metabolitos y Mantenimiento de célula epiteliales
GSDMA	Posible supresor de tumores
THRA	Receptores nucleares de hormonas
WIPF2	inducir a la movilización y reorganización del sistema de filamentos de actina
RARA	Espermatogénesis y Regula la expresión de genes. Media del ácido retinoico inducida granulopoyesis
IGFBP4	Factor de crecimiento
TNS4	Migración celular, el desarrollo del cartílago, en las vías de transducción de señales
SMARCE1	Transcripción y crecimiento de dendritas
KRT22	Queratina
KRT24 , KRT10, KRT23, KRT25	Elemento de las células epiteliales
TMEM99	Proteína transmembranal
KRT12	Integridad del epitelio corneal
KRT39, KRT40, KRTAP3	Diferenciación de pelo
VAPA	Tráfico de vesículas
CT45A1	Antígeno testicular de Cancer
FLNA	Componente de membrana. señalización de proteínas
EMD	Estabiliza y favorece la formación de una red cortical de actina nuclear. Enlaces centrosomas a la envoltura nuclear, cofactores de la infección VIH-1

Tabla 5. Genes identificados en las regiones de las CNVs de la población con cáncer de mama estudiada. La tabla muestra 97 genes que se ven afectados en las regiones con alguna alteración. Estos genes fueron localizados con ayuda del programa Heat Map (Golden Helix) y sus características con el programa GeneCards (www.genecards.org).

GENES REPORTADOS EN ALGUNA NEOPLASIA O CANCER DE MAMA	REPORTADO EN UN SOLO CASO DE CANCER	GENES SIN REPORTE EN NEOPLASIAS
EDEM3, RABGAP1L, SLC25A24, SLC1A7, VANGL1, TTN, UGT1A3, GALNTL2, KALRN, MND1, MOCS2, ZNF608, HACE1, HCP5, HCG26, UTRN, DPP6, MUC12, SLC26A5, UBE3C, UPK3B, SFRP1, GOLGA7, GINS4, AGPAT6, ANK1, MYST3, AP3M2, PLAT, IKBKB, VDAC3, SLC20A2, EXD3, DMBT1, KCNMA1, DLG5, POLR3A, RPS24, PPIF, ZCCHC24, SFTPA2, MARCH8, PARD3, CCTN, FGF3, CCND1, ANO1, PPFIA1, SHANK2, LSP1, TNNT3, FAM19A2, RIMBP2, GPC6, MGAT4C, NALCN, KIAA0391, SCAPER, CDK12, STARD3, PGAP3, ERBB2, NEUROD2, IKZF3, GSDMB, MED24, CSF3, THRA, MSL1, WIPF2, RARA, TOP2A, IGFBP4, TNS4, CCR7, SMARCE, KRT24, TMEM99, KRT10, KRT12, KRT23, VAPA, CT45A1, FLNA, EMD.	KCNH7, NRG3, GSDMA, KRT222, KRT25, KRT40, CES1P1.	WASH7P, OR4F5, SNORD124, KRT39, KRTAP3.

Tabla 6. Relación de genes localizados en CNVs con alguna neoplasia. Se localizaron 97 genes en total, 85 genes con relación con alguna neoplasia incluyendo cáncer de mama (87.62%), 6 genes involucrados en una neoplasia (6.18%), sin incluir cáncer de mama, y 6 genes sin relación a ninguna neoplasia (6.18%), únicamente en las muestras estudiadas.

DISCUSION

El cáncer continúa siendo una importante causa de muerte en la sociedad moderna. Los procesos involucrados en el desarrollo del cáncer son muy complejos e incluyen alteraciones en genes implicados en la proliferación celular. Entre estas alteraciones o variaciones genéticas se incluyen las mutaciones, pérdida o alteración en función de genes supresores de tumores, susceptibilidad genética por SNP (Chung, 2002), así también se sugiere que las CNVs poseen un papel muy importante en el cáncer

Los genes generalmente se encuentran en dos copias, una heredada de cada padre. Sin embargo, se han encontrado aproximadamente 2.900 genes (más del 10 por ciento de los genes del genoma humano), con variaciones en el número de copias de segmentos específicos de DNA.

Las CNVs en el DNA han sido asociadas a trastornos genómicos, pero su ubicuidad en los genomas de mamíferos no han sido estudiado hasta hace relativamente poco tiempo, dado que muchas CNVs dan lugar a diferentes niveles de la expresión génica, las CNVs pueden representar una proporción significativa de la variación normal fenotípica.

Los esfuerzos actuales se dirigen hacia un enfoque más integral de catalogación y caracterización de las CNVs que servirá de base para la determinación y entendimiento de los impactos de la diversidad genómica, función biológica, evolución y las enfermedades humanas (Freeman y cols., 2006) como el cáncer de mama.

El cáncer de mama es hoy en día un problema de salud muy grande, en México es la primer causa de muerte en mujeres mayores de 35 años y cada vez se presentan casos a edad más joven. Es de suma importancia entender este tipo de enfermedades complejas, ya que es relevante identificar a la población con predisposición o riesgo asociado a este tipo de enfermedades.

Para la realización de este estudio se creó un banco de tejidos en el que se colectaron 64 muestras de tejido tumoral con su respectivo tejido adyacente, de las cuales únicamente 12 muestras fueron aptas para su utilización en este proyecto, ya que muchas pacientes tenían familiares con antecedentes de cáncer de mama o algún tipo de neoplasia, o bien, el porcentaje de las células cancerosas era muy bajo.

Por otro lado, se realizaron los estudios de Inmunohistoquímica, para contribuir en el posible tratamiento que pudieran darles a las donadoras de tejido y también tratar de corroborar nuestros resultados. Ya que, el cáncer de mama es dependiente de hormonas, su comportamiento biológico depende en gran medida de la acción de estrógenos y progestágenos. Los estrógenos son responsables de la elongación y ramificación de los ductos mamarios y la progesterona del desarrollo y diferenciación de los lobulillos. Ambas hormonas actúan en los tejidos blancos a través de receptores específicos y se sabe que en el cáncer de mama su expresión se encuentra alterada (Clemons, 2001), y probablemente, puede afectar la expresión de genes (Hawkins, 2000). Los receptores tanto de estrógenos como progesterona, se encuentran expresados o no, en el núcleo de las células en este caso neoplásicas, y en las muestras analizadas se encontraron en algunos casos expresados en el citoplasma de la célula. Se localizan en el citoplasma cuando no están ocupados por la hormona correspondiente; sin embargo, una vez que se ocupan surgen múltiples receptores a nivel de la cromatina nuclear (receptor nuclear). En este estudio, no es posible relacionar las CNVs con la expresión de receptores, ni con el estadio tumoral de estudio.

La frecuencia de los receptores hormonales en pacientes con cáncer de mama es semejante a la reportada en otras series de países desarrollados, la cual va del 60 al 70% (Sánchez y Sánchez, 2003).

En el caso de la estirpe histológica continúa siendo el tipo ductal, la neoplasia mamaria más común, como se menciona en la literatura (González-Merlo, 2003).

Después de seleccionar las muestras a usar se extrajo el DNA a cada una de ellas. Este DNA se obtuvo a una buena concentración, sin contaminantes, ni degradación, y posteriormente se llevaron a cabo los microarreglos como se explicó anteriormente. La realización de los microarreglos fue adecuada ya que su análisis en la consola de Affymetrix lo confirmó con los valores anteriormente mencionados.

En este estudio se describe por medio de microarreglos de genotipificación variaciones genéticas (CNVs) en una muestra de nuestra población mexicana con carcinoma ductal esporádico. La utilización de arreglos de alta densidad de SNPs no es una técnica muy frecuente ya que el costo es excesivo y existe poca disponibilidad económica de este tipo de tecnología para muchos investigadores, sin embargo es una técnica novedosa, relativamente

sencilla y eficaz en la aproximación de estudios de enfermedades complejas como el cáncer de mama y su utilización tiene la gran ventaja al estudiar el genoma completo, en un solo análisis.

Los microarreglos que se usaron (Genome wide SNP 5.0, Affymetrix) permitieron evaluar regiones a lo largo de todo el genoma e identificar las regiones de CNVs en una muestra de población con problemas de cáncer de mama. Estas plataformas se caracterizan por poseer todos los SNPs de la matriz de 500K, así como 420.000 sondas adicionales no polimórficas que miden otras diferencias genéticas, como la variación del número de copias. Los SNPs en la matriz están presentes en 200 a 1,100 pares de bases, obtenidos con la fragmentación de las enzimas Nsp I o Sty I en el genoma humano completo.

Para continuar con el estudio *in silico* de todas las plataformas se utilizó el programa Golden Helix que es una herramienta bioinformática que permite disponer de los recientes, mapas genéticos y localizando así, las CNVs particulares del cáncer de mama a lo largo del genoma en una población mexicana. La identificación y detección de los cambios en CNVs es un objetivo a considerar importante, útil y lo novedoso, y sobre todo, no existen estudios previos en México sobre la utilización de esta tecnología. Por lo tanto, los arreglos de alta resolución de todo el genoma humano están modificando la forma de detección de las anomalías cromosómicas e implica un nuevo objetivo que los investigadores deben de considerar para analizar alteraciones en CNVs, pérdida de heterocigosidad, entre otros usos.

El cáncer de mama esporádico se caracteriza por ser a nivel molecular, muy heterogéneo. Los genes como ErbB2, MYC HIC1, entre otros se encuentran frecuentemente alterados en esta neoplasia, sin embargo, el papel de estos genes y el número de genes implicados en la enfermedad no son claras (Valladares y cols, 2004).

En estudios anteriores de cáncer de mama en México, se encontró que las amplificaciones en el DNA son los mecanismos principales de la activación de oncogénes. Es de destacar que se han encontrado amplificación cromosómica y sobreexpresión de los genes como BGN, PLXNB3, LAMC1, PCTK3, CCNC, CCND1, FGF3, PKTK2 y L1CAM, en muestras de cáncer de mama en México. En algunos casos, la sobreexpresión promueve un avance en el proceso neoplásico, como por ejemplo LAMC1, presente en la mayoría de las membranas celulares, y participan en diversos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo actividad angiogénica y la carcinogénesis en el hígado. Mientras que en las regiones con pérdidas en unas regiones se

encontraron genes como CASP9, FGR, TP73, TNFRS1B, HSPG2, ERCC1, FRAP1, EPHA2, ILI2A, E2F5, TNFRSF10A, TNFRSF10B, EFNB3 Y BCL2 (Valladares y cols., 2006).

El ciclo de división celular eucariótica está regulada por una familia de las proteínas cinasas y las cinasas dependientes de ciclina (Valladares, 2006). En el caso de nuestro experimento se localizaron genes como CCND1, pertenecientes a las ciclinas, se encuentra amplificado en algunos casos. Esta proteína cinasa se reporta como sobreexpresada de 30-50% de los cánceres de mama, pero el gen está amplificado en pocas muestras, lo que sugiere que hay otros mecanismos que pueden llevar a la desregulación de la expresión de este gen en el cáncer de mama.

Identificamos genes que están implicados en la respuesta inmune ya que los tumores expresan antígenos que son reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del portador del tumor, provocando así respuesta inmune, pero aun así no se logra impedir el crecimiento tumoral, ya que la mayoría de los tumores tienden a ser débilmente inmunógenos, por mencionar algunos genes alterados en número de copias son: HCP5, HCG26, IKBKB, MARCH8, LSP1, CSF3, CCR7.

Se han descrito genes como COX2 y HB-EGF, que están descritos en la movilidad y capacidad de invasión de las células cancerígenas, sirven también de "intermediarios" en el mecanismo de propagación del cáncer desde el pecho hasta el cerebro. Y se han descrito genes como ST6GALNAC5, es el que da a las células enfermas del cáncer de mama la capacidad de abandonar el sistema circulatorio e incluso atravesar la barrera hematoencefálica, ya que este gen crea una capa protectora sobre las células de cáncer de mama para la invasión. La metástasis del cáncer de mama al cerebro al sistema nervioso en general, ocurre normalmente años después de que se haya extirpado un tumor de mama. Se está estudiando el papel que desempeñan genes implicados en cáncer del sistema nervioso para determinar cómo las células tumorales del cáncer de mama se liberan y cómo, una vez que se trasladan, deciden dónde atacar. Ello quiere decir que las células cancerígenas utilizan la protección que les ofrece ese gen específico del cerebro para infiltrarse (Bos, P. y cols, 2009). Probablemente en nuestro proyecto se encontraron alteración en el número de copias de genes relacionados al sistema nervioso, debido a que las células se están preparando para realizar metástasis y propagarse por otros órganos.

Por otra parte, se localizaron genes alterados que se encargan del desarrollo embrionario, la relación que estos genes tienen con el cáncer es que se cree, que durante el desarrollo embrionario, las células que se van multiplicando deciden qué tipo de células serán en el futuro y qué no debe ser. Para coordinar y dirigir el destino de cada célula, algunos genes se encargan de activar o desactivar a otros genes que definen su especialización durante el desarrollo y también actúan en la renovación de células para el mantenimiento de tejidos y órganos, controla el destino y la memoria celular. Cuando los genes están activos abren camino a la especialización de la célula apartando a las proteínas que bloqueaban la transcripción de los genes que definirán su destino. El problema cuando el control del destino celular no funciona, desencadena problemas en la célula puesto que se convierte en una célula sin control (Richly y cols., 2010). Por mencionar algunos genes alterados de desarrollo embrionario que se encontraron en el este análisis están: FGF3, ANO1, entre otros. Estos genes ofrecen buenas perspectivas para entender mejor los procesos tumorales y cancerígenos a largo plazo.

Estudios en diferentes lugares del mundo como son los países Bajos, Estados Unidos, Singapur y Bélgica, al comparar y unir datos sobre CNVs en cáncer de mama, detectaron 109 regiones recurrentes ya sea amplificadas o eliminadas. Muchas de estas regiones fueron enriquecidas por los genes que participan en muchos procesos importantes relacionados con la tumorigénesis y la progresión del cáncer. Los genes del cáncer conductor descubierto por el marco son los oncogenes no sólo conocido sino también una serie de nuevos genes de susceptibilidad al cáncer validado a través de experimentos de siRNA. Los genes que se mantuvieron en estas poblaciones son los siguientes: ECT2, PIK3CA, PSMD2, CLCN2, POLR2H, CTBP1, TACC3, GRK6, DDX41, CLU, NRBP2, MAP3K11, ADRBK1, RPS6KB2, LRP5, CPT1A, DCI, PDPK1, POLR2C, KIFC3, CSNK2A2, por mencionar algunos, en total fueron 41 genes en común (Tran, 2011).

En comparación con los estudios de Tran y colaboradores (2011), en nuestro trabajo no encontramos genes en común con los reportados en esas 4 poblaciones estudiadas.

Sin embargo, encontramos 97 genes que están en CNVs en muestras de mujeres mexicanas, de los cuales el 87.62% están reportados con alguna alteración a nivel de expresión o bien de proteína en alguna neoplasia incluyendo el cáncer de mama, mientras que el 7.21% están relacionadas a una sola neoplasia y el resto (5.15%) de éstos, no está reportado en ninguna neoplasia. Estos genes son, WASH7P, OR4F5, SNORD124, KRT39, KRTAP3.

Encontramos CNVs en muchas regiones en las que no se han descrito genes codificantes, por lo que estos CNVs deberán tener alguna papel en el desarrollo neoplásico.

En este proyecto se analizaron las CNVs en el cáncer de mama, en una población de mujeres con esta patología, sin embargo, este estudio da pauta a continuar con el análisis exhaustivo de los microarreglos realizados ya que arrojan demasiada información acerca de la neoplasia o bien de genes y regiones que se localizaron en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. El estudio de las CNVs es de suma importancia, ya que puede servir de base para la determinación y entendimiento de los impactos de la diversidad genómica, función biológica y las enfermedades humanas como el cáncer de mama.
2. Se logró determinar las CNVs en neoplasias mamarias de mujeres mexicanas comparándolos con sus testigos (tejido adyacente) encontrando un total de 298 alteraciones, de las cuales el 53.69 % fueron amplificaciones y 46.30% deleciones.
3. No es posible hacer una relación entre las CNVs encontradas en este estudio, con respecto a la expresión de receptores, o bien, con el estadio clínico de cada paciente.
4. Se encontraron 97 genes relacionados a las diferentes regiones alteradas con CNVs. Dado que muchas CNVs incluyen genes que dan lugar a los distintos niveles de la expresión génica, las CNVs pueden representar una proporción significativa de la variación normalidad fenotípica.
5. El 5.15 % de los genes que se encontraron en las CNVs localizadas en las mujeres mexicanas, no se han relacionado aún con algún tipo de neoplasia.

PERSPECTIVAS

1. Validar genes específicos en nuestra población por PCR en tiempo real, establecer qué relación tienen estos genes con las CNVs.
2. Es muy importante estudiar CNVs en una población mayor, para ampliar el conocimiento sobre esta enfermedad, proponer blancos terapéuticos, encontrar biomarcadores, ayudar al diagnóstico, el pronóstico y estudiar la predisposición genética a este tipo de enfermedades.
3. Analizar ampliamente los microarreglos, ya que permite estudiar no solamente CNVs, si no también desequilibrio de ligamiento y pérdida de heterocigocidad.

REFERENCIAS

- ✓ Ahmed, S., Thomas, G., Ghousaini, M., Healey, C., Humphreys, M., Platte, R., Morrison, J., Maranian, M., Pooley, K., Luben, R., Eccles, D., Evans, D., Fletcher, O., Johnson, N., dos Santos Silva, I., Peto, J., Stratton, M., Rahman, N., Jacobs, K., Prentice, R., Anderson, G., Rajkovic, A., Curb, J., Ziegler, R., Berg, C., Buys, S., McCarty, C., Feigelson, H., Calle, E., Thun, M., Diver, W., Bojesen, S., Nordestgaard, B., Flyger, H., Dörk, T., Schürmann, P., Hillemanns, P., Karstens, J., Bogdanova, N., Antonenkova, N., Zalutsky, I., Bermisheva, M., Fedorova, S., Khusnutdinova, E., Kang, D., Yoo, K., Noh, D., Ahn, S., Devilee, P., van Asperen, C., Tollenaar, R., Seynaeve, C., Garcia-Closas, M., Lissowska, J., Brinton, L., Peplonska, B., Nevanlinna, H., Heikkinen, T., Aittomäki, K., Blomqvist, C., Hopper, J., Southey, M., Smith, L., Spurdle, A., Schmidt, M., Broeks, A., van Hien, R., Cornelissen, S., Milne, R., Ribas, G., González-Neira, A., Benitez, J., Schmutzler, R., Burwinkel, B., Bartram, C., Meindl, A., Brauch, H., Justenhoven, C., Hamann, U., Chang-Claude, J., Hein, R., Wang-Gohrke, S., Lindblom, A., Margolin, S., Mannermaa, A., Kosma, V., Kataja, V., Olson, J., Wang, X., Fredericksen, Z., Giles, G., Severi, G., Baglietto, L., English, D., Hankinson, S., Cox, D., Kraft, P., Vatten, L., Hveem, K., Kumle, M., Sigurdson, A., Doody, M., Bhatti, P., Alexander, B., Hooning, M., van den Ouweland, A., Oldenburg, R., Schutte, M., Hall, P., Czene, K., Liu, J., Li, Y., Cox, A., Elliott, G., Brock, I., Reed, M., Shen, C., Yu, J., Hsu, G., Chen, S., Anton-Culver, H., Ziogas, A., Andrulis, I., Knight, A., Beesley, J., Goode, E., Couch, F., Chenevix-Trench, G., Hoover, R., Ponder, B., Hunter, D., Pharoah, P., Dunning, A., Chanock, S. y Easton, D., (2009). Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet* 41, 585-90.
- ✓ American Cancer Society Surveillance Program (2003). Estimated new cancer cases by sex and age Atlanta, American Cancer Society.
- ✓ AJCC, sexta edición. Enero 2003.
- ✓ Bertram J., (2000). The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 21, 167-223.
- ✓ Braude, I., Vukovic, B., Prasad, M., Marrano, P., Turley, S., Barber, D., Zielenska, M. y Squire, J., (2006). Large scale copy number variation (CNV) at 14q12 is associated with the presence of genomic abnormalities in neoplasia. *BMC Genomics* 7, 138.
- ✓ Bos, P., Bos, P., Zhang, X., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R., Nguyen, D., Minn, A., van de Vijver, M., Gerald, W., Foekens, J. y Massagué, J., (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 461, 1005-1009.

- ✓ Chin, S., Teschendorff, A., Marioni, J., Wang, Y., Barbosa-Morais, N., Thorne, N., Costa, J., Pinder, S., van de Wiel, M., Green, A., Ellis, I., Porter, P., Tavaré, S., Brenton, J., Ylstra, B. y Caldas, C., (2007). High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol* 8, 215.
- ✓ Chung C., Bernard, P. y Perou, C., (2002). Molecular portraits and the family tree of cancer. *Nature Gen Suppl* 32, 533-540.
- ✓ Clark, M., (2001). Interpreting and integrating risk factors for patients with primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 30, 17-21.
- ✓ Clemons, M. y Goss, P., (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344, 276-285.
- ✓ Cox, A., Dunning, A., Garcia-Closas, M., Balasubramanian, S., Reed, M., Pooley, K., Scollen, S., Baynes, C., Ponder, B., Chanock, S., Lissowska, J., Brinton, L., Peplonska, B., Southey, M., Hopper, J., McCredie, M., Giles, G., Fletcher, O., Johnson, N., dos Santos Silva, I., Gibson, L., Bojesen, S., Nordestgaard, B., Axelsson, C., Torres, D., Hamann, U., Justenhoven, C., Brauch, H., Chang-Claude, J., Kropp, S., Risch, A., Wang-Gohrke, S., Schürmann, P., Bogdanova, N., Dörk, T., Fagerholm, R., Aaltonen, K., Blomqvist, C., Nevanlinna, H., Seal, S., Renwick, A., Stratton, M., Rahman, N., Sangrajrang, S, Hughes, D., Odefrey, F., Brennan, P., Spurdle, A., Chenevix-Trench, G., Beesley, J., Mannermaa, A., Hartikainen, J., Kataja, V., Kosma, V., Couch, F., Olson, J., Goode, E., Broeks, A., Schmidt, M., Hogervorst, F., Van't Veer, L., Kang, D., Yoo, K., Noh, D., Ahn, S., Wedrén, S., Hall, P., Low, Y., Liu, J., Milne, R., Ribas, G., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Sigurdson, A., Stredrick, D., Alexander, B., Struewing, J., Pharoah, P. y Easton D., (2007). A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet* 39, 352-358.
- ✓ Diaz-Faes, J., y Ruibal, A., (2006). *Cáncer de Mama: Avances en diagnóstico, tratamiento e investigación*. Fundación de Estudios Mastológicos, España.
- ✓ Desai, K., Kavanaugh, C., Calvo, A. y Green, J., (2002). Chipping away at breast cancer: insights from microarray studies of human and mouse mammary cancer. *Endocr Relat Cancer*, 9: 207-220.
- ✓ De Vita, T., Hellman, S. y Rosenberg, S., (2004). *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 7th Ed.
- ✓ Easton, D., Pooley, K., Dunning, A., Pharoah, P., Thompson, D., Ballinger, D., Struewing, J., Morrison, J., Field, H., Luben, R., Wareham, N., Ahmed, S., Healey, C.,

- Bowman, R., Meyer, K., Haiman, C., Kolonel, L., Henderson, B., Le Marchand, L., Brennan, P., Sangrajrang, S., Gaborieau, V., Odefrey, F., Shen, C., Wu, P., Wang, H., Eccles, D., Evans, D., Peto, J., Fletcher, O., Johnson, N., Seal, S., Stratton, M., Rahman, N., Chenevix-Trench, G., Bojesen, S., Nordestgaard, B., Axelsson, C., Garcia-Closas, M., Brinton, L., Chanock, S., Lissowska, J., Peplonska, B., Nevanlinna, H., Fagerholm, R., Eerola, H., Kang, D., Yoo, K., Noh, D., Ahn, S., Hunter, D., Hankinson, S., Cox, D., Hall, P., Wedren, S., Liu, J., Low, Y., Bogdanova, N., Schürmann, P., Dörk, T., Tollenaar, R., Jacobi, C., Devilee, P., Klijn, J., Sigurdson, A., Doody, M., Alexander, B., Zhang, J., Cox, A., Brock, I., MacPherson, G., Reed, M., Couch, F., Goode, E., Olson, J., Meijers-Heijboer, H., van den Ouweland, A., Uitterlinden, A., Rivadeneira, F., Milne, R., Ribas, G., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Hopper, J., McCredie, M., Southey, M., Giles, G., Schroen, C., Justenhoven, C., Brauch, H., Hamann, U., Ko, Y., Spurdle, A., Beesley, J., Chen, X., Mannermaa, A., Kosma, V., Kataja, V., Hartikainen, J., Day, N., Cox, D. y Ponder, B., (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447, 1087-93.
- ✓ Estivill, X. y Armengol, L., (2007). Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet* 3, 1787–1799.
 - ✓ Ellsworth, R., Decewicz, D., Shriver, C. y Ellsworth, D., (2010). Breast cancer in the personal genomics Era. *Current Genomics* 11, 146-161.
 - ✓ Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. y Parkin, M., (2004). *Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. ARC Cancer Base No 5. Lyon: ARC Press.
 - ✓ Futreal, P. Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N. y Stratton, M., (2004). A census of human cancer genes. *Nature Rev. Cancer* 4, 177–183.
 - ✓ Freeman, J., Perry, G., Feuk, L., Redon, R., McCarroll, S., Altshuler, D., Aburatani, H., Jones, K., Tyler-Smith, C., Hurles, M., Carter, N., Scherer, S. y Lee, C., (2006). Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research* 16: 949-961.
 - ✓ Gallagher, C., Chen, J. y Kovach, J., (2010). Environmental cadmium and breast cancer risk, *Aging* 2, 804-814.
 - ✓ Ghousaini, M. y Pharoah, P., (2009). Polygenic susceptibility to breast cancer: current state of the art. *Future Oncol* 5, 689-701.
 - ✓ Gnerlich, L. Deshpande, A., Jeffe, D., Sweet, A., White, N. y Margenthaler, J., (2009). Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with

- older women is attributed to poorer survival in early stage disease. *J Am Coll Surg* 208, 341-347.
- ✓ González-Merlo. (2003). *Ginecología Oncológica cáncer de mama*. Segunda edición, editorial Masón, México.
 - ✓ Gold, B., Kirchoff, T., Stefanov, S., Lautenberger, J., Viale, A., Garber, J., Friedman, E., Narod, S., Olshen, A., Gregersen, P., Kosarin, K., Olsh, A., Bergeron, J., Ellis, N., Klein, R., Clark, A., Norton, L., Dean, M., Boyd, J. y Offit, K., (2008). Genome-wide association study provides evidence for a breast cancer risk locus at 6q22.33. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4340-4345.
 - ✓ Hawkins, R., (2000). How best to express oestrogen receptor activity. *Eur J. Cancer* 36, 21-23.
 - ✓ Hidalgo, A. y Jimenez, G., (2009). Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Publica de Mexico* 51, 197-207.
 - ✓ Hunter, D. Kraft, P., Jacobs, K., Cox, D., Yeager, M., Hankinson, S., Wacholder, S., Wang, Z., Welch, R., Hutchinson, A., Wang, J., Yu, K., Chatterjee, N., Orr, N., Willett, W., Colditz, G., Ziegler, R., Berg, C., Buys, S., McCarty, C., Feigelson, H., Calle, E., Thun, M., Hayes, R., Tucker, M., Gerhard, D., Fraumeni, J., Hoover, R., Thomas, G. y Chanock, S., (2007). A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet* 39, 870-874.
 - ✓ Incidencia global del Cancer (GLOBOCAN) (2008). Estadísticas Mundial contra el Cáncer
 - ✓ Iwasa, Y., Michor, F., Komarova, L. y Nowak, M., (2005). Population genetics of tumor suppressor genes. *J Theor Biol* 233, 15-23.
 - ✓ Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E. y Forman, D., (2011). Global cancer stadistics. *Ca Cancer J Clin* 61, 69–90.
 - ✓ Khanna, K. y Chenevix, T., (2004). ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 247-262.
 - ✓ Knaul, F., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola, H., Langer, A y Frenk, J., (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Publica Mex* 2, 335-344.
 - ✓ Kulie, T. Slattengren, A., Redmer, J., Counts, H., Eglash, A. y Schragar, S., (2011). Obesity and women's health: an evidence-based review. *J Am Board Fam Med* 24, 75–85.
 - ✓ Lewin, B., (2008), *Genes IX*. Ed. Mc Graw Hill. Mexico, D. F.

- ✓ Liu, W., Gao, Y., Zhou, L., Duan, A., Tan, L., Li, W., Yan, M., Yang, H., Yan, S., Wang, M. y Ding, W., (2011). Observations on Copy Number Variations in a Kindney- yang Deficiency Syndrome Family. *Evid Based Complement Alternat Med*: 2011:548358.
- ✓ Namba, R., Maglione, J., Davis, R., Baron, C., Liu, S., Carmack, C., Young, L., Borowsky, A., Cardiff, R. y Gregg, J., (2006). Heterogeneity of mammary lesions represent molecular differences. *BMC Cancer* 6, 275-278.
- ✓ Narod, S., y Foulkes, W., (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 4, 665–676.
- ✓ Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. y Gustafsson, J., (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 81,1535-1565.
- ✓ Pankratz, N., Pankratz, N., Dumitriu, A., Hetrick, K., Sun, M., Latourelle, J., Wilk, J., Halter, C., Doheny, K., Gusella, J., Nichols, W., Myers, R., Foroud, T., DeStefano, A.; PSG-PROGENI y GenePD Investigators, Coordinators and Molecular Genetic Laboratories, (2011). Copy number variation in familial Parkinson disease. *PLoS One* 6, 20988.
- ✓ Perry, G., Tchinda, J., McGrath, S., Zhang, J., Picker, S., Cáceres, A., Lafrate, A., Tyler-Smith, C., Scherer, S., Eichler, E., Stone, A. y Lee, C., (2006). Hotspots for copy number variation in chimpanzees and humans. *PNAS* 103, 8006-8011.
- ✓ Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K., Feuk, L., Perry, G., Andrews, T., Fiegler, H., Shapero, M., Carson, A., Chen, W., Cho, E., Dallaire, S., Freeman, J., González, J., Gratacòs, M., Huang, J., Kalaitzopoulos, D., Komura, D., MacDonald, J., Marshall, C., Mei, R., Montgomery, L., Nishimura, K., Okamura, K., Shen, F., Somerville, M., Tchinda, J., Valsesia, A., Woodwark, C., Yang, F., Zhang, J., Zerjal, T., Zhang, J., Armengol, L., Conrad, D., Estivill, X., Tyler-Smith, C., Carter, N., Aburatani, H., Lee, C., Jones, K., Scherer, S. y Hurles M., (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444; 444-454.
- ✓ Richly H, Rocha-Viegas, L., Ribeiro, J., Demajo, S., Gundem, G., Lopez-Bigas, N., Nakagawa, T., Rospert, S., Ito, T. y Di Croce, L., (2010). Transcriptional activation of polycomb-repressed genes by ZRF1. *Nature* 468, 1124-1128.
- ✓ Romero, M., Santillán L., Olvera, P., Morales, M. y Ramírez V., (2008). Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecol Obstet Mex* 76,667-72.

- ✓ Sánchez, B. y Sánchez, F., (2003). Tratado de las enfermedades de la glándula mamaria 1 era edición. Editorial Manual Moderno, México.
- ✓ Sandoval, G. y Cárdenas, S., (2005). Segunda revisión del Consenso Nacional Sobre el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario. Colima, México.
- ✓ Shiana, K. y Willard, H., (2006). Human genomics: in search of normality. *Nature* 7118, 444-454.
- ✓ Stacey, S., Manolescu, A., Sulem, P., Rafnar, T., Gudmundsson, J., Gudjonsson, S., Masson, G., Jakobsdottir, M., Thorlacius, S., Helgason, A., Aben, K., Strobbe, L., Albers-Akkers, M., Swinkels, D., Henderson, B., Kolonel, L., Le Marchand, L., Millastre, E., Andres, R., Godino, J., Garcia-Prats, M., Polo, E., Tres, A., Mouy, M., Saemundsdottir, J., Backman, V., Gudmundsson, L., Kristjansson, K., Bergthorsson, J., Kostic, J., Frigge, M., Geller, F., Gudbjartsson, D., Sigurdsson, H., Jonsdottir, T., Hrafnkelsson, J., Johannsson, J., Sveinsson, T., Myrdal, G., Grimsson, H., Jonsson, T., von Holst, S., Werelius, B., Margolin, S., Lindblom, A., Mayordomo, J., Haiman, C., Kiemenev, L., Johannsson, O., Gulcher, J., Thorsteinsdottir, U., Kong, A. y Stefansson, K., (2007). Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 39, 865-869.
- ✓ Stacey, S. Manolescu, A., Sulem, P., Thorlacius, S., Gudjonsson, S., Jonsson, G., Jakobsdottir, M., Bergthorsson, J., Gudmundsson, J., Aben, K., Strobbe, L., Swinkels, D., van Engelenburg, K., Henderson, B., Kolonel, L., Le Marchand, L., Millastre, E., Andres, R., Saez, B., Lambea, J., Godino, J., Polo, E., Tres, A., Picelli, S., Rantala, J., Margolin, S., Jonsson, T., Sigurdsson, H., Jonsdottir, T., Hrafnkelsson, J., Johannsson, J., Sveinsson, T., Myrdal, G., Grimsson, H., Sveinsdottir, S., Alexiusdottir, K., Saemundsdottir, J., Sigurdsson, A., Kostic, J., Gudmundsson, L., Kristjansson, K., Masson, G., Fackenthal, J., Adebamowo, C., Ogundiran, T., Olopade, O., Haiman, C., Lindblom, A., Mayordomo, J., Kiemenev, L., Gulcher, J., Rafnar, T., Thorsteinsdottir, U., Johannsson, O., Kong, A. y Stefansson, K.,. (2008). Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet* 40, 703-706.
- ✓ Stratton, M., Campbell, P. y Futreal, A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719–724.
- ✓ Strumylaite, L., Mechososina, K. y Tamasauskas, S., (2010). Environmental factors and breast cancer. *Medicin* 46, 867-73.

- ✓ Stuart, D. y Sellers, W., (2009). Linking somatic genetic alterations in cancer to therapeutics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 304–310.
- ✓ The International HapMap Consortium. 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299–1130.
- ✓ Tran, L., Zhang, B., Zhang, Z., Zhang, C., Xie, T., Lamb, J., Dai, H., Schadt, E. y Zhu, J., (2011). Inferring Causal Genomic Alterations in Breast Cancer Using Gene. *BMC Syst Biol* 1, 121.
- ✓ Van der Groep P., Van der Wall, E., y Van Diest P., (2011). Pathology of hereditary breast cancer, *Cell Oncol* 34,71–88.
- ✓ World Health Organization., (2008). *The Global Burden of Disease: 2004 Update.* Geneva: World Health Organization.
- ✓ Zheng, W., Long, J., Gao, Y., Li, C., Zheng, Y., Xiang, Y., Wen, W., Levy, S., Deming, S., Haines, J., Gu, K., Fair, A., Cai, Q., Lu, W. y Shu, X., (2009). Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1. *Nat Genet* 3, 324-328.

DIRECCIONES ELECTRÓNICAS

- <http://www.cicancer.org/inv-prog-unidiag-programa.php>
- <http://www.genecards.org/>
- <http://www.goldenhelix.com/>
- <http://www.informatik.uni-ulm.de/.html>
- <http://www.issemym.gob.mx/>