



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

ESPECIALIDAD DE ONCOLOGIA MÉDICA

Asociación del polimorfismo (5 UTR) XPA y (C8092A) ERCC1 con la respuesta patológica completa a la quimioterapia neo-adyuvante, basada en cisplatino, en pacientes con cáncer de mama operable y localmente avanzado, triple negativo.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ONCOLOGO MÉDICO

PRESENTA

DR. DAVID ORTA CORTEZ

TUTOR CLINICO:

DRA. CLAUDIA HAYDEE ARCE SALINAS

DRA. CYNTHIA MAYTÉ VILLARREAL GARZA

TUTOR DE INVESTIGACIÓN:

DR. LUIS A HERRERA MONTALVO

DRA. CLEMENTINA CASTRO HERNÁNDEZ.



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.

## **Agradecimientos:**

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, aportando información valiosa para el resultado final de la misma.

Agradezco a:

Dra. Claudia Haydee Arce Salinas confiar en mi e invitarme a trabajar en este proyecto fruto de su iniciativa propia, con el fin de innovar nuevas perspectivas de tratamiento de pacientes oncológicos

Dra Cynthia Mayté Villarreal Garza (Medico abscrito a clínica de tumores mamarios instituto nacional de cancerología) por su asesoría y apoyo durante el desarrollo de la investigación.

Agradezco al Dr. Luis Herrera Montalvo,(Director de investigación Instituto Nacional de Cancerología ) por apoyar este trabajo brindando el equipo necesario para su realización así como su asesoría y tutoría en investigación médica básica.

Agradezco a la Dra Clementina Castro Hernández (Maestra en investigación biomédica básica) por aceptar participar en este trabajo, por su enseñanza, comprensión y apoyo, así como su ardua labor y compromiso.

.

Agradezco a la Dra. Rosa María Álvarez Gómez (Médico Genetista Unidad de Genómica y Secuenciación Masiva (UGESEM) / Laboratorio de Genómica) Porque a pesar de la carga de trabajo laboral nos brindo de forma entusiasta su apoyo en la obtención de DNA de las muestras sanguíneas necesarias para este trabajo, así como por su enseñanza activa en cada procedimiento realizado.

Agradezco a El Dr Dr. Luis Fernando Oñate-Ocaña (Miembro del Comité Científico del instituto nacional de Cancerología.) por su apoyo incondicional y contribución en el análisis estadístico del presente Trabajo.

Agradezco a Julieta Santa Marina Galicia (personal de enfermería Instituto nacional de Cancerología) , Erika (pasante de servicio social) , Alejandro Hernández (laboratorio ), por trabajar en equipo con apoyo y disponibilidad durante el reclutamiento de nuestras pacientes.

Agradezco a nuestras pacientes por aceptar ingresar a este estudio, ya que pese a ser una enfermedad desgastante albergan el sentido de ayuda.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio  
de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación  
Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones  
Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología  
Bajo la Dirección del  
**Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.**

## MEMORIAS

*A Dios por permitirme estar aquí y permitirme poder ayudar a quien lo necesita.*

*A mi padre porque aunque ya no esté con nosotros su ejemplo perdurara y ha marcado mi camino en esta vida.*

*A mi madre por su apoyo incondicional y su ejemplo de lucha ante la adversidad.*

*A mis hermanos por estar juntos en todos los momentos y saber que no estamos solos.*

*A Alfredo por ser un amigo incondicional y guía en esta noble tarea.*

*A mis maestros por su apoyo y paciencia, por tomarse el tiempo y la responsabilidad de enseñar y lo que es mejor por predicar con el ejemplo.*

*A mis compañeros con quienes convivimos gran parte de nuestra vida*

*A nuestros pacientes quienes confían en nosotros y permiten que brindemos un tratamiento con el fin de sanar.*

*A todas las personas con quienes trabajamos día a día y de quienes aprendemos cosas importantes que rigen las decisiones de mañana.*

*A Dra. Arce por confiar en mí y darme una tarea compleja pero interesante e importante para mi formación.*

**GRACIAS**

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Título</b> .....	7
<b>Cáncer de mama</b> .....	8
Definición: .....	8
Epidemiología:.....	8
Factores de Riesgo: .....	8
Estadificación: .....	9
Cáncer de mama triple negativo:.....	9
<b>Tratamiento:</b> .....	10
Quimioterapia neoadyuvante en cáncer de mama: .....	10
Respuesta patológica completa:.....	10
rPC al Tratamiento neo adyuvante en cáncer de mama con un régimen sin cisplatino.....	11
rPC al Tratamiento neo adyuvante en cáncer de mama triple negativo con un régimen sin cisplatino.....	12
rPC al tratamiento neo adyuvante en cáncer de mama triple negativo con cisplatino:.....	12
<b>Cisplatino:</b> .....	13
Mecanismo de acción: .....	13
Toxicidad: .....	14
Mecanismo de Resistencia: .....	15
<b>Hipótesis</b> .....	21
<b>Objetivo General</b> .....	22
<b>Objetivos secundarios</b> .....	22
<b>METODOLOGÍA</b> .....	23
Criterios de inclusión.....	23
Criterios de exclusión.....	23
Determinación del tamaño de la muestra.....	24
Obtención de DNA .....	24
Determinación del polimorfismo de E8092C del gen de reparación ERCC 1. ....	24
.....	25
Determinación del polimorfismo 5'UTR de XPA .....	26
Resultados:.....	29
<b>ANEXO 1 (GRAFICAS)</b> .....	37
<b>GLOSARIO:</b> .....	38
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	¡Error! Marcador no definido.

## INTRODUCCIÓN

**Antecedentes:** De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), cáncer es un término genérico para más de 100 enfermedades, secundario a un escape las vías de control celular. A nivel mundial de acuerdo a Globocan 2008 el cáncer de mama tiene una incidencia de 1384 155 casos y mortalidad de 458 503 casos. Perou mediante un análisis de perfil molecular describió 5 subtipos moleculares intrínsecos, que incluyen los subtipos luminal A, luminal B, HER2, subtipo normal y subtipo basal, el estado negativo de los receptores hormonales, Her 2 Neu, caracterizan al cáncer de mama triple negativo que alberga un pronóstico más sombrío y que hasta en el 85% de los casos es basal like. La secuencia de tratamiento sistémico neoadyuvante seguido del procedimiento quirúrgico, permite incrementar la SLE y SG si se determina in vivo rCP, está definida como la ausencia de enfermedad invasiva en mama y axila, solo presencia de cáncer in situ. Esquemas de quimioterapia basados en antraciclinas y taxanos reportan rCP de 20 a 40%, regímenes basados en cisplatino de 20 a 80% el efecto citotóxico del cisplatino es resultado de la formación de aductos covalentes con el DNA, que pueden ser aductos mono y bifuncionales, impidiendo la replicación celular y llevando a apoptosis celular, sin embargo existen mecanismos de reparación del daño al DNA, NER (reparación de excisión de nucleótidos), Reparación de excisión de bases por fractura de doble cadena, y MMR por mal apareamiento de bases, la maquinaria NER, en quien el complejo heterodimerico de ERCC1 con la proteína XPA tienen un papel muy importante, y su actividad se ve comprometida por la presencia de polimorfismos al ser estudiados en otras neoplasias siendo 5 UTR y C8092A respectivamente, por lo que en el presente estudio han sido evaluados en un grupo de pacientes con cáncer de mama triple negativo que reciben tratamiento neoadyuvante y se analiza su asociación con respuesta patológica completa, toxicidad y supervivencia, así como por grupo de tratamiento (cisplatino vs no cisplatino).

**Metodología:** Se tomaron muestras sanguíneas de pacientes incluidas, mediante técnicas convencionales se extrajo el DNA, se localizo el polimorfismo 5 UTR por PCR y digestión con la enzima de restricción BspEI (New England Biolabs), se determino el genotipo silvestre (A/A) Heterocigo (A/G) Polimorfico (G/G) Se identifico el polimorfismo de 8092 del gen de reparación ERCC 1, mediante PCR y digestión con la enzima enzima MbolI (New England Biolabs) los genotipos se determinaron como silvestre(C/C),Heterócigo(C/A),Polimorfico(A/A),se creó una base de datos en sistema Excel que incluye variables clínicas como de laboratorio y patologicas, se evaluaron toxicidades al final de cada tratamiento por criterios de CTC AE V3. Se utilizo el software SPSS v20 para evaluar las asociaciones entre genotipos, alelos, respuesta patológica completa, así como toxicidad, utilizándose la prueba de chi cuadrada

**Resultados:** los resultados obtenidos, las frecuencias alelicas para el polimorfismo XPA es similar a la literatura siendo más frecuente el alelo polimórfico, en el caso de ERCC 1 se identifico una mayor frecuencia en el genotipo heterócigo, no se encontró una asociación de XPA o RCC1 por genotipo o por alelos con rCP, en cuanto a toxicidad se encontró una asociación con toxicidad hematológica del gen XPA alelo A de 97%, comparado con aquellos que no la presentaron de 79.3% y de acuerdo a grupo de tratamiento se obtuvo rCP en mama una tendencia a favor del grupo que recibe cisplatino siendo 69.2% contra un régimen distinto que fue de 35.7%, esto asociado a el tamaño de muestra

**Conclusiones:** En pacientes con cáncer de mama triple negativo el régimen de quimioterapia neoadyuvante basado en cisplatino el presente estudio se encuentra una tendencia a mayor tasa de rCP, a expensas de mayor toxicidad hematológica, si, sin embargo aun no es posible definir un factor predictivo de respuesta basados en los polimorfismos 5 UTR y 8092 de los genes de reparación XPA y ERCC1.

## **Titulo**

**Asociación del polimorfismo (5 UTR ) XPA y (C8092A) ERCC1 con la respuesta patológica completa a la quimioterapia neo-adyuvante, basada en cisplatino, en pacientes con cáncer de mama operable y localmente avanzado, triple negativo.**

## Cáncer de mama

### Definición:

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), cáncer es un término genérico para un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, secundarias a un escape las vías de control celular y que resulta en un crecimiento celular descontrolado.[1]

### Epidemiología:

A nivel mundial el cáncer es una causa común de fallecimientos por cáncer, y con mayor incidencia en países desarrollados y menor en países en vías de desarrollo, de acuerdo a los reportes de Globocan 2008 el cáncer de mama ocupa el primer lugar de incidencia con 1384 155 casos y mortalidad de 458 503 casos. [2]

En EEUU el cáncer de mama representa la segunda neoplasia, más común y segunda causa de muerte por cáncer con una tasa de incidencia de 209 600 casos y una tasa de mortalidad de 40 230 casos para en el año 2010. [3]

En México en el año 2006 el cáncer de mama se convirtió en la segunda causa de muerte entre las mujeres de 30 a 54 años y la tercera en el grupo de 30 a 59 años [4]. La tasa de mortalidad han mostrado un aumento importante en las últimas cinco décadas: entre 1955 y 1960 la tasa era de 2 a 4 defunciones por 100,000 mujeres y a partir de entonces se ha elevado de manera sostenida en las mujeres adultas de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por 100,000 para la mitad de la década de 1990, manteniéndose más o menos estable desde entonces (3).De acuerdo a lo reportado en Globocan 2008 ocupa el segundo lugar en incidencia con 13 939 casos y segundo lugar en mortalidad con 5 217 casos. [5]

### Factores de Riesgo:

Se desconoce la causa para desarrollar cáncer de mama sin embargo se han encontrado factores de riesgo dentro de los que destacan; a).-Sexo femenino, b).- edad con una incidencia acumulada de 2.7% ,5.0%, 7.7 %, a los, para las edades de 55, 60, y 75 años respectivamente, c).- Familiares de primer grado con cáncer de mama, d).- Menarca temprana se tiene evidencia que por cada año de retraso de inicio de la menstruación se reduce el riesgo de cáncer de mama un 5% [3], e).- Menopausia tardía el riesgo se incrementa un 3% por cada año que se retrasa la menopausia , f).- Embarazo a término es un factor protector independientemente del número de embarazos, siendo esto mayor cuando es en edad menor a 20 años, g).- Lactancia materna aunque su papel protector es controversial, se ha visto beneficio en mujeres jóvenes, h).- Exposición a radiación antes de los 40 años ya que 1 Gy otorga un riesgo relativo de 1.1 a 2.7 , en cuanto a la exposición a campos de radiación electromagnética a tejido mamario no es concluyente en este momento , i).-Hormonas endógenas se ha visto que mujeres posmenopáusicas con incremento en concentraciones de estradiol presentan mayor riesgo en comparación con mujeres premenopausicas aunque los datos son no concluyentes [3].- Terapia de reemplazo hormonal incrementa 25% el riesgo en usuarias actuales y disminuye posterior a 10 años de su suspensión,

k).-Enfermedad proliferativa benigna de la mama, mutación de BRCA 1, BRCA 2, PTEN (Síndrome de Cowden) P 53 (Síndrome de Li-Fraumeni), l).-Altura mayor a 10 cm de el promedio se ha encontrado asociada a un incremento del 10% razón aún no establecida actualmente [3], m).-obesidad incrementa el riesgo 50% en mujeres posmenopáusicas, pero es una asociación no observada en mujeres premenopáusicas. [4]

### **Estadificación:**

El pronóstico de cáncer de mama invasivo está fuertemente influido por el estadio de la enfermedad al diagnóstico, La clasificación TNM de los tumores utiliza la información del tamaño del tumor (T), la afección ganglionar (N), y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M) en base a estos datos se determinan cinco estadios clínicos que van de 0 a IV, siendo 0 para cáncer in situ, I-IIA en enfermedad temprana, IIB - IIIC enfermedad localmente avanzada y IV enfermedad avanzada o metastásica, con supervivencia global a 5 años que va desde 93% para estadio clínico 0 y estadio clínico IV de 15% [6]

### **Cáncer de mama triple negativo:**

De acuerdo al análisis de expresión génica de Perou describió 5 subtipos moleculares intrínsecos, que incluyen los subtipos luminal A, luminal B, HER2, subtipo normal y subtipo basal, cada uno asociado con un pronóstico y tratamiento diferente. El cáncer de mama triple negativo definido como ausencia de expresión de ER, Her 2 Neu, ha sido asociado con un pronóstico más sombrío [7,8, 10,11]. El subtipo basal es llamado así por su patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario. Este parecido es producto de la falta de expresión de ER y genes relacionados, baja expresión de HER2, intensa expresión de citoqueratinas 5, 6 y 17, y la expresión de genes relacionados con proliferación celular. Comparado con el subgrupo luminal A altamente sensible a estrógenos, el subtipo basal tiene un desenlace clínico sombrío, con una recurrencia libre de enfermedad y una supervivencia global pobres, [10,11], El NTBC y el subtipo basal comparten características patológicas, moleculares y clínicas similares por lo que frecuentemente estos términos se emplean como sinónimos, [12], Sin embargo, del 10 al 20% de los NTBC exhiben un perfil genómico tipo no-basal [13], del 15 al 40% de los tumores basales expresan ER o HER2 [10]. La distinción entre el NTBC y el subtipo basal puede tener implicaciones pronósticas y predictivas, ya que algunos estudios han sugerido que los NTBC tipo no-basal tienen un pronóstico más favorable y demuestran más sensibilidad a la quimioterapia [13,14]

De acuerdo a cohortes de pacientes en EEUU se ha encontrado que pacientes con subtipo molecular triple negativo reúnen características epidemiológicas diferentes con respecto al resto, como son; a).- Edad más jóvenes al diagnóstico, b).-Áfrico americanas (OR:3.14 IC 2.12-4.16), 4).- embarazos a término mayor a 3 sin lactancia materna (OR 1.68 IC 1.00-2.81) 5).-obesidad en caso de ser pre menopáusicas (OR 1.97 IC 1.03-3.77) (5). La prevalencia en mujeres áfrico americanas premenopáusicas es de 39% mientras que en posmenopáusicas es del 14% y mujeres no áfrico americanas de 16% sin importar la edad. (6), En EEUU una incidencia en Blancos del 10-13%, Negros del 23-30%, en Arabia Saudita 39%, China 19.3%, Taiwán 15.9%, México (de acuerdo a una base de datos de Instituto nacional de cancerología) prevalencia del 23% y de acuerdo a estadio clínico EC I: 9.2%. EC II: 20%. EC III:27.3%, EC IV:23.6% [9]

## **Tratamiento:**

El tratamiento en cáncer de mama es multimodal e incluye, Radioterapia, cirugía y terapia sistémica, como los componentes más importantes. Históricamente, Paul Ehrlich acuñó el término quimioterapia a los fármacos utilizados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, a los que denominó balas mágicas, pero no fue sino hasta 1942 cuando Gilman y Philips en la Universidad de Yale, realizaron el primer estudio clínico de mostaza nitrogenada en pacientes con linfomas (fármaco reconocido por serendipia en la segunda guerra mundial), la regresión dramática de la enfermedad fue notada en este estudio generando tremendo éxito en este nuevo campo de la medicina, esto dio paso a nuevos aportes a la medicina en el terreno oncológico,. [1]

El descubrimiento de fármacos, en las décadas pasadas ha permitido reconocer el importante rol que tiene la quimioterapia en el tratamiento del cáncer. Este conocimiento ha contribuido al desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas, tales como el tratamiento neoadyuvante (previo a tratamiento de control loco regional) Adyuvante (posterior a tratamiento de control loco regional); en el primero con el objetivo de, disminuir enfermedad micrometastásica, reducción de tamaño tumoral que permita una cirugía preservadora de tejido, y con ello preservar la función del mismo, así como evaluar la quimiosensibilidad del tumor in vivo, mientras que el tratamiento adyuvante tiene como objetivo disminuir las recurrencias posteriores a el tratamiento quirúrgico, y mejorar supervivencia global y supervivencia libre de recurrencia [15].

### **Quimioterapia neo adyuvante en cáncer de mama:**

La terapia sistémica neoadyuvante, en cáncer de mama, es aquella que se realiza previamente al tratamiento local (quirúrgico o radioterapia), en los casos de cáncer de mama localmente avanzado no inflamatorio, cáncer de mama inflamatorio y cáncer de mama operable, convirtiéndose en la única oportunidad de determinar objetivamente la respuesta al tratamiento (rPC). [16].

### **Respuesta patológica completa:**

La valoración de la rPC (respuesta patológica completa) a la quimioterapia es un tema de suma importancia en el tratamiento oncológico, proporciona información pronóstica, ya que existe una correlación entre respuesta tumoral y supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) que ha sido observada repetidamente en pacientes quienes reciben quimioterapia sistémica tanto en cáncer de mama temprano como en el localmente avanzado, y la supervivencia libre de recurrencia a 5 años puede ser tan alta como hasta del 90% cuando se alcanza rPC [17,18], Sin embargo, este aspecto ha sido controversial. La razón más importante de la controversia, es la definición de rPC, en la tabla número 1, se describen las diferentes definiciones de rPC [19].

Autor	Definición rPC
Feldman et al., 1986	Ausencia de cualquier evidencia macroscópica de tumor después de una inspección de la mastectomía y contenido axilar, independientemente de hallazgos posteriores sobre microscopia
Chevallier et al., 1993	Se define en 4 categorías, Grado 1, desaparición de todo el tumor en la evaluación macroscópica y microscópica, Grado 2, la presencia de carcinoma in situ en mama, ganglios linfáticos libres de neoplasia, Grado 3, presencia de carcinoma invasor con alteración del estroma (por ejemplo, la esclerosis o fibrosis); Grado 4 ° tumor sin cambios.
Sataloff et al., 1995	T-A: desaparición del tumor total o casi total, T-B: Reducción del tumor >50% pero menos del total, T-C:reducción de <50% del tumor, T-D:no efecto terapéutico N-A: evidencia de efecto terapéutico, N-B: sin enfermedad en ganglios linfáticos N-C: evidencia de efecto terapéutico pero metástasis en ganglios.
M. D. Anderson Cancer Center (Sahin, 2005 Schnitt and Connolly, 1992 )	Sin evidencia de enfermedad invasiva en mama o en axial.

Tabla número 1.

Un estudio retrospectivo publicado por Von Minckwitz G , con el objetivo de definir respuesta patológica completa y el impacto del resultado en la supervivencia de 6377 pacientes que reciben tratamiento neo adyuvante de los estudios GeparDuo, GeparTRio, GeparQuattro , AGO1, PREPARE, TECHNO , encontró mayor beneficio en SG y SLE cuando se adopto la definición de rPC como ausencia de cáncer invasor e in situ en mama y axila [20].

En nuestro estudio adoptamos la definición propuesta por MD Anderson cáncer center( Sahin 2005).que define respuesta patológica completa a la ausencia de enfermedad invasiva en mama y axila y presencia de cáncer in situ.

### **rPC al Tratamiento neo adyuvante en cáncer de mama con un régimen sin cisplatino.**

El estudio NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) B-18 evaluó la combinación de Adriamicina y ciclofosfamida Neoadyuvante administrada en 4 ciclos (n: 763), comparación con el mismo régimen administrado de forma adyuvante (n: 1760), en pacientes con Cáncer de mama T1c-T3, N1, M0. El estudio demostró la seguridad del tratamiento neoayuvante, que facilitó la realización de una mayor proporción de cirugías conservadoras de mama (68% contra 60%) sin compromiso de su supervivencia, además se encontró 36% de respuestas clínicas completas y 13% de respuestas patológicas completas que incluyo un 4% con enfermedad residual in situ, siendo esta última predictiva de SLE a 5 años siendo para rPC 85.7%, parcial Parcial: 68% y Sin respuesta: 63%.[21]

El estudio fase III, NSABP B-27 evaluó respuesta patológica completa, SG y SLE en 2411 pacientes con cáncer de mama operable, un grupo recibe Adriamicina/Ciclofosfamida (4 ciclos) seguida de docetaxel (4 ciclos) comparada a un segundo grupo quien recibe solo Adriamicina/ciclofosfamida, ambos seguidos de cirugía, mejoría en respuesta patológica completa en el grupo con tres fármacos administrados de forma secuencial 26.1 % vs 13.7%. [21]

### **rPC al Tratamiento neoadyuvante en cáncer de mama triple negativo con un régimen sin cisplatino.**

En la siguiente tabla se muestran los estudios y resultado de los mismos en base a respuesta patológica completa (rPC) [22,23]

<b>Estudio</b>	<b>Fase</b>	<b>tratamiento</b>	<b>Regimen</b>	<b>pCR %</b>
Cornelia Liedtke*	II (n=163)	Neoadyuvante TNBC	FAC /FEC/ AC. TFAC/TFEC Taxol (solo) Otro	pCR=20% pCR=28% pCR=12% pCR=14%
Gerber et al*	III	Neoadyuvante	a).-EC-D b).-EC+Bev-D+Bev	a).- pCR=28% b).pCR=36.4%

D:Docetaxel,A:adriamicina,C:ciclofosfamida, F:5 FU, E:Epirubicina, Bev:Bevacizumab,T:Paclitaxel.

### **rPC al tratamiento neo adyuvante en cáncer de mama triple negativo con cisplatino:**

El cáncer de mama triple negativo, alberga un pronóstico sombrío cuando se compara con otros subtipos de cáncer de mama, por lo que se han realizado estudios in vitro evaluando el efecto de cisplatino en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo CRL2335 and MDA-MB-468, encontrado muerte celular en un 70% comparado con líneas celulares de cáncer de mama no triple negativo CRL8799 con muerte celular de 10-15%, esto apoya el beneficio de cisplatino con respecto a otros regímenes para esta subtipo de cáncer de mama. [24].

Existen estudios fase II, que han evaluado el uso de quimioterapia neoadyuvante basada en agentes platinados en pacientes con cáncer de mama triple negativo en etapas operables y localmente avanzadas con una tase de respuesta de rPC oscila desde un 20% hasta 80% .[24,25,26,27,28]

Estudio	Fase		Tratamiento neoadyuvante	pCR %
Gronwald *	II (N =25)	NTCB BRCA1	Cisplatino 75mg/m <sup>2</sup> sc c/21d 4 ciclos	pCR = 72%
Sikov (2009) **	II (n=12)	NTCB	Paclitaxel 80mg/m <sup>2</sup> c/semana x 16semanas, CBP AUC 6 c/21d x 4 ciclos.	pCR=67%
B.Sirohi,M.Arnedos****	II (n=17)	NTCB	5 FU 200mg/m <sup>2</sup> IC día, Epirubicina 60mg/m <sup>2</sup> c/3Semanas Cisplatino 60mg/m <sup>2</sup> . C/3 semanas	pCR=88%
Daniel P.*****	II (n=29)	NTCB	Cisplatino 75mg/m <sup>2</sup> sc c/21d 4 ciclos	pCR=21%
Byrsky et al*****	II	NTCB	Cisplatino 75mg/m <sup>2</sup> sc c/21d 4 ciclos	pCR=83%

### Cisplatino:

El Cisplatino ( cis-diamino-dicloroplatino ) agente alquilante quimioterapéutico que se conoce desde 1845 descubierto por Rosemberg y colegas al observar el dramático efecto inhibitorio de platino en la replicación celular de *Escherichia coli* , pero no fue hasta 1970 que se estableció su actividad antitumoral [29,30] se han realizado una gama de estudios preclínicos y clínicos con resultados favorables por lo que la FDA aprobó su uso en cáncer de testículo y posteriormente fue aprobada la indicación para el tratamiento de distintas neoplasias, principalmente cáncer epitelial de ovario, cervicouterino , cabeza y cuello, pulmón, entre otros [31].

### Mecanismo de acción:

El cisplatino ingresa a la célula por difusión pasiva, aunque existen evidencias de que la captación puede en parte, ocurrir por un mecanismo de transporte activo [29]. Una vez en el citosol es activado al intercambiar uno o ambos iones cloro (grupo saliente) por moléculas de agua [32,33], lo que lo convierte en una molécula con carga positiva, capaz de interactuar con moléculas biológicas dentro de la célula, incluyendo DNA, RNA, fosfolípidos de membrana, microfilamentos que forman parte del citoesqueleto y otras proteínas [29].

El efecto citotóxico del cisplatino es resultado de la formación de aductos con el DNA, los cuales pueden ser aductos mono y bifuncionales [32,34,35], Reaccionan preferencialmente con los átomos de nitrógeno en la posición N7 de la guanina y en menor grado de la adenina de tal forma que aproximadamente 60%-65% corresponden a N7G-N7G (GG), 25%-30% a N7A-N7G (AG), y 5%-10% a N7GX- N7G, aunque también puede formar uniones intercatenarias entre guaninas localizadas en hebras opuestas del DNA siendo estas uniones 2-3% de los aductos formados entre el cisplatino y el DNA [38,39,40].

Los aductos bifuncionales pueden formar uniones inter- e intracatenarias, lo que provoca distorsiones en la estructura del DNA, comprometiendo el doblamiento y desenrollamiento de la doble hélice. Las uniones intracatenarias son los productos más abundantes de la interacción: 1,2-d (GpG) (corresponden al 60-65% de todos los aductos) y 1,2-d (ApG) (20-25%). También puede formar uniones intercatenarias entre guaninas localizadas en hebras opuestas del DNA siendo estas uniones 2-3% de los aductos formados entre el cisplatino y el DNA [33,37].

Estos aductos contribuyen al efecto citotóxico del fármaco debido al impedimento que esto ocasiona en los procesos celulares que requieren de la separación de las dos hebras de DNA, como es el caso de la replicación y la transcripción [32]. El resultado final muerte celular por apoptosis.

Otro de los mecanismos del cisplatino que contribuyen es el mediado por la familia de proteínas HMG1 y HMG2 quienes debido a su alta afinidad por este, se unen a los aductos intracatenarios 1,2-d(GpG), y bloquean el reconocimiento de daño de las enzimas de reparación, permitiendo el bloqueo de transcripción y replicación apoptosis.[14,20]

### **Toxicidad:**

La mayor parte del cisplatino es eliminado por unión covalente a macromoléculas una fracción del mismo fármaco es filtrada en el glomérulo e interactúa en los túbulos renales contorneados proximal y distal con mayor efecto en este último, que conlleva a desequilibrio electrolítico y deterioro de la función renal, además de toxicidad gastrointestinal caracterizada por náusea y vómito (>90% riesgo de emesis), Neurotoxicidad sensorial o motora, con repercusiones auditivas, visuales, y neuritis retrobulbar, Mielosupresión caracterizada por neutropenia, anemia, Trombocitopenia. Hipersensibilidad aguda incluye anafilaxis inducida por IGE, manifestada como edema facial, broncoespasmo, taquicardia, hipotensión [1], Actualmente se han adoptado criterios de términos comunes para evaluar toxicidad de distintos agentes quimioterapéuticos, uno de ellos es el publicado en 2006 CTC AE V3. Que incluye criterios afines a toxicidad de cisplatino y categorizados numéricamente de acuerdo a gravedad del evento (ver Anexo 1).

El Cisplatino se asocia a los siguientes porcentajes de toxicidad:

<b>TOXICIDAD</b>	<b>GRADO 1-2-3.</b>
<b>Leucopenia</b>	25-30%
<b>Neutropenia</b>	25-30%
<b>Trombocitopenia</b>	10%
<b>Anemia</b>	10%
<b>Reacción Alérgica</b>	10-15%
<b>Vómito</b>	>90%
<b>Náusea</b>	>90%
<b>Neuropatía sensorial</b>	10%
<b>Neuropatía Motora</b>	10%
<b>Ototoxicidad</b>	10-30%
<b>Insuficiencia renal</b>	10%
<b>Hipomagnesemia</b>	1%
<b>Hipokalemia</b>	1%

### **Mecanismos de reparación del daño al DNA:**

En 1980 Philip Courtland Hanawalt fue uno de los primeros en dar a conocer mecanismos de reparación del daño al DNA inducido por radiación ultravioleta en fibroblastos humanos. [42]

Ahora sabemos Existen mecanismos que reparan el daño al DNA, el primero NER (reparación de excisión de nucleótidos), el segundo Reparación de excisión de bases (BER), el segundo, el tercero Reparación por mal apareamiento de bases (MMR), todos ellos actuando de forma equilibrada, de forma que en ausencia de uno lo sustituye otro [39].

Respuesta de la célula al DNA dañado mediante la vía NER [38] una de las principales vías que mantiene la integridad del DNA, es un proceso complejo de múltiples pasos que incluye más de 20 proteínas, un defecto en cualquiera de ellas confiere defectos en la reparación del DNA, un ejemplo de ello se observa en enfermedad denominada Xeroderma pigmentoso y en el síndrome de Cockayne, [40].

Reparación por excisión de bases, en respuesta a exposición de humo de tabaco, oxidantes químicos o radiación ionizante, que ocasionan un daño a las bases en la cadena de DNA.

MMR consiste en la eliminación de nucleótidos por mal apareamiento de bases que resultan de errores de la replicación de DNA, echando mano del heterodímero MSH que interaccionara con PMS, MSH1/MSH6.[39].

**Mecanismo de vía NER:**

El mecanismo de la vía NER en la que participa el gen de reparación ERCC1 [44] es formando un complejo heterodimerico con la proteína XPA , esencial para remover aductos de la cadena de DNA, producidos por cisplatino, que localiza el daño al DNA (propiedad universal de los organismos vivientes ) [45], puede no tener una actividad catalítica pero actúa como un sitio de unión o anclaje al DNA dañado , en el que las proteínas con actividad catalítica se reúnen, como RPA una proteína de unión a una o doble cadena de DNA compuesta por tres subunidades de 70,32 y 14 kilodaltons [46] y otras proteínas codificadas por XPE y XPC aunque su papel de estas últimas es poco claro. (Ver Figura b) [47].RPA define el área de excisión de nucleótidos, y en conjunto con XPA forma un complejo que recluta a el factor de transcripción TFIIH un complejo formado por nueve subunidades proteicas [46], que recluta dos helicasas XPB y XPD , las cuales actúan en direcciones opuestas relajando la cadena de DNA distales a la región dañada, este reclutamiento parece estar mediado por HHR23B un complejo de dos proteínas XPC-HHR23B. (Ver figura c)

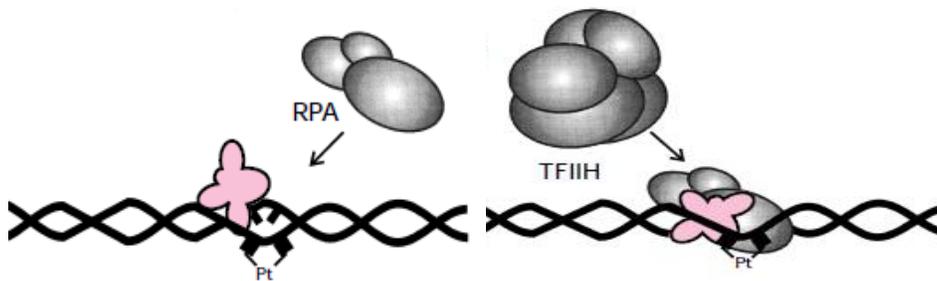
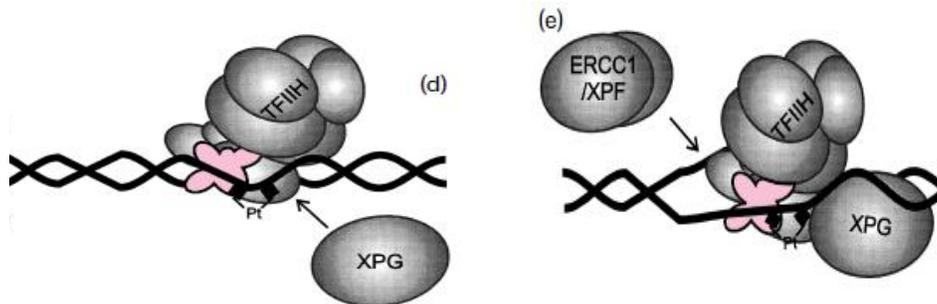


Figura b

Figura c

La nucleasa XPG se une a la proteína RPA y se posiciona en extremo 3' del dímero, cortando el DNA que tiene el daño (figura d).

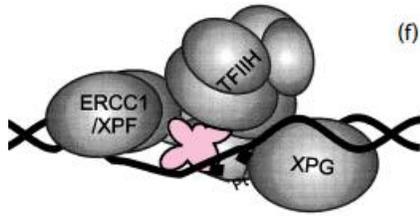
La nucleasa 5' es una proteína multimerica que contiene a las proteínas ERCC1 y XPF, ambas reclutadas durante el reconocimiento del daño en el DNA , cuya función es escindir, una o las dos cadenas de DNA dañado, en el extremo 5'. (Ver figura e)



(Figura d)

(Figura e)

El oligonucleótido de 30 nucleótidos el cual contiene el sitio dañado y que se encuentra unido a algunos de las moléculas de excisión es desplazado, dejando un espacio en la cadena de DNA en donde aún se encuentra XPA. (Ver figura f y e).



(Figura f)



(Figura e)

El espacio de DNA vacío es restablecido por la acción combinada de DNA polimerasa y sus cofactores, PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular) y FRC (Factor de replicación C), siendo finalizada con el cierre del espacio en la cadena de DNA, y es así como el daño al DNA ha sido reparado.

(Ver Figura g).

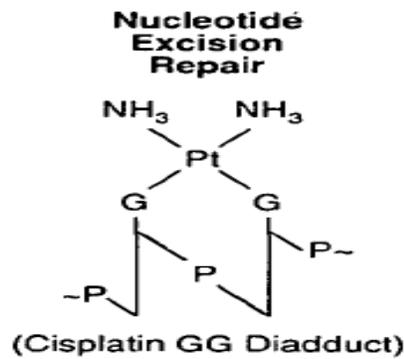
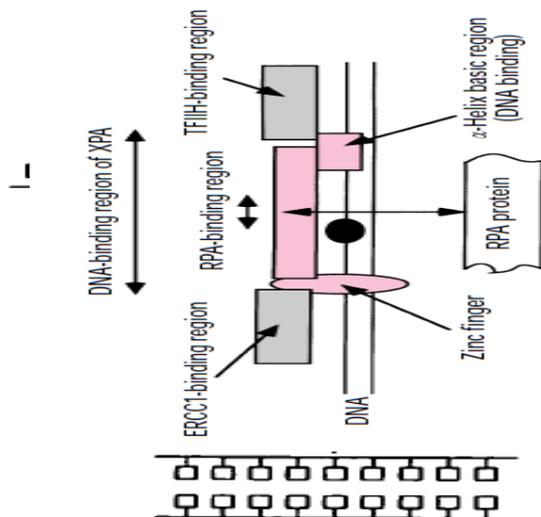


Figura g: En la reparación por escisión de nucleótidos, mediante ATP dependiente de la actividad enzimática que resulta de la acción coordinada de seis factores, inciden en el sexto enlace fosfodiéster 3' y el 22avo enlace fosfodiéster 5' de la lesión (sea monoadducto o biadducto) y así escinde el daño de un oligómero de 29 nucleótidos de longitud, el espacio resultante se llena por la DNA polimerasa delta o epsilon y se cierra por la DNA ligasa [48]



### **Mecanismo de Resistencia a cisplatino:**

La resistencia a cisplatino es multifactorial , algunas vías de reparación pueden no estar constitutivamente activas, y activarse en respuesta a daño al DNA , su actividad variara de acuerdo a cada tejido, y del predominio de alguna vía sobre otra, y en este caso confiriendo resistencia al tratamiento con cisplatino a través de la vía NER [39] lo que algunos han denominado resistencia intrínseca y adquirida , y explica porque algunos tejidos son inherentemente resistentes al cisplatino y no responden al tratamiento, y en otros casos, pueden responder inicialmente, pero pueden adquirir resistencia al fármaco [43].

Existen genes de reparación que corrigen el daño al DNA por cisplatino en la vía NER a través de expresión de proteínas como por ejemplo XPA, y ERCC1, encontradas en tejidos con una alta replicación celular, esto sugiere que juegan un rol importante en la vía NER, sin embargo el papel de estos genes entre individuos puede depender de polimorfismos, que confieren una capacidad de reparación disminuida y esto podría resultar en una mayor respuesta a quimioterapia con cisplatino. [44]

### **Papel de XPA y ERCC1:**

Como podemos observar existen proteínas que juegan un papel fundamental en la vía de reparación NER como lo es XPA y ERCC1, la primera de ellas resultado de la transcripción del gen reparación XPA localizado en el cromosoma 9q 34.1. En estudios previos se ha observado que el estado heterocigoto de este gen se asocia a niveles completamente normales de la proteína XPA siendo suficiente para llevar a cabo reparaciones del daño al DNA y niveles bajos se asocian a una pobre capacidad de reparación, si analizamos estos resultados y tratamos de replicarlos , en un escenario clínico tomando en cuenta un grupo de pacientes con diagnóstico de síndrome de Cockayne quienes se caracterizan por tener síntomas neurológicos secundarios a la deficiencia en reparación del daño a DNA , observamos que la presencia de síntomas tempranos se asociaría a una deficiencia de reparación completa y síntomas tardíos (inicio en la vida adulta ) son asociados a una reparación parcial, y una explicación a esto es que existen mutaciones específicas en algunos exones las cuales pueden jugar algún papel, hasta ahora las reportadas se encuentran en exón VI, que pueden ser deleciones específicas o reversiones.

Por otra parte existe un contraste con el aparente exceso de la proteína, asociada a la extremadamente baja tasa de transcripción del gen y la pobre capacidad de reparación del DNA dañado, el mecanismo pudiera ser la presencia de *polimorfismos* que condicionan la capacidad de reparación. [46] Se ha reportado el polimorfismo 5 UTR el cual pareciera tener un significado incierto, aun con los aportes que tenemos de su papel de mal pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer de ovario que reciben tratamiento con cisplatino en estado heterocigoto, con respecto a el tipo silvestre, además se ha realizado estudios de este mismo polimorfismo en pacientes con cáncer de testículo en Hospital Instituto Nacional de Cancerología de la ciudad de

México , que reciben tratamiento quimioterapéutico basado en cisplatino evidenciando que existe un menor porcentaje de pacientes con SVG a 5 años con el genotipo homócigo polimórfico (G/G).

La proteína derivada del gen de reparación ERCC1 de 33 kilodaltons, la cual forma un heterodimero con la proteína XPA, siendo la primera en el reconocimiento y excisión de aductos en la cadena de DNA, ERCC1 esta aun en proceso de intensa investigación sin embargo parece ser que ERCC1 es regulado por muchos factores uno de ellos es la presencia de *polimorfismos*, encontrados en exón IV en 50% de los tejidos que se han examinado, que codifica para un mismo aminoácido dentro de la proteína, el codón polimórfico tiene una tasa de presentación de 50% que el codón tipo silvestre, y la pregunta obligada es que influencia puede tener este polimorfismo en la regulación del gen de reparación ERCC1.[46].

Diferencias en respuesta a agentes quimioterapéuticos en pacientes con cáncer es algo común, y por un lado es debida a factores extrínsecos como lo son; raza, edad, peso, talla, estado de función renal o hepática, pero por otro también existe una variabilidad genética que se presenta hasta en 95% de los pacientes, la cual es observada en genes que codifican enzimas para el metabolismo de los fármacos, que se caracteriza por la presencia de polimorfismos, en algunos casos asociados a supervivencia.[49] ya que pueden alterar las propiedades de reparación de DNA de acuerdo a observaciones individuales de la literatura existente respecto al tema [50] es aquí donde tenemos evidencia del papel que desempeñan los polimorfismos de algunos genes en este caso de metabolismo de cisplatino en su respuesta a el tratamiento.

De acuerdo a lo reportado en estudios previos y la evidencia de polimorfismos y cáncer SNC y distintas neoplasia, en cáncer de mama se ha investigado la presencia de estos y su asociación con respuesta al tratamiento en el terreno metastásico, se analizaron los polimorfismos de genes de reparación, XRCC1 (cambio de los aminoácidos Arginina por glutamina en codón 399) ,asociado a incremento en la resistencia al tratamiento con agentes alquilantes, XRCC3 (intercambio de treonina por metionina, en el codón 241 ) asociado a incremento en la resistencia al tratamiento con cisplatino y melfalan, polimorfismo A870G, del gen de reparación CCND1 asociado a progresión de la neoplasia, en base a supervivencia libre de progresión y supervivencia específica de pacientes que reciben tratamiento con quimioterapia de altas dosis basada en distintos agentes alquilantes, taxanos y agentes platinados, obteniéndose como resultado que cada uno de ellos puede ser predictivo de supervivencia libre de recurrencia así como específica de cáncer de mama. [51]

Además se ha buscado el papel que desempeña el polimorfismo C8092A de ERCC1 en cuanto a toxicidad, en pacientes con cáncer de pulmón que reciben tratamiento con cisplatino encontrándose una asociación del polimorfismo C8092A con toxicidad gastrointestinal . (p: 0.03) [51].

La rPC resultado de quimioterapia basada en un régimen de cisplatino en pacientes con cáncer de mama triple negativo presenta una correlación directa con SLE y SG, a 5 años [17,18], Sin embargo, no existen factores predictivos de respuesta a este tratamiento, por lo que la identificación de polimorfismos genéticos y su asociación con rPC es un tema de investigación que se plantea en este trabajo.

### **Hipótesis**

Las pacientes con cáncer de mama triple negativo tratadas con cisplatino, logran mas respuestas patológicas completas cuando presentan los polimorfismos de los genes de reparación ( 5 UTR ) XPA y ( C1896A ) ERCC1.

### **Objetivo General**

Determinar la asociación del polimorfismo de los genes de reparación XPA y ERCC1 con respuesta patológica completa en pacientes con cáncer de mama triple negativo, operable o localmente avanzado, tratadas con quimioterapia neo adyuvante basada un esquema de quimioterapia

### **Objetivos secundarios**

Determinar la prevalencia del polimorfismo de los genes de reparación XPA y ERCC1.

Describir la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con sus genotipos.

Correlacionar la toxicidad con la presencia de los polimorfismos de los genes XPA y ERCC1 de las pacientes que reciben tratamiento con esquemas con o sin cisplatino.

Evaluar la correlación de respuesta patológica completa de acuerdo con el grupo de tratamiento con cisplatino y sin cisplatino.

## **METODOLOGÍA**

Es un estudio clínico descriptivo, ambielectivo que evalúa la asociación entre el polimorfismos 5 UTR y C8092A de los genes de reparación XPA y ERCC1 , y la respuesta patológica con quimioterapia neoadyuvante, basada en cisplatino en pacientes con cáncer de mama triple negativo, en etapas clínicas operables y localmente avanzadas, tratadas en el servicio de tumores mamarios del Instituto Nacional de Cancerología.

### **Criterios de inclusión**

Mujeres mexicanas mayores de 18 años y menores de 70 años.

Diagnóstico histológico de cáncer de mama invasivo, con determinación de receptores estrógenos y progesterona negativos

Sin sobre-expresión o amplificación de HER2.

Acepten participar en el estudio.

### **Criterios de exclusión**

Pacientes que reciban quimioterapia en escenario paliativo.

### **Determinación del tamaño de la muestra.**

Se incluyeron a 40 pacientes el cálculo se baso en una estimación de proporción de respuesta patológica del 80% con quimioterapia basada en cisplatino en pacientes cáncer de mama triple negativo, nos arroja un total de 27 (poder del 80%) y alfa 0.05.

Una estimación de respuestas patológicas completas del 30% en pacientes portadoras de polimorfismo de ERCC1 y/o XPA, nos arroja 27 pacientes, con el mismo poder y significancia.

### **Obtención de DNA**

Se aisló DNA de leucocitos por métodos estándares (fenol cloroformo) a partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica.

### **Amplificación del polimorfismo de C8092A del gen de reparación ERCC 1.**

En el DNA aislado de las muestras de sangre periférica, se identificó el polimorfismo 8092 C>A del gen ERCC 1.

Mediante PCR se amplificó un fragmento de 255pb con los siguientes primers:

Sentido: 5' TAG TTC CTC AGT TTC CCG 3'

Antisentido: 5' TGA GCC AAT TCA GCC ACT 3'

Para la PCR se utilizaron los siguientes componentes y volúmenes para cada reacción:

<b>Componente PCR</b>	<b>Volumen/Reacción</b>
Buffer 10x	1.0 µL
DNTP's(0.8mM)	0.2 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 (2mM)	1.5 µL
Sentido (0.5 µM)	0.2 µL
TDNA(50-100ng)	1.0 µL
Platinum Taq polimerasa (InvitrogenCat.10966-030)	0.25 µL
H <sub>2</sub> O	7.0 µL
Volumen total	10.0 µL

Los ciclos de PCR se llevaron a cabo como se muestra a continuación:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización	2 min	94°C
	Desnaturalización	30 seg	94°C
35	Alineamiento	30 seg	52°C
	Extensión	30 seg	72°C
1	Extensión final	5 min	72°C

El producto de PCR de cada muestra de DNA se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%, utilizando buffer TBE 0.5x y tinción con bromuro de etidio. El fragmento que se obtuvo para ERCC 1 fue de 255pb.

### **Identificación de los genotipos**

Para identificar los genotipos de las pacientes se realizará la técnica de RFLP al producto de PCR, bajo las siguientes condiciones:

Mediante la enzima Mbo II (New England Biolabs), que reconoce el sitio 5'GAAGA (N) 3'. Las condiciones para la restricción del fragmento fueron las siguientes: 2µl de producto de PCR, 1µl de buffer NEB 10x y 0.25U de enzima en 10µl de reacción, incubando a 37°C por un periodo de 16 horas. El cambio de una C por una A genera un nuevo sitio de corte para la enzima, en el genotipo homocigoto silvestre (CC) hay dos sitios de restricción generando 3 fragmentos de 158pb, 91pb y 6pb y en el homocigoto polimórfico (AA) se genera un sitio extra en el fragmento de 158pb resultando dos fragmentos de 117pb y 41pb y en el heterocigoto se obtuvieron todos los fragmentos de 117pb , 41pb , 158pb, 91pb y 6pb. (Fig. 1).

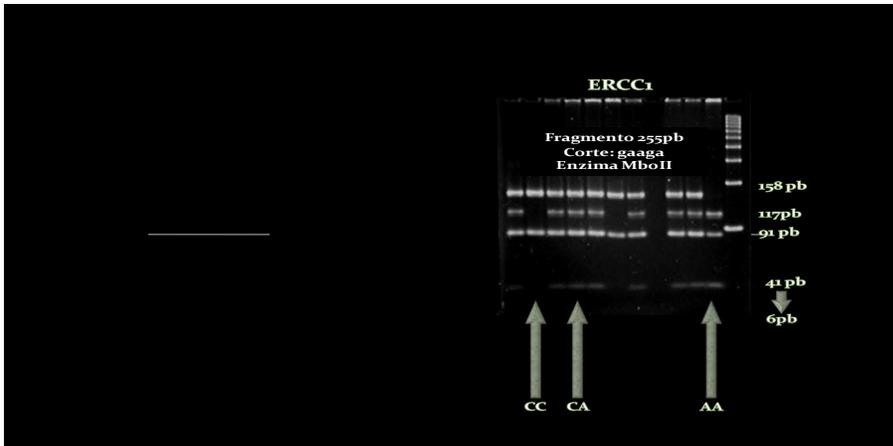


Figura 1. ERCC 1 corresponde a la digestión de un fragmento de 255pb, en el homocigoto mutante (AA) se genera un sitio adicional que origina 2 fragmentos de 117 y 41pb en lugar de un solo fragmento de 158pb como en el homocigoto normal (CC). Los individuos heterocigotos presentan los fragmentos de los dos homocigotos.

#### Determinación del polimorfismo 5'UTR de XPA mediante PCR

Para la amplificación del fragmento de XPA se utilizaron los siguientes 'primers':

Sentido (Forward): 5'-CTA GGT CCT CGG AGT GGT CC-3'

Antisentido (Reverse): 5'-GCC CAA ACC TCC AGT AGC C-3'

Para la reacción de PCR se utilizaron aproximadamente 50 ng de DNA y la siguiente concentración y volumen de reactivos:

Componente PCR	Volumen /Reacción
Buffer 10x (invitrogen)	2.5 $\mu$ L
MgCl(2Mm)	1 $\mu$ L
Primer sentido(0.5microM)	0.5 $\mu$ L
Primer Antisentido(0.5micrM)	0.5 $\mu$ L
dNTPs (0.8 nM)	2 $\mu$ L
Platinum Taq polimerasa (Invitrogen Cat 10966.030)	0.25 $\mu$ L
Muestras de DNA (50-100ng)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O MQ esteril	17.25 $\mu$ L
Volumen final	25 $\mu$ L

Esta reacción se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp. PCR Systems 9700, Applied Biosystems con las siguientes condiciones:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización	2 min	94°C
40	Desnaturalización	30 seg	94°C
	Alineamiento	30 seg	62°C
	Extensión	30 seg	72°C
1	Extensión final	5 min	72°C

El fragmento de DNA, producto de la PCR, tiene una longitud de 204 pb; los fragmentos de cada una de las muestras fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando buffer TBE 0.5X y posteriormente teñidos con BrEt.

#### **Genotipificación del polimorfismo 5'UTR de XPA**

La identificación del polimorfismo, se llevó a cabo mediante RFLP's, (por sus siglas en ingles) análisis de polimorfismo del tamaño de fragmento, para ello se utilizó la enzima de restricción BspEI (New England Biolabs) la cual reconoce el sitio TCCGGA, que se genera en el gen XPA por la transición de Adenina a Guanina (A-G) en la región no codificante 5'.

5' '....TCCGGA....3

3' ....AGGCCT...5

Las condiciones para la digestión del producto de PCR fueron las siguientes:

Reactivo	Volumen
Producto de PCR	4 µL
Buffer NEB2 (New England Biolabs)	1 µL
Enzima BspEI (3 U)	0.3 µL
H2O	4.27 µL
Volumen total	10 µL

La reacción de digestión se incubo 16 h a una temperatura de 37°C para posteriormente ser analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 3% utilizando buffer TBE 0.5X y tinción

con BrEt. Se obtuvieron dos fragmentos de 185 y 19 pb (GG) para el genotipo polimorfo; en el caso de presentar el genotipo heterocigo (AG) se obtuvieron tres fragmentos de 204, 185 y 19 pb; y para el genotipo homocigo, para el genotipo homocigo silvestre se obtuvo solamente un fragmento de 204 pb, ya que no se genero el sitio de restriccion.

Una vez con estos resultados se creó una base de datos en sistema Excel que incluyo de cada paciente, variables clinicas y patologicas, como de laboratorio, dentro de las primeras se incluyeron estadio clinico, tamaño de tumor en cm al inicio y al final del tratamiento neo adyuvante, se registro toxicidad a la quimioterapia al final de cada ciclo, con los criterios de CTC AE V3, la respuesta al tratamiento fue evaluada de forma clinica al final del tratamiento. Todas las pacientes fueron sometidas a cirugía al completar el esquema de quimioterapia. La respuesta patológica fue analizada en la pieza quirúrgica.

Se utilizo el software SPSS v20 para evaluar las asociaciones entre genotipos, alelos, respuesta patológica completa, así como toxicidad se utilizo la prueba de chi cuadrada, y la comparación entre grupos se realizo con la prueba de log-rank.

## Resultados:

En el presente estudio se incluyeron 67 pacientes con Diagnóstico Cáncer de mama triple negativo atendidas en servicio de tumores mamarios del Instituto Nacional de Cancerología, que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en dos esquema de quimioterapia, el primero incluyó 39 pacientes que reciben un esquema que se basa en cisplatino y antraciclinas, el segundo incluyó 28 pacientes que recibieron un esquema basado en taxanos y antraciclinas.

Las características de los dos grupos de tratamiento se muestran en la tabla 1, observando que de acuerdo a peso, talla, tipo histológico, Etapa clínica, lado del Ca de mama, Grado no se encontró alguna diferencia estadísticamente significativa, mientras para Ki 67: >14% entre el grupo que recibe tratamiento con un esquema basado en platino contra el esquema sin platino si fue significativa (p: 0.015), sin embargo solo se obtuvieron los reportes en 50% de las pacientes, el tipo histológico predominante fue ductal, en ambos grupos, el porcentaje mayor de pacientes el grupo con cisplatino se reportan T3 mientras que en el grupo sin este régimen es T2, (p:0.917), SBR fue homogéneo entre los dos grupos de pacientes. Ver tabla 1.

VARIABLE	TRATAMIENTO SI CISPLATINO N		TRATAMIENTO NO CISPLATINO n		p:
Tratamiento	39	58.2%	28	41.8%	p:0.000
Talla	1.51m		1.54m		p: 0.433
Histología					
Ca ductal	36	58.2%	27	41.8%	p: 0.836
Ca lobulillar	2		1		
Ca Mixto	1		0		
Ki67					
No reportado	21	53.8%	23	82.1%	p: 0.015
>14%	18	46.2 %	5	17.9%	
Etapa Clínica					
IIA	2	5.1%	1	3.6%	p: 0.917
IIB	10	25.6%	5	17.9%	
IIIA	16	41.0%	14	50%	
IIIB	9	23.1%	6	21.4%	
IIIC	2	23.1%	2	7.1%	
Tamaño					
T1	1	2.6	0	0.0%	p: 0.463
T2	9	23.1%	11	39.3%	
T3	18	46.2%	9	32.1%	
T4a	3	7.7%	2	7.1%	
T4b	4	10.3%	5	17.9%	
T4c	0	0.0%	0	0.0%	
T4d	4	10.3%	1	3.6%	
N					
N0	5	12.8%	2	7.1%	
N1	16	41.0%	8	28.6%	
N2a	16	41.0%	16	57.1%	
N2b	0	0.0%	1	3.6%	
N3c	2	5.1%	1	3.6%	
SBR					

Grado 1	1	2.6%	1	3.6%	p: 0.794
Grado 2	3	7.7%	4	14.3%	
Grado 3	33	84.6%	21	75.0%	
NO reportado	2	5.1%	2	7.1%	
<b>Tabla 1</b>					

En cuanto al tamaño en cm se encontró un mayor porcentaje en aquellos tumores de 6 cm en el esquema de tratamiento con cisplatino y de 4 cm en el esquema sin cisplatino (p:0.029)

Tamaño cm	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
	n	%	n	%	
1	1	2.6%	0	0.0%	0.029
2	1	2.6%	1	1.5%	
3	0	0.0%	2	7.1%	
4	3	7.7%	<b>8</b>	<b>28.6%</b>	
5	6	15.4%	3	10.7%	
<b>6</b>	<b>8</b>	<b>20.5%</b>	2	7.1%	
7	7	17.9%	2	7.1%	
8	2	5.1%	1	3.6%	
9	1	2.6%	3	10.7%	
>10	4	10.3%	0	0.0%	
12	0	0.0%	1	3.6%	
15	2	5.1%	0	0.0%	
18	2	5.1%	0	0.0%	
20	0	0.0%	2	7.1%	
<b>Tabla 2</b>					

Se determino el polimorfismo 5 UTR Y 8092 de XPA y RCC1 en ambos grupos de pacientes observándose la distribución en cada grupo en tabla 3. en el polimorfismo ERCC 1 se determino como silvestre(C/C),Heterócigo(C/A),Polimorfico(A/A) Reportándose frecuencias de presentación por grupo de tratamiento con cisplatino: Silvestre: 28.2% heterócigo: 50% , polimórfico: 15.4%,Alelo C:84.6% , Alelo A 69.2% : En el grupo que recibe el régimen sin cisplatino: Silvestre: 39.9% heterócigo: 50% , polimórfico: 10.7%, Alelo C: 89.3% Alelo A: 60.7%. En el Polimorfismo XPA, en base a los estados silvestre (A/A) Heterocigo (A/G) Polimorfico (G/G) Reportándose frecuencias de presentación por grupo de tratamiento con cisplatino: Silvestre: 7.7%% heterócigo: 48.7% , polimórfico: 43.3%,Alelo A: 56.4%% , Alelo G 92.3% A: En el grupo que recibe el régimen sin cisplatino: Silvestre: 14.3% heterócigo: 42.9% , polimórfico: 42.9%, Alelo G: 92.3% Alelo A: 57.1%.

	TRATAMIENTO SI CISPLATINO N		TRATAMIENTO NO CISPLATINO n		p:
XPA					p : 0.670
A/A	3	7.7%	4	14.3%	
A/G	19	48.7%	12	42.9%	
G/G	17	43.6%	12	42.9%	
ERCC1					p: 0.608
C/C	11	28.2%	11	39.3%	
C/A	22	50.0%	14	50.0%	

A/A	6	15.4%	3	10.7%	
XPA Alelo A					
A/Ay A/G	22	56.4%	16	57.1%	0.576
G/G	17	43.6%	12	42.9%	
XPA alelo G					p:0.44
AA	3	7.7%	4	14.3%	
A/G,G/G	36	92.3%	24	85.7%	
ERCC1 Alelo C					
C/C y C/A	33	84.6%	25	89.3%	p:0.431
A/A	6	15.4%	3	10.7%	
ERCC1 Alelo A					
C/A, AA	27	69.2%	17	60.7%	0.321
C/C	12	30.8%	11	39.3%	

*Tabla 3*

En cuanto a toxicidad por grupo de tratamiento al análisis global no se observa diferencia estadística, sin embargo cuando se evalúa grado 3 por grupo de tratamiento fue mayor en el grupo de pacientes tratadas con cisplatino, con respecto al grupo de pacientes que reciben esquema de quimioterapia neo adyuvante sin cisplatino con significancia estadística. (p:0.049). (ver tabla 3)

Toxicidad	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
NO	1	2.6%	2	7.1%	0.376
SI	38	97.4%	26	92.9%	
Toxicidad G3					
NO	18	46.2%	22	78.6%	p:0.049
SI Gastrointestinal	7	17.9%	1	3.6%	
SI Hematológica	13	33.3%	5	17.9%	
SI general	1	2.6%	0	0.0%	

*Tabla 3*

Quando se evaluó toxicidad hematológica Grado 1-2, en el grupo que recibe tratamiento con cisplatino solo se encontró una tendencia mayor en el régimen con cisplatino(p: 0.06)(tabla 4)

Toxicidad Hematológica	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
NO	10	25.6%	19	67.9%	0.006
SI Neutropenia	26	66.7%	7	25.0%	
SI Anemia	1	2.6%	0	0.0%	
SI Trombocitopenia	2	5.1%	0	0.0%	

*Tabla 4*

Como consecuencia de una mayor toxicidad grado 3 hematológica y no hematológica, hubo una mayor incidencia en el retraso de tratamiento en el grupo de pacientes tratados con cisplatino (ver tabla 5 y figura 1)

Retraso al tratamiento por Toxicidad:	SI Cisplatino		NO cisplatino		p:
	n	%	n	%	
NO	21	53.8%	18	46.2%	p : 0.015
SI	21	82.1%	5	17.9%	

*Tabla 5*

Quando se evaluó la asociación de los polimorfismos con respuesta patológica completa no se encontró alguna asociación significativa, cuando se evaluó por genotipo o por alelo como se puede observar en la tabla de resultados, esto traduce el papel que juegan los polimorfismos en la vía es importante pero no nos permite localizar un punto álgido en el eje de tratamiento con cisplatino.

	RPC NO		RPC SI		p:
	n	%	n	%	
XPA					p : 0.85
A/A	4	1.8	3	1.0	
A/G	16	43.2	15	50	
G/G	17	45.9	12	40.0	
ERCC1					p: 0.16
C/C	15	40.5	7	23.3	
C/A	16	43.2	20	66.7	
A/A	6	16.2	3	10.	p:0.317
XPA 2 categorías Alelos (G)					
A/A	3	7.7	4	14.3	p:0.804
A/G,G/G	36	92.3	24	85.7	
Alelo (A)					P:0.431
A/A y A/AG	20	54.1%	18	60.0	
G/G	17	45.9	12	40.0	
ERCC1 2 categorías Alelo C.					p:0.618
C/C y C/A	33	84.6	25	89.3	
A/A	6	15.4	3	10.7	p:0.618
Alelo A					
C/C	4	10.8	3	10.0	
C/A,A/A	33	89.2	27	90.0	

*Tabla 6*

Sin embargo los resultados obtenidos al analizar respuesta patológica completa en mama por grupo de tratamiento se obtuvieron datos interesantes. (Tabla 7)

rPC en mama	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
NO	12	30.8%	18	64.3%	0.007
SI	27	69.2%	10	35.7%	
<i>Tabla 7</i>					

No se obtuvieron los mismos resultados cuando se analiza respuesta patológica completa en axila, aunque no se logra obtener significancia estadística existe una tendencia a mayor respuesta patológicas completas en el grupo que recibe tratamiento con cisplatino, una explicación es el limitado número de pacientes ingresados en el estudio. (ver tabla 8 y grafica 2)

rPC en mama	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
NO	9	23.1%	12	42.9%	0.08
SI	30	76.9%	16	57.1%	
<i>Tabla 8</i>					

Se analiza rPC en mama y axila y se encuentra una tendencia en mayor rPC en el régimen con cisplatino, ver tabla 9

rPC en mama y axila	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
NO	18	46.2%	19	67.9%	0.07
SI	21	53.8%	9	32.1%	
<i>Tabla 9</i>					

De acuerdo a estos resultados se obtiene mayor recurrencia en el grupo de pacientes que no recibe tratamiento con un esquema basado en cisplatino como lo podemos observar en la tabla 10

Recurrencia	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
NO	37	94.9%	22	78.6%	0.05
SI	2	5.1%	6	21.4%	
<i>Tabla 10</i>					

Se analizo el perfil de toxicidad y su asociación de acuerdo a polimorfismos y alelos reportándose lo mayor toxicidad hematológica para alelo A respecto a Alelo C así como el genotipo AA del polimorfismo XPA se asocio a mayor toxicidad. ver tabla 11

	TOXICIDAD HEMATOLOGICA NO		TOXICIDAD HEMATOLOGICA SI		p:
	n	%	n	%	
XPA					<b>p : 0.04</b>
C/C	6	20.7%	1	2.6%	
C/A	13	44.8%	18	47.4%	
<b>A/A</b>	<b>10</b>	<b>34.5%</b>	<b>19</b>	<b>50.0%</b>	
ERCC1					
C/C	10	34.5%	12	31.6%	p:0.87
C/A	14	48.3%	22	57.9%	
A/A	5	17.2%	4	10.5%	
XPA 2 categorías Alelos (A)					
C/C	6	20.7%	1	2.6%	<b>p:0.02</b>
<b>C/A,A/A</b>	<b>23</b>	<b>79.3%</b>	<b>37</b>	<b>97.4%</b>	
Alelo (C)					
C/C y C/A	19	65.5%	19	50.0%	p:0.202
A/A	10	34.5%	19	5.0%	
ERCC1 2 categorías Alelo C.					p:0.43
C/C y C/A	33	84.6%	25	86.6%	
A/A	6	15.4%	3	10.7%	
Alelo A					
C/C	11	37.9%	12	31.6	p:0.29
C/A,A/A	18	62.1%	26	68.4%	

Tabla 11

## CONCLUSIONES:

De acuerdo a la recolección de datos obtenida y comentada previamente, se identifica a dos grupos de pacientes con características epidemiológicas similares, que de acuerdo a los resultados permiten tomar algunas consideraciones.

De acuerdo a los resultados que obtuvimos la frecuencia de los polimorfismos (5 UTR) XPA y (8092) ERCC1, se realiza una comparación entre distintas poblaciones, que incluyen Áfrico americanos, caucásicos, polacos, Hispanos y se observa un mayor frecuencia del alelo polimórfico, resultados muy similares a los reportados en un estudios del polimorfismo XPA en cáncer de testículo realizado en nuestra institución, en el caso de nuestro trabajo se reporta de igual forma mayor porcentaje del alelo polimórfico con respecto al resto.

En el caso de ERCC1 ERCC1 C8092A se ha reportado en el Hospital general de Massachusetts una frecuencia de 55% en el genotipo silvestre, 38 % en el heterócigo y 7% en el homocigo en nuestro trabajo se reporta una mayor frecuencia se obtuvo en el genotipo heterócigo siendo de 50%.

No se ha encontrado alguna asociación significativa en cuanto a respuesta patológica completa o supervivencia global con los polimorfismos 5 UTR y 8092, de los genes de reparación XPA y ERCC1, sin embargo cuando se evaluaron los resultados por subgrupo de tratamiento se observo asociación a favor del grupo que recibe tratamiento neo adyuvante con cisplatino con respecto al grupo que recibe tratamiento sin este fármaco, esto nos permite corroborar de forma clínica los estudios preclínicos que conocemos del mecanismo de acción del cisplatino, en donde estos polimorfismos de los genes de reparación que hemos estudiado, juegan un papel esencial en la detección del daño a la hebra de DNA y delección del sitio dañado como ya lo hemos comentado en la introducción, pero quizá no representan el punto álgido dentro de los mecanismos de reparación en el tejido mamario pues como también ya lo hemos comentado, las vías de reparación se encuentran en todos los tejidos en algunos casos inactivas y en otros casos con mayor actividad y existen otros genes de reparación que también participan en la vía que amerita realizar estudios similares con el objetivo de esclarecer el papel que juegan en el tratamiento de esta neoplasia.

Se identifica una tendencia hacia el beneficio de pacientes que reciben tratamiento Neo adyuvante basado en platino, así como mayor toxicidad, sin embargo es de hacer notar que aunque se tiene mayor numero de retrasos en la aplicación de quimioterapia el porcentaje de pacientes que logra rPC es mayor en el régimen basado en cisplatino, y la razón por la cual no alcanza significancia estadística consideramos que se debe al tamaño de muestra.

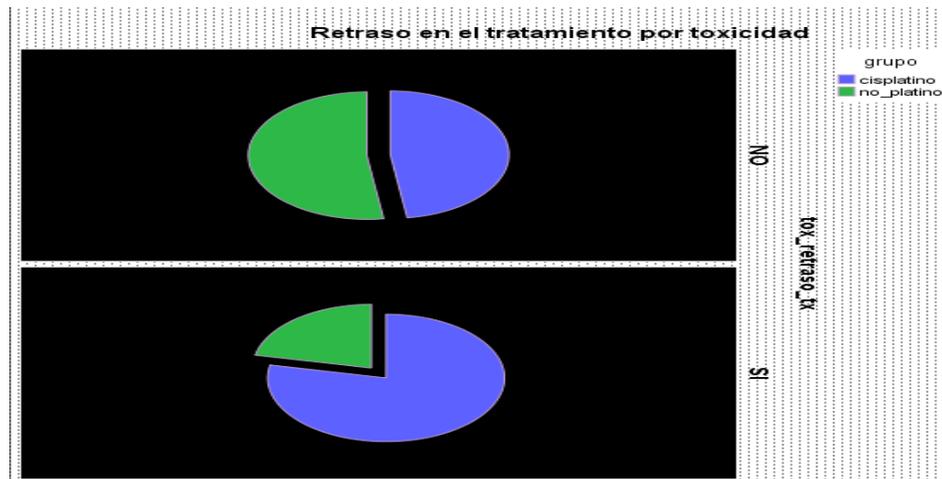
Debido a que el seguimiento de nuestras pacientes en más del 50% es menor a 1 año el realizar un análisis de SG o SLE por el periodo corto de permite tomar alguna consideración firme en este momento, pero realizar un seguimiento a partir de esta corte de pacientes y sus reporte subsecuentes es un área de mucho interés que deberá tomarse en cuenta.

**ANEXO 1,Tabla de toxicidad CTC AE v3.**

<b>TOXICIDAD</b>	<b>GRADO 1</b>	<b>GRADO 2</b>	<b>GRADO 3</b>	<b>GRADO 4</b>
<b>Leucopenia</b>	<LIN-3000/mm3	<3000-2000/mm3	<2000-1000/mm3	<1000-
<b>Neutropenia</b>	2000-1500/mm3	1500-1000/mm3	<1000-500/mm3	<500/mm3
<b>Trombocitopenia</b>	<LIN-750000/mm3	<75 000-50 000/mm3	<50000-25000	<25 000
<b>Hemoglobina</b>	<LIN – 10G/dl	<10-8g/dl	<8 – 6.5 g/dl	< 6.5 g/dl
<b>Reacción Alérgica</b>	Temperatura<38GC Rash transitorio	Rash, Flush, Urticaria, Fiebre mayor de 38GC	Broncoespasmo con o sin urticaria	Anafilaxia
<b>Vomito</b>	1 episodio en 24 h	2-5 episodios en 24h	>6episodios en 24h	Compromiso de la vida del pte.
<b>Nausea</b>	Pérdida del apetito sin repercusiones en hábitos alimenticios	Reducción de ingesta oral sin pérdida de peso	Inadecuada ingesta calórica	Compromiso de la vida del pte
<b>Neuropatía sensorial</b>	Perdida de reflejos profundos, parestias	Parestias que intervienen en la función pero no en calidad de vida	Parestias que intervienen en la calidad de vida	incapacitante
<b>Neuropatía Motora</b>	Debilidad. Asintomático	Debilidad sintomática No interfiere con la calidad de vida	Debilidad sintomática interfiere con la calidad de vida.	incapacitante
<b>Insuficiencia renal creatinina</b>	<LIN-1.5xLIN	>1.5 – 3 X LIN	>3 – 6 X LIN	> 6 x LIN
<b>Hipomagnesemia</b>	LIN -1.2mg/dl	<1.2 – 0.9 mg/dl	<0.9 - 0.7mg/dl	< de 0.7mg/dl
<b>Hipokalemia</b>	<LIN-3mmol/L	-----	<3 – 2.5 mmol/L	< 2.5 mmol/L

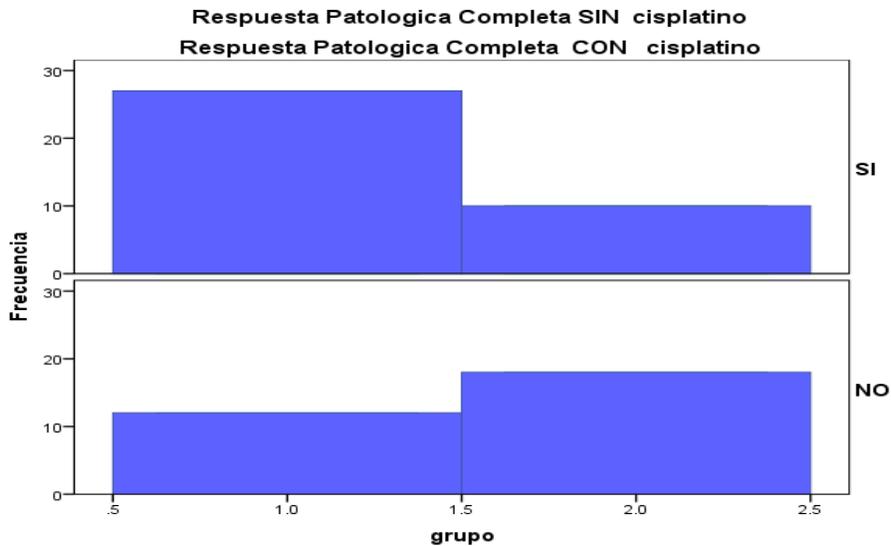
**ANEXO 2 (GRAFICAS)**

1.- Se observa el grupo de pacientes que reciben quimioterapia neo adyuvante con un esquema basado en cisplatino de acuerdo a grado de toxicidad (3) presentan retraso en el tratamiento



Retraso al tratamiento por Toxicidad:	SI Cisplatino		No cisplatino		p:
	n	%	n	%	
NO	21	53.8%	18	46.2%	p : 0.015
SI	21	82.1%	5	17.9%	

2.-Pese a retraso en el tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino se obtuvo un mayor porcentaje de respuestas patológicas completas en este grupo de pacientes.



RPC en mama	SI Cisplatino		No Cisplatino		p
NO	12	30.8%	18	64.3%	0.007
SI	27	69.2%	10	35.7%	

## **GLOSARIO:**

MDR: Múltiple resistencia a fármacos.

NER: Reparación por excisión de nucleótidos.

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

DNA: Acido desoxirribonucleico.

rCP: Respuesta patológica completa.

XPA: Xeroderma pigmentoso A

XPB: Xeroderma pigmentoso C

XPC: Xeroderma pigmentoso C

XPD: Xeroderma pigmentoso D

## BIBLIOGRAFIA

1. Bruce A. Chabner , Dan L. Longo , **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice (Chabner, Cancer Chemotherapy and Biotherapy) , Wolters Klumer Fifth Edition.**
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int J Cancer*, 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
3. Rick Alteri, MD; Priti Bandi, MS; Louise Brinton, PhD; Carolina, Breast Cancer, American Cancer Society, Surveillance Research, 2011 .
4. Palacio-Mejía LS, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública Mex* 2009; 51 Suplemento 2: S208-S219
5. International Agency for research on cancer, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008, *Globocan 2008*.
6. Robert W. Carison, D Crail Allred, Harold J Burstein, Guidelines NCCN , Breast Cancer, 2012.
7. Emad A. Rakha, Jorge S. Reis-Filho, and Ian O. Ellis, *J Clin Oncol* 26:2568-2581 Basal-Like Breast Cancer: A Critical Review, *J Clin Oncol* 26:2568-2581.
8. Chollet<sup>1,2</sup>, S Amat<sup>\*,1,2</sup>, H Cure<sup>1,2</sup>, M de Latour, Prognostic significance of a complete pathological response after induction chemotherapy in operable breast cancer, *British Journal of Cancer* (2002) 86(7), 1041 – 1046.
9. Fernando Lara-Medina, MD ; Monika Blake-Cerda, MD5; Claudia Arce, Triple-Negative Breast Cancer in Hispanic, Patients, *Cancer* August 15, 2011.
10. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. Aug 17 2000;406(6797):747-752.
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 11 2001;98(19):10869-10874.
12. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):404; author reply 405.
13. Millikan RC, Newman B, Tse CK, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. May 2008;109(1):123-139.
14. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. Aug 15 2005;11(16):5678-5685
15. De Vita et al. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 3200(2005).
16. Agnieszka Kołacińska, Justyna Chałubińska, Pathological complete response in younger and older breast cancer patients, *Arch Med Sci* 2, April / 2012.
17. Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, Ferrari L, Luini A, Greco M, et al. Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:1539-1545.
18. Ravdin PM. Anthracycline resistance in breast cancer: Clinical applications of current knowledge. *Eur J Cancer*. 1995;31A(Suppl 7):11-14.

19. Mamounas EP, NSABP Protocol B-27. Preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide followed by preoperative or postoperative docetaxel, *Oncology (Williston Park)*. 1997 Jun;11(6 Suppl 6):37-40.
20. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes, *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1796-804.
21. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27, *J Clin Oncol*, 2008 Feb 10;26(5):778-85
22. Cornelia Liedtke, Chafika Mazouni, Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer, *J Clin Oncol* 26:1275-1281.
- 23 Keith D. Amos, Barbara Adamo, and Carey K. Anders, Triple-Negative Breast Cancer: An Update on Neoadjuvant Clinical Trials, *International Journal of Breast Cancer* 2012.
- 24 Liping Xu, Shuping Yin, Sanjeev Banerjee, Enhanced Anticancer Effect of the Combination of Cisplatin and TRAIL in Triple-Negative Breast Tumor Cells, *Mol Cancer Ther*; 10(3) March 2011.
- 25 J. Gronwald, T. Byrski, T. Huzarski, R. Dent, V. Bielicka , Neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients, *J Clin Oncol* 27:15s, 2009 (suppl; abstr 502).
- 26 B. Sirohi, M. Arnedos, S. Popat, Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer, *Annals of Oncology* 19: 1847–1852, 2008,
- 27 William M. Sikov, Don S. Dizon, Rochelle Strenger, Frequent Pathologic Complete Responses in Aggressive Stages II to III Breast Cancers With Every-4-Week Carboplatin and Weekly Paclitaxel With or Without Trastuzumab: A Brown University Oncology Group Study, *J Clin Oncol* 27:4693-4700.
- 28 Daniel P. Silver, Andrea L. Richardson, Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer, *J Clin Oncol* 28:1145-1153.
- 29 Jamieson, E.R. & Lippard, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev* 99, 2467-2498(1999).
- 30 Lippert, B. Cisplatin. 563(*Helvetica Chimica Acta*: 1999).
- 31 Rosenberg Barnett & Lippert Bernhard Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the search Goes On. Cisplatin 563(1999).
- 32 Woźniak, K. & Błasiak, J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim. Pol* 49, 583-596(2002).
- 33 Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 7, 573-584(2007).
- 34 Dabholkar, M. et al. Cisplatin-DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro. *Environ. Health Perspect* 98, 53-59(1992).
- 35 Takahara, P.M. et al. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 377, 649-652(1995).
- 36 Malinge, J.M., Giraud-Panis, M.J. & Leng, M. Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *J. Inorg. Biochem* 77, 23-29(1999).
- 37 De Vita et al. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 3200(2005).
- 38 Lloyd R. Kelland, DNA Repair Enzymes and Platinum Drug Resistance in Tumors, *AACR Education Book*, April 12–16, 2008 Pp: 209-213
- 39 Richard D. Kennedy and Alan D. D'Andrea DNA Repair Pathways in Clinical Practice: Lessons From Pediatric Cancer Susceptibility Syndromes, *J Clin Oncol* 24:3799-3808.

- 40 A.S. Balajee \*, A. May, V.A. Bohr, Fine structural analysis of DNA repair in mammalian cells, *Mutation Research* 404 (1998) 3-11
- 41 Zamble, D.B. et al. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* 35, 10004-10013(1996).
- 42 James M. Ford and Philip C. Hanawalt, Expression of Wild-type p53 Is Required for Efficient Global Genomic Nucleotide Excision Repair in UV-irradiated Human Fibroblasts.
- 43 Byrski T, Huzarski T, Dent R, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* May 2009;115(2):359-363.
- 44 Lie Cheng, Yongli Guan, Expression in Normal Human Tissues of Five Nucleotide Excision Repair Genes Measured Simultaneously by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction1, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* Vol. 8, 801–807, September 1999
- 45 Claire J. McGurk,1 Michele Cummings, Regulation of DNA Repair Gene Expression in Human Cancer Cell Lines, *Journal of Cellular Biochemistry* 97:1121–1136 (2006).
- 46 Wouter L. de Laat, Nicolaas G.J. Jaspers and Jan H.J. Hoeijmakers , Molecular mechanism of nucleotide excision repair, *Genes & Dev.* 1999 13: 768-785.
- 47 James E. CLEAVER and J. Christopher STATES, The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells : the XPA damage binding protein, *Biochem. J.* (1997) 328, 1±12
- 48 Stephen G. Chaney, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 88. No. 19, October 2, 1996.
- 49 Corine Ekhart a, Sjoerd Rodenhuis b, Paul H.M. Smits , An overview of the relations between polymorphisms in drug metabolising enzymes and drug transporters and survival after cancer drug treatment, *Cancer Treatment Reviews* (2009) 35, 18– 31.
- 50 Ellen L. Goode, Cornelia M. Ulrich, Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 11, 1513–1530, December 2002
- 51 Saadat M , Ansari-Lari M ,Polymorphism of XRCC1 (at codon 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures, *Breast Cancer Res Treat* 2009 May;115(1):137-44

