

[Escriba el título del documento]

---



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD**

**HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA No. 3  
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"  
SERVICIO DE ONCOLOGÍA GINECOLÓGICA**

**"PRONÓSTICO Y CURSO CLÍNICO DE LAS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA  
Y EXPRESIÓN DE NOTCH 1 Y 3"**

**REGISTRO: R-2017-1905-6**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MÉDICO SUBESPECIALISTA EN  
ONCOLOGÍA GINECOLÓGICA**

**PRESENTA:**

**DRA. ANA VICTORIA DE ALBA GONZÁLEZ**

**ASESOR DE TESIS:**

**DR. JOSÉ DAMIÁN GÓMEZ ARCHILA**

**CIUDAD DE MÉXICO JULIO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

[Escriba el título del documento]

---

**FIRMAS DE AUTORIZACIÓN**

---

**Dr. Juan Carlos Hinojosa Cruz**  
**Director de Educación e Investigación en Salud**

---

**Dra. Verónica Quintana Romero**  
**Jefe de la División de Educación en Salud**

---

**Dr. Juan Antonio García Bello**  
**Jefe de la División de Investigación en Salud**

---

**Dr. José Damián Gómez Archila**  
**Asesor de tesis**

**INVESTIGADOR RESPONSABLE.**

Nombre: José Damián Gómez Archila.  
Área de adscripción: HGO-3 CMN La Raza México DF, oncología quirúrgica.  
Domicilio: Calz Vallejo esquina Antonio Valeriano SN. Colonia La Raza Delegación Azcapotzalco, Ciudad de México. CP 02990.  
Teléfono: 5576143042  
Correo electrónico: gomezarchila@hotmail.com  
Área de Especialidad: oncología ginecológica

**INVESTIGADOR ASOCIADO.**

Nombre: Ana Victoria de Alba González  
Área de adscripción: HGO-3 CMN La Raza México DF, oncología quirúrgica.  
Domicilio: Calz Vallejo esquina Antonio Valeriano SN. Colonia La Raza Delegación Azcapotzalco, Ciudad de México. CP 02990.  
Teléfono: 5518284214  
Correo electrónico: ana\_100221@hotmail.com  
Área de Especialidad: Residente 3er año oncología ginecológica

**UNIDADES (ES) Y DEPARTAMENTO (S) DONDE SE REALIZARÁ EL PROYECTO.**

Unidad: HGO-3 CMN La Raza, departamento de oncología quirúrgica.  
Delegación: 1 noroeste.  
Dirección: Calz Vallejo esquina Antonio Valeriano SN. Colonia La Raza Delegación Azcapotzalco, Ciudad de México. CP 02990.  
Ciudad: México DF.



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud



**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **1905** con número de registro **13 CI 19 038 229** ante COFEPRIS  
HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA NUM. 23 IGNACIO MORONES PRIETO MONTERREY, NUEVO LEON, NUEVO LEÓN

FECHA **24/02/2017**

**M.E. JOSE DAMIAN GOMEZ ARCHILA**

**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**"ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NOTCH 1 Y 3 EN MUESTRAS DE PACIENTES MEXICANAS CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL CÁNCER DE MAMA".**

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2017-1905-6

ATENTAMENTE

**DR.(A). MIGUEL ELOY TORCIDA GONZÁLEZ**

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 1905

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor José Damián Gómez Archila quiero expresarle mis agradecimientos, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él, por confiar en mí, por guiarme, ayudarme y enseñarme; por compartir sus conocimientos, su manera de trabajar, su persistencia y motivación que han sido fundamentales para realizar y llevar a buen término este proyecto, esto de ninguna forma sería posible sin usted siempre estaré en deuda, infinitas gracias.

## ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Abreviaturas	7
Glosario	8
Índice de cuadros	10
Índice de gráficos	10
Índice de figuras	11
Resumen /Abstract	12
Antecedentes	17
Planteamiento del problema	31
Pregunta de investigación	31
Justificación	31
Objetivos	33
Metodología	
- Diseño del estudio	34
- Ubicación y temporalidad del estudio	34
- Criterios de selección	35
- Variables	36
- Muestra	38
- Descripción del procedimiento	39
- Plan de análisis estadístico	41
Procesamiento de datos	41
Instrumentos de recolección	41
Aspectos éticos	42
Resultados	43
Discusión	57
Conclusiones	61
Referencias bibliográficas	62
Anexos	74

## **ABREVIATURAS**

**AC:** Adriamicina y Ciclofosfamida

**Ca:** Cáncer

**CISH:** Hibridación in situ cromogénica

**C<sub>T</sub>:** Ciclo umbral en PCR tiempo real

**$\Delta C_T$ :** Delta C<sub>T</sub> obtenido de la diferencia del valor de C<sub>T</sub> del gen de interés con el gen de referencia o constitutivo.

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario (proveniente de RNA).

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico

**FISH:** Hibridación in situ fluorescente

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PCR tiempo real:** PCR cuantitativa con base a técnica del  $\Delta C_T$  y  $\Delta\Delta C_T$  (Fold change)

**SISH:** Hibridación in situ con plata

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**TNM:** Tumor, nódulo y metástasis



## GLOSARIO

**Adyuvancia:** Tratamiento adicional para el cáncer que se administra después del tratamiento primario para disminuir el riesgo de recaída.

**CISH:** Es una técnica en la que una hebra de DNA o RNA complementaria se usa para localizar un DNA o RNA específico en una muestra de tejido.

**Epigenética:** Se refiere a los cambios heredables en el DNA e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina, por lo que afectan la expresión génica y el fenotipo.

**FISH:** Es una técnica citogenética de marcaje de cromosomas mediante la cual estos son hibridados con sondas que emiten fluorescencia y permiten la visualización, distinción y estudio de los cromosomas así como de las anomalías que puedan presentar.

**Fold Change:** Incremento en número de veces más que se encuentra expresado el gen de interés con respecto al grupo calibrador o gen de referencia.

**HER 2 Neu:** Proteína que participa en el crecimiento normal de las células, es un tipo de receptor de la tirosina cinasa. También se llama c-erbB-2, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

**Luminal A:** Subtipo molecular de cáncer de mama con receptores de hormonas positivos (ya sea de estrógenos, de progesterona o ambos) y receptores HER 2 neu negativos.

**Luminal B:** Subtipo molecular de cáncer de mama con receptores de hormonas positivos (ya sea de estrógeno, de progesterona o ambos) y receptores HER 2 neu positivos.

**Neoadyuvancia:** Tratamiento (quimioterapia o radioterapia) que se administra como primer paso para reducir el tamaño del tumor antes del tratamiento principal que generalmente consiste en cirugía.

**Oncogén:** Gen que por su gran capacidad de mutación o transformación induce a la formación de cáncer en una célula.

**Oncotype:** Es una prueba de 21 genes que predice la probabilidad de beneficiarse de la quimioterapia y el riesgo de recurrencia distante a 10 años para informar las decisiones de tratamiento adyuvante en ciertas mujeres que presentan cáncer de mama invasor en estadio temprano.

**Proto-oncogén:** Gen que participa en el crecimiento normal de las células. Las mutaciones (cambios) en este pueden hacer que este se convierta en un oncogén, que puede hacer que se formen células cancerosas.

**Tipo basal:** Subtipo con receptores de hormonas negativos y HER2 negativo (también llamado cáncer de mama triple negativo).

**Trastuzumab:** Es un anticuerpo monoclonal humanizado semejante a los anticuerpos que produce el organismo de forma natural para protegerse de las infecciones por virus y bacterias. Los anticuerpos monoclonales son proteínas que reconocen específicamente y se unen a otras proteínas únicas del organismo llamadas antígenos. El trastuzumab se une selectivamente al receptor de tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER 2 neu).

**Triple negativo:** Subtipo molecular de cáncer de mama que no expresa receptores de hormonas (estrógeno y progesterona) ni receptores HER2 neu.

**ÍNDICE DE CUADROS.**

TNM 2010	17
Estadíos Clínicos	20
Operacionalización de variables	36
Calculo del tamaño de la muestra	38
Tipo de tumor y frecuencia	43
Cuantificación relativa usando el método comparativo Ct	52
Casos de recaída y persistencia en luminal A	54
Casos de recaída y persistencia en luminal B	54
Casos de recaída y persistencia en HER2 Neu	55
Casos de recaída y persistencia en triple negativo	55

**ÍNDICE DE GRÁFICOS.**

Promedio de expresión por Inmohistoquímica de cada uno de los grupos para Notch 1	48
Promedio de expresión por Inmohistoquímica de cada uno de los grupos para Notch 3	49
Fold change de cada tipo molecular de cáncer de mama con respecto al grupo calibrador para Notch 1	53
Fold change de cada tipo molecular de cáncer de mama con respecto al grupo calibrador para Notch 3	53

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

Inmunohistoquímica de Linfoma de Hodgkin como control positivo para <i>Notch 1</i>	43
Inmunohistoquímica de Adenocarcinoma de pulmón como control positivo para <i>Notch 3</i>	44
Inmunohistoquímica para <i>Notch 1</i> y 3 en muestras de pacientes con tumores benignos	44
Inmunohistoquímica para <i>Notch 1</i> y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama Luminal A	45
Inmunohistoquímica para <i>Notch 1</i> y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama Luminal B	46
Inmunohistoquímica para <i>Notch 1</i> y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama HER 2 Neu	46
Inmunohistoquímica para <i>Notch 1</i> y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama triple negativo	47
PCR tiempo real para <i>Notch 1</i> en línea celular MCF7	50
PCR tiempo real para <i>Notch 3</i> en línea celular MCF7	51

## PRONÓSTICO Y CURSO CLÍNICO DE LAS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y EXPRESIÓN DE NOTCH 1 Y 3

### RESUMEN.

**Antecedentes:** El cáncer de mama en México a partir de 2006 ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino. Como la mayoría de los tumores el cáncer de mama se clasifica mediante el sistema TNM; que contempla tamaño del tumor (T), ganglios linfáticos regionales o nódulos (N), así como metástasis o diseminación a órganos distantes (M). Y actualmente otra clasificación, la molecular divide al cáncer de mama en 4 subtipos, con base a la presencia o no de receptores de estrógenos, progesterona y sobreexpresión del receptor de membrana Her 2 Neu, teniendo implicaciones pronósticas y terapéuticas.

De manera general se puede hablar que al menos un 15% de las pacientes presentarán mala respuesta a los tratamientos o incluso progresión de la enfermedad, lo cual nos indica que no solo los factores que se contemplan en la clasificación molecular influyen o son pronósticos sino que hay otros asociados con los cuales existen interrelaciones parcialmente estudiadas y que pueden influir en la evolución clínica del cáncer de mama. Este es el caso de la familia de genes *Notch* y su relación con HER 2 Neu; ya que tiene la característica de actuar en algunos procesos biológicos como proto-oncogén, oncogén o gen tumor supresor.

**Objetivo:** Determinar el pronóstico y curso clínico de las pacientes con cáncer de mama y expresión de *Notch 1* y 3.

**Material y métodos:** Se trata de un trabajo descriptivo, analítico y retrospectivo. Se tomaron como casos a las muestras incluidas en parafina de pacientes con cáncer de mama y como controles a las muestras de pacientes de tumores benignos. Se realizó inmunohistoquímica para determinar la expresión de *Notch 1* y *Notch 3* de manera cualitativa y posteriormente se realizó PCR tiempo real para determinar expresión cuantitativa de los genes en estudio. Finalmente se analizaron los casos con respecto al pronóstico y curso clínico de la enfermedad (recaída y persistencia).

**Resultados:** Únicamente se encontró diferencia estadísticamente significativa en la expresión de *Notch 1* por inmunohistoquímica al comparar los tumores benignos y los 4 subtipos moleculares de cáncer de mama; no fue significativo para *Notch 3*. La expresión por inmunohistoquímica para *Notch 1* y *Notch 3* no se relacionó con el  $\Delta C_T$  o  $\Delta\Delta C_T$  correspondiente en PCR tiempo real ni con la evolución clínica de la enfermedad.

**Conclusiones:** No se encontró asociación entre la expresión de *Notch 1* y *Notch 3* con la evolución clínica del cáncer de mama en cuanto a recaída y persistencia. La expresión de *Notch 1* y *Notch 3* en tumores benignos, de manera interesante, fue similar a la de los tumores invasores.

**Palabras clave:** *Notch 1*, *Notch 3*, cáncer de mama, Her 2 Neu, curso clínico.

## ABSTRACT

**Background:** Breast cancer in Mexico since 2006 occupies the first place of mortality by malignant tumor in women older than 25 years, displacing from that position to cervical cancer. As most tumors, breast cancer is classified by the TNM system; which includes tumor size (T), regional lymph nodes or nodules (N), as well as metastasis or dissemination to distant organs (M). And now another classification, the molecular division of breast cancer into 4 subtypes, based on the presence or absence of estrogen receptors, progesterone and overexpression of Her 2 Neu membrane receptor, having prognostic and therapeutic implications. In general terms, it can be said that at least 15% of patients will have a poor response to treatments or even disease progression, which indicates that not only the factors contemplated in the molecular classification influence or are prognostic, but also that there are others associated with whom there are partially studied interrelationships that can influence the clinical evolution of breast cancer. This is the case of the *Notch* gene family and its relationship with Her 2 Neu; since it has the characteristic of acting in some biological processes such as proto-oncogene, oncogene or tumor suppressor gene.

**Objective:** To determine the prognosis and clinical course of patients with breast cancer and expression of *Notch 1* and *3*.

**Material and methods:** This is a descriptive, analytical and retrospective work. Samples included in paraffin from patients with breast cancer were used as cases; and controls were samples included in paraffin from patients with benign tumors. Immunohistochemistry was performed to determine the expression of *Notch 1* and *Notch 3* in a qualitative manner and subsequently real-time PCR was performed to determine quantitative expression of the genes under study. Finally, the cases were analyzed with respect to the prognosis and clinical course of the disease (relapse and persistence).

**Results:** There was only statistically significant difference in the expression of *Notch 1* by immunohistochemistry when comparing benign tumors and the 4 molecular subtypes of breast cancer; it was not significant for *Notch 3*. Immunohistochemical expression for *Notch 1 and Notch 3* was not related to the corresponding  $\Delta C_T$  o  $\Delta\Delta C_T$  in real-time PCR or to the clinical evolution of the disease.

**Conclusions:** No association was found between the expression of *Notch 1* and *Notch 3* with the clinical evolution of breast cancer in terms of relapse and persistence. The expression of *Notch 1* and *Notch 3* in benign tumors, interestingly was similar to that of the invading tumors.

**Key words:** *Notch1, Notch3*, breast cancer, Her 2 Neu, clinical course.



## **ANTECEDENTES.**

En el ámbito mundial el cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasia en la mujer en el ámbito mundial con cerca de 500 mil decesos cada año, de las cuales el 70% ocurre en países en desarrollo (1).

El riesgo de padecer esta enfermedad es superior en las mujeres de países con nivel socioeconómico alto, pero el riesgo de morir por ella es mayor entre las mujeres que habitan países pobres, debido a un menor acceso a los servicios de salud para la detección temprana, tratamiento y control (2).

De acuerdo con las últimas estimaciones estadísticas de la International Agency of Research on Cancer: GLOBOCAN 2012, el carcinoma de mama es la neoplasia sólida más frecuente entre la población femenina a nivel mundial, registrándose más de 1,384,155 nuevos casos al año, lo que corresponde a una tasa ajustada por edad (ASR, por las siglas de Age Standardized Rate) de 39.0 por 100,000 mujeres (3).

En cuanto a la mortalidad, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo. Según las estadísticas mencionadas, en 2008, se registraron 458,503 muertes por cáncer de mama en el mundo, lo que corresponde a un tasa de mortalidad de ASR de 12.5 por 100 000 habitantes.

El Cáncer de mama en México a partir de 2006 ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino. En el año 2010 la tasa estandarizada de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49.5% en las últimas dos décadas (4).

Como la mayoría de los tumores el cáncer de mama se clasifica mediante el sistema TNM; que contempla tamaño del tumor (T), ganglios linfáticos regionales o nódulos (N), así como metástasis o diseminación a órganos distantes (M); además de presentar una variante según el reporte histopatológico y una clasificación molecular (cuadro 1).

Cuadro 1. Última modificación a la clasificación TNM 2010 (5).

a) Tamaño del tumor (T).

TUMOR	TAMAÑO	TUMOR	TAMAÑO	TUMOR	DESCRIPCIÓN
TX	No se puede evaluar el tumor primario	T2	Mayor 2 cm – hasta 5 cm	Tis	Tumor in situ (Ductal y lobulillar)
T0	No existe prueba de tumor primario	T3	Mayor a 5 cm	T1mi	Microinvasión menor a 1 mm
T1a	Mayor a 1mm hasta 5 mm	T4a	Fijo a pared torácica	Paget	Tumor in situ del pezón sin tumor
T1b	Mayor a 5mm – hasta 10 mm	T4b	Fafección de piel		
T1c	Mayor 1cm – hasta 2 cm	T4c	T4a y T4b		
		T4d	Ca inflamatorio		

b) Ganglios linfáticos regionales (clínica); N.

NX	No se puede evaluar el ganglio linfático regional
N0	Sin ganglios
N1	1 o varios ganglios linfáticos homolaterales axilares móviles
N2a	Ganglio(s) axilares fijos entre sí o a otras estructuras
N2b	Metástasis clínicamente aparentes en la cadena mamaria interna sin evidencia clínica de metástasis axilares
N3a	Metástasis a ganglio(s) infraclavicular homolateral y ganglio(s) axilares
N3b	Metástasis a ganglio(s) de la mamaria interna y axilares homolaterales
N3c	Metástasis a ganglio(s) supraclaviculares homolaterales

## [Escriba el título del documento]

c) Ganglios linfáticos regionales por reporte histopatológico (pN).

pNX	No se estudiaron ganglios
pNO(i-)	No metástasis IHQ negativa
pN0(i+)	No metástasis histológicas con IHQ positiva, nidos tumorales mayores a 0.2mm
pN0(mol-)	Sin metástasis por histopatología ni estudios de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR).
pN1mi	Micrometástasis (mayor a 0.2 mm y no mayor a 2 mm)
pN1a	Metástasis en 1 – 3 ganglios axilares
pN1b	Metástasis en ganglios mamarios internos con micrometástasis o macrometástasis detectada mediante biopsia de ganglio linfático centinela pero sin detección clínica
pN1c	Metástasis en ganglios de cadena mamaria interna con enfermedad microscópica detectada por biopsia de GC pero que no son clínicamente aparentes
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares o en ganglios de cadena mamaria interna clínicamente aparentes en ausencia de metástasis a ganglios axilares
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares con al menos 1 con diámetro mayor a 0.2 mm
pN2b	Metástasis en ganglios de cadena mamaria interna clínicamente aparentes en ausencia de metástasis a ganglios axilares
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios axilares o en ganglios infra clavculares, o en ganglios de cadena mamaria interna junto con 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares positivos sin adenopatías clínicas en ganglios de mamaria interna; o con ganglio supraclavicular positivo homolateral. Metástasis en 10 o más ganglios axilares positivos con al menos una metástasis mayor a 2 mm, o bien metástasis a ganglios infra clavculares
pN3a	Metástasis a ganglios infra clavculares (Ganglio axilar III)

## [Escriba el título del documento]

pN3b	Metástasis en ganglios clínicamente evidentes en cadena mamaria interna en presencia de 1 o más ganglios axilares positivos; o en más de 3 ganglios axilares positivos con metástasis microscópica de ganglios de mamaria interna detectados por biopsia de GC pero no clínicamente evidentes (clínicamente evidentes significa encontradas al examen clínico o por métodos de imagen)
pN3c	Metástasis a ganglios supraclaviculares homolaterales

d) Metástasis a distancia (M).

MX	No evaluable
M0	Sin metástasis
M1	Metástasis a distancia

Para determinar el tratamiento en esta neoplasia, existen las etapas o estadios clínicos (tabla 2) que se basan en el TNM y que son la pauta o lineamientos actuales para decidir la terapéutica a utilizar en cada caso; que puede ser cirugía inicial seguida de quimioterapia y radioterapia adyuvantes o iniciar con quimioterapia con o sin radioterapia neoadyuvante para complementar con cirugía. Además las nuevas tendencias en radioterapia, la modalidad intraoperatoria; proporciona una opción más de tratamiento en etapas iniciales utilizada de manera simultánea con cirugía.

Cuadro 2. Estadíos clínicos.

ESTADIO	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1(Incluye T1mi)	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1(Incluye T1mi)	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1(Incluye T1mi)	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0

ESTADIO	T	N	M
IIIA	T0	N2	M0
	T1(Incluye T1mi)	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Finalmente, y dependiendo de la clasificación molecular del tumor se concluirá con tratamiento hormonal (tamoxifeno o inhibidores de aromatasa del tipo letrozol o anastrozol).

Tratamiento sistémico adyuvante.

El oncólogo clínico deberá contar con información completa de las características del tumor; en particular, la expresión o no de los blancos terapéuticos (receptores hormonales y sobreexpresión del receptor HER 2 Neu) que tiene importancia trascendental para brindar un tratamiento óptimo e individualizado.

A través de inmunohistoquímica se ha clasificado por las características del tumor en cuatro grupos fundamentales, donde la presencia o no de receptores de estrógenos son definitivos para la categorización de esta clasificación:

1. Tumores con receptores de estrógeno positivos.

1.1. Luminal A: Receptores de estrógeno positivos, receptores de progesterona positivos o negativos, HER 2 Neu negativo.

1.2. Luminal B: Receptores de estrógeno positivos, receptores de progesterona positivos, HER 2 Neu positivo.

2. Tumores con receptores de estrógeno negativos.

2.1. Her 2 neu: Receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos, HER 2 Neu positivo.

2.2. *Basal like (triple negativo)*: Receptores de estrógeno negativos, receptores de progesterona negativos, HER 2 Neu: negativo.

Se le llama adyuvancia a todo tratamiento antineoplásico administrado después de un tratamiento quirúrgico; sus objetivos son prolongar el periodo libre de enfermedad, reducir las recurrencias locales y sistémicas; y aumentar la supervivencia global.

Pacientes con ganglios positivos según el reporte histopatológico. Debido al alto riesgo de recaída en este grupo, todas las pacientes con ganglios positivos deberán recibir tratamiento sistémico adyuvante a base de quimioterapia independientemente del número de ganglios afectados (6).

La radioterapia también será necesaria en estos casos aunque hay algunas excepciones; pero de manera general se consideran indicaciones para esta opción de tratamiento tamaño inicial del tumor de 5 cm o más, afección de piel o carcinoma inflamatorio y antecedente de cirugía conservadora.

En lo que respecta a la sobreexpresión de HER 2 Neu el tratamiento sistémico específico además de la quimioterapia convencional se basa en el uso de trastuzumab, un anticuerpo monoclonal.

Pacientes con ganglios negativos. Se recomienda el empleo de tratamiento adyuvante sistémico (quimioterapia ± hormonoterapia ± trastuzumab) cuando exista alguna de las siguientes condiciones:

- Tumor > 1 cm (más de 3 cm para histologías favorables como cáncer tubular y mucinoso) con receptores hormonales positivos y HER 2 Neu negativo. (hormonoterapia).
- Tumor triple negativo > 5 mm. (quimioterapia).

## [Escriba el título del documento]

---

- Tumor > 5 mm con sobreexpresión del oncogén HER -2 Neu (quimioterapia + trastuzumab ± hormonoterapia).
- Oncotype Dx con alta puntuación de recurrencia ( $\geq 31$ ) si se cuenta con él (quimioterapia + hormonoterapia).

Considerar también tratamiento sistémico (quimioterapia ± hormonoterapia ± trastuzumab) si está presente alguna de las siguientes características (7,8):

- Tumor de alto grado.
- Presencia de invasión linfovascular.
- Oncotype Dx con puntuación intermedia de recurrencia (18-30).
- Edad < 35 años.

Los esquemas de quimioterapia de dosis densas con AC (adriamicina y ciclofosfamida) bisemanal seguido de paclitaxel semanal más filgrastim logran una reducción de un 26% en el riesgo de recurrencia y de un 31% en la posibilidad de muerte (9).

El uso de la quimioterapia con los esquemas actuales y contemplando como base a las antraciclinas, en la mayoría de los pacientes representa una forma muy eficaz de controlar la enfermedad; pero en un grupo nada despreciable de pacientes el daño que provocan estos fármacos es tanto que deben de suspenderse, principalmente por el daño o toxicidad cardiaca que se ha documentado, limitando así en gran medida la posibilidad de limitar la enfermedad.

Con el advenimiento de las terapias blanco como el caso del trastuzumab, pertuzumab y otros; para pacientes con sobreexpresión de HER 2 Neu se ha demostrado mejor control de la enfermedad, pues por el hecho de presentar esta alteración molecular, se considera un tumor de alto riesgo y peor pronóstico, de ahí la importancia de que se haga el diagnóstico correcto de los tumores que sobreexpresen este receptor de membrana.

El Her 2 Neu, conocido también como ErbB2, es protooncogén localizado en el brazo grande del cromosoma 17, en la región 17q21.1. Codifica una glicoproteína de 185 kDa con actividad tirosina quinasa en su dominio intracitosólico (10).

## [Escriba el título del documento]

---

Se trata de un receptor para el factor de crecimiento de tipo epidérmico humano, que a la fecha no se le conocen ligandos por lo que se le considera un receptor huérfano (11-13).

Es clave para el crecimiento y la división normal de las células, por lo que su expresión anormal (sobrexpresión) está vinculada a procesos cancerosos principalmente en mama.

Este gen se sobreexpresa en aproximadamente 25-30% de las pacientes con cáncer de mama y está asociada a una incrementada actividad biológica del tumor, es decir; una tasa de división celular acelerada que permite mayor respuesta de la célula a los niveles normales de factores de crecimiento (14-16).

Actualmente la presencia o ausencia de Her 2 Neu se reporta en cruces en el reporte de inmunohistoquímica de la siguiente manera:

+	Negativo
++	Indeterminado
+++	Positivo o sobreexpresado

En el caso de presentar una cruz (negativo), no se indica tratamiento adicional, para casos donde es indeterminado (++) se necesita realizar estudios complementarios mediante biología molecular que se describen a continuación.

Existen diferentes técnicas para identificar la amplificación del gen HER 2 Neu; la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se considera el estándar de oro. Otras variantes de la técnica son la hibridación *in situ* cromogénica (CISH) y la hibridación *in situ* con plata (SISH), técnicas que pueden ser sencillas (basándose solamente en la detección de HER 2 Neu) o duales (basándose en la relación de HER 2 Neu y del centrómero del cromosoma 17) (17).



## [Escriba el título del documento]

---

Se pueden emplear las técnicas de CISH o SISH siempre y cuando se haya realizado un proceso de validación de las mismas en paralelo con la técnica de FISH y se haya demostrado una concordancia de al menos 95% entre la FISH y la otra metodología (18).

Criterios de interpretación de las reacciones de hibridación para HER 2 Neu:

Los siguientes lineamientos disminuyen la probabilidad de errores en la interpretación (19-22):

- En el corte del tumor con H-E se debe seleccionar la zona de carcinoma invasor; el estudio no se realizará en áreas de carcinoma in situ.
- Inicialmente se evalúa el control (incluido en el kit con el que se esté trabajando); si no es adecuado, se debe repetir la prueba.

- Se debe contar un mínimo de 20 células neoplásicas para SISH o CISH y 40 para FISH en al menos dos campos diferentes de carcinoma invasor.

Puntos de corte para FISH y SISH dual (23,24):

<b>Positivo</b>	Razón HER-2 Neu: CEP 17 > 2.2
<b>Indeterminado</b>	Razón HER-2 Neu :CEP 1.8-2.2 (en dos conteos)
<b>Negativo</b>	Razón HER-2 Neu: CEP 17 < 1.8

Puntos de corte para CISH sencilla (25):

<b>Positivo</b>	> 6 copias/núcleo
<b>Indeterminado</b>	De 4 a 6 copias/núcleo (en dos conteos)
<b>Negativo</b>	< 4 copias/núcleo

Finalmente si por inmunohistoquímica se determinan +++ para HER 2 Neu; no se necesitará de estudios de biología molecular y las pacientes serán candidatas a recibir la terapia blanco específica con trastuzumab por lo regular de manera trisemanal por un período de 9 meses aproximadamente.

En los casos donde se cuenta con receptores positivos para estrógenos; se inicia terapia con tamoxifeno o inhibidores de aromatasa hasta completar 5 años; aunque hay algunos estudios tratando de postergar este tratamiento hasta 10 años.

Toda la batería de tratamiento tiene como propósito aumentar el período libre de enfermedad; aunque no siempre es así; ya que de manera general se espera que los tumores triple negativos respondan bien al tratamiento adyuvante pero con el factor en contra de que al terminar la adyuvancia o neoadyuvancia según la etapa clínica inicial, no habrá más tratamiento por ofrecer, por lo que el riesgo de recaída es alto; aún más si se trata de pacientes jóvenes. Por otra parte los tumores luminales no responden adecuadamente a la quimioterapia, sin embargo la hormonoterapia es otra opción más de tratamiento como se mencionó anteriormente.

Para los tumores HER 2 Neu positivo, con el uso de terapias blanco se mejora el pronóstico.

Al completar los esquemas de tratamientos actuales en cada caso en particular, ya sea cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia blanco y hormonoterapia; se podrá determinar la evolución clínica de la enfermedad; se considera control de la misma al no demostrar ni por clínica ni por imagen presencia de ésta; cuando sucede lo contrario y se corrobora por imagen la presencia de tumor o por biopsia células tumorales, se habla de recaída si son 6 o más meses desde que se terminó el último tratamiento; será persistencia de enfermedad o progresión de la misma si el tiempo transcurrido a partir del término del tratamiento y el diagnóstico nuevamente de cáncer fue antes de 6 meses.

Gran parte de los tratamientos actuales y la respuesta a éstos como ya se mencionó; están directamente relacionados a la clasificación molecular del cáncer de mama, aunque hay muchos factores más (genéticos y epigenéticos) que influyen de manera no clara hasta el día de hoy.

De manera general se puede hablar que hasta en un 15% de las pacientes presentarán mala respuesta a los tratamientos o incluso progresión de la enfermedad; ya que existen interrelaciones moleculares parcialmente estudiadas y que pueden influir en la evolución clínica del cáncer de mama; como es el caso de la familia de genes *Notch* y su relación con HER 2 Neu; ya que tiene la particularidad de ser en algunos procesos biológicos un protooncogén, oncogén o gen supresor de tumor (26-29).

Existen múltiples reportes donde se demuestra la importancia de *Notch* no solo en su rol con la aparición de tumores o inhibiéndolos; sino también el papel que juegan desde el desarrollo u organogénesis hasta la aparición en patologías no oncológicas; mucho de lo cual se ha demostrado con modelos animales; incluso se ha planteado la hipótesis de la participación en enfermedades como esquizofrenia (30-32).

*Notch* ha sido ampliamente estudiado en padecimientos mieloproliferativos, donde se ha podido evaluar y entender las vías en las que actúa y cómo influye en este tipo de enfermedades siendo considerado un factor pronóstico determinante según

el tipo de leucemia. Hay reportes también sobre su influencia en otros tumores sólidos además del cáncer de mama como colon, páncreas, estómago, cérvix, entre otros (33-38).

Los componentes de la vía *Notch* están involucrados en una gran variedad de enfermedades humanas, siendo la más frecuente el cáncer. Entre las causas principales se encuentran la presencia de mutaciones, deleciones, translocaciones e inserciones virales en sus genes (39-45).

Esta familia de genes que consta de 4 variedades identificadas en el ser humano, tuvo sus estudios iniciales en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) donde las alteraciones en forma de “muesca” (que literalmente es lo que significa *Notch* al traducirse del inglés), fue lo que los investigadores notaron cuando este gen se encontraba alterado en este insecto.

El gen *Notch 1*, localizado en el brazo largo del cromosoma 9 (9q34.3), codifica una de las proteínas de la familia *Notch*, que incluye a proteínas transmembrana que comparten muchas características estructurales, incluyendo el dominio extracelular de múltiples factores de crecimiento epidérmicos (EGF), y un dominio intracelular.

El gen *Notch 2*, situado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p13-p11), codifica la proteína receptora *Notch 2*. El receptor *Notch 2* tiene cinco ligandos: Jagged-1 y 2, y Delta- 1, 3, y 4. Las mutaciones de *Notch 2* son causa conocida de síndrome de Alagille, aunado al ligando Jag 1 y también se relaciona a cardiopatías fundamentalmente con alteraciones valvulares (46,47). En conjunto, estas proteínas producen señales importantes para el desarrollo antes del nacimiento. Las señales desencadenadas por la interacción entre *Notch 2* y sus ligandos son importantes para el desarrollo de células destinadas a formar el corazón, hígado, riñón, dientes y otras estructuras en un embrión en crecimiento. Después del nacimiento, la señalización *Notch 2* está involucrada en la reparación tisular (48-50). Otra de las mutaciones en *Notch 2* que se han descrito, tienen relación con resistencia a quimioterapia en pacientes con cáncer gástrico (51-54).

*Notch 3*, ubicado en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.2-p.13.1) y constituido por un total de 33 exones que codifican un receptor de 2,321 aminoácidos con un único dominio transmembrana. Se han descrito más de 150 mutaciones en el gen *Notch 3*, responsables muchas de estas de la arteriopatía cerebral con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASYL). Casi todas estas mutaciones cambian un solo aminoácido en el receptor *Notch 3*. El aminoácido implicado en la mayoría de las mutaciones es la cisteína (55). La adición o eliminación de una molécula de cisteína en un área determinada del receptor *notch3*, conocido como el dominio de tipo EGF, presumiblemente afecta a la función del receptor *notch3* en células musculares lisas vasculares.

*Notch 4*, este gen es un receptor transmembrana que regula la diferenciación en todos los tipos de tejidos y organismos. Se localiza en el cromosoma 6p21.3. Se conoce poco acerca de las funciones de *Notch 4* en humanos, pero los estudios en animales demuestran que la familia de proteínas *Notch* tienen la función de determinar el destino celular. Hibridaciones in situ en ratones mostraron que *Notch 4* se expresa en células endoteliales y su transcripción se detecta en el sistema nervioso en desarrollo. Algunos autores han encontrado asociación entre este gen y el riesgo de esquizofrenia; sin embargo, este resultado no ha sido replicado por otros.

El gen humano *Notch 1* se detectó por primera vez en el subtipo de leucemia linfoblástica aguda de las células T de ahí que se le relaciona o se conoce a profundidad la relación *Notch* – leucemia; *Notch 3* es el segundo gen de esta familia en importancia desde el punto de vista oncológico; ya que ambos, *Notch 1* y *3* están inmersos en múltiples procesos del cáncer. Debido a estos antecedentes se han realizado asociaciones que muestran su participación en el proceso del cáncer de mama como lo describe Hirose y cols., 2010 (56).

Los estudios más recientes apuntan sus esfuerzos a intervenir en las vías de señalización de *Notch 1* y *3*, con arreglos de varios tipos de RNA; prospectos de vacunas con la ayuda de algunos virus (57); ya que al modificar la vía de *Notch* se espera impactar en el desarrollo de la enfermedad, en este caso el cáncer; con

muy buenos resultados in vitro (58-62). Dichos resultados se han extrapolado incluso para el fenotipo de los triple negativo en cáncer de mama que es uno de los más agresivos; y en este tipo de tumores hay mucho por estudiar pues se ha demostrado que hay relación entre p53 con *Notch 1* y su relación con la activación de receptores de queratinocitos que se manifiestan con gran actividad tumoral (63-66).

También se ha reportado de manera particular por Nina Santio y cols., que *notch 1* y *3* al presentar fosforilaciones en los residuos de serina 2152 ejercen o promueven migración de células tumorales en cáncer de mama y próstata; con lo cual la evolución o control de estas neoplasias se modifica radicalmente (67).

Por otra parte los ensayos in vitro con utilización de miRNA (micro RNA) y siRNA (RNA de interferencia) en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo modificando la vía de *Notch 1* y *Notch 3*, muestran alentadores resultados para en un futuro inmediato pasar a estudios en humanos (68-73); con la finalidad de encontrar resultados equiparables; aunque no hay que descartar que, la biología de los tumores puede variar ampliamente de las líneas celulares a individuos como tal.

En lo que respecta a tumores HER 2 Neu negativo; está demostrado en múltiples reportes de pacientes asiáticas que con la sobreexpresión de *Notch 1*, las recurrencias son más frecuentes (74-76), con lo cual al menos en esta variedad de tumores indiscutiblemente notch puede tomarse como un factor pronóstico o factor de riesgo (77-83).

Con todo lo anterior la relación de *Notch* con diversos cánceres en este caso mama y en específico con HER 2 Neu, representa una manera más de dilucidar las alteraciones presentes en esta neoplasia con lo cual se pretenden instaurar tratamientos dirigidos que repercutan en una mejor respuesta y control de la enfermedad al bloquear las vías específicas de estos genes (84-90); con lo cual se ha documentado mejor respuesta al tratamiento adyuvante con quimioterapia y radioterapia principalmente.

Aumentando finalmente la sobrevida libre de enfermedad, que es el propósito de todo tratamiento oncológico (91-97).

También se han hecho estudios con diversos paneles de múltiples oncogenes (incluyendo *Notch 1*) que plantean su uso como biomarcadores a futuro, en neoplasias como páncreas, mama, entre otras (98).

Es evidente que se puede contemplar a *Notch* como factor pronóstico o de riesgo si los resultados en el presente estudio resultan equiparables a los reportados en Asia, o cumplen con los requerimientos para ser considerado como tales tras el análisis estadístico correspondiente y determinando su relación con el curso o la evolución clínica de la enfermedad (control, recaída o persistencia).

También en Europa, España; el trabajo de Fernando Ortiz y cols., 2016; han reportado la relación entre *Notch 1* y cáncer de mama (tumores triple negativo o de alto riesgo) influyendo en la evolución clínica de esta neoplasia, determinado mediante la realización de PCR-tiempo real con lo que se demuestra que *Notch* puede contemplarse como factor determinante en el curso o desarrollo de esta enfermedad (99).

Por lo anterior hay que tener en cuenta la diferencia entre factores de riesgo y factores pronósticos. Los factores de riesgo son los que condicionan la probabilidad de presentar una enfermedad determinada (100-103). Dichos factores pueden estar presentes en población sana y aumentan el riesgo de tener la enfermedad. Los factores pronósticos son aquellos que predicen el curso clínico de un padecimiento una vez que la enfermedad esta presente (104-107).

Finalmente; no se tienen reportes de estudios acerca de la sobreexpresión de *Notch* en pacientes mexicanas con cáncer de mama; por lo cual esta investigación proveerá de información para posteriores comparaciones con lo reportado y poder determinar similitudes o nuevos hallazgos en la población mexicana.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El cáncer de mama en mujeres se ha convertido en los últimos años en uno de los principales problemas de salud tanto en países desarrollados como en desarrollo.

Existen múltiples tratamientos farmacológicos que presentan éxito según la etapa clínica de la enfermedad y de las características fenotípicas del tumor; pero la mayoría de dichos tratamientos conlleva también gran toxicidad hematológica y cardíaca, y en ocasiones con pobres resultados.

Desde hace varios años se ha vinculado al *gen Notch* en múltiples procesos neoplásicos, presentando una dualidad al interactuar como gen supresor de tumores y en otras ocasiones como oncogén.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:**

¿El pronóstico y curso clínico de las pacientes con cáncer de mama se relaciona con la expresión de *Notch 1 y 3*?

## **JUSTIFICACIÓN.**

Desde el 2012 el cáncer de mama ocupa el primer lugar en padecimientos oncológicos en mujeres a nivel mundial. Para la población mexicana esta patología se convirtió en la causa número uno de morbimortalidad superando al cáncer cervicouterino; con lo cual los diversos esquemas de tratamientos farmacológicos en el afán de controlar la enfermedad han ido en aumento y han ganado terreno al tratamiento quirúrgico pero en la mayoría de ellos los efectos indeseables son muy marcados y los resultados no siempre son los esperados, teniendo que recurrir en ocasiones a varias líneas de tratamiento.



Lo anterior tiene repercusión no solo en que se logra una pobre sobrevida de las pacientes sino también en que genera costos de atención muy altos que el sistema de salud tiene que absorber, generando problemas de insumos y abastos en muchas ocasiones.

Muestra de esto es lo reportado en el informe al ejecutivo federal y al congreso de la unión sobre la situación financiera y los riesgos del instituto mexicano del seguro social 2014-2015; donde se reporta que para el cáncer de mama se gastan 74,522 pesos por cada paciente para el tratamiento de esta enfermedad en etapa I; mientras que el costo se eleva a 199,522 pesos cuando la enfermedad es diagnosticada en etapa IV. Son montos considerables, sobre todo sabiendo que solo el 10 % de los pacientes del IMSS se les diagnostica en etapa I.

Y según cifras generales se reportan 3,567 millones de pesos en gastos para pacientes con cáncer de mama; que sin duda alguna pueden verse reducidas si se logran mejores tratamientos, los cuales van de la mano de un mejor conocimiento de la enfermedad.

Por otra parte y de manera particular, las estadísticas de nuestro hospital, indican que se atienden aproximadamente 1000 casos de cáncer de mama por año, con lo cual se vuelve un gran centro de concentración; corroborando el gran problema de salud nacional y mundial que representa esta enfermedad.

De ahí que en la búsqueda de nuevas y mejores alternativas de diagnóstico y tratamiento, el estudio a detalle de los tumores, desde el punto de vista genético y molecular, ha mostrado que existen alteraciones en las vías de señalización que pueden influir en la evolución de la enfermedad, recaída y en la respuesta a los tratamientos aplicados. Una de ellas es la sobreexpresión de *Notch 1* y *3* que se ha reportado en pacientes con tumores HER 2 Neu negativo que posteriormente al silenciar la vía de estos genes en diversos estudios in vitro, presentan mejores resultados en cuanto a la respuesta a los tratamientos adyuvantes convencionales y por tal en sobrevida; con lo cual el período libre de enfermedad tiende a ampliarse.

Por lo cual al realizar el estudio de la expresión del *gen Notch* en población mexicana para cáncer de mama, al no contar con ningún reporte al respecto; pretende corroborar si los resultados de poblaciones asiáticas y europeas son equiparables a los de México.

Finalmente se podría contemplar, de acuerdo a los resultados obtenidos de la expresión de *Notch 1 y 3*, si existe relación con el curso o la evolución clínica de las pacientes (respuesta al tratamiento, así como recaídas o persistencias) para proponerse como factor pronóstico en el cáncer de mama.

## **OBJETIVOS.**

### OBJETIVO GENERAL.

Determinar el pronóstico y curso clínico de las pacientes con cáncer de mama y expresión de *Notch 1 y 3*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la expresión de *Notch 1 y 3* en muestras de pacientes con cáncer de mama.
- Determinar la expresión de *Notch 1 y 3* en muestras de pacientes con tumores benignos de mama.
- Caracterizar las muestras de pacientes con cáncer de mama según el subtipo molecular.
- Obtener la razón de momios de los casos con recaída y persistencia de la enfermedad en relación a la expresión de *Notch 1 y 3*.

## **METODOLOGÍA**

Diseño del estudio.

Descriptivo: Se trabajó con los resultados encontrados por inmunohistoquímica en muestras de pacientes para determinar expresión de *Notch 1* y *3*.

-Analítico: Según los resultados obtenidos se comparó, analizo y relaciono con base a lo reportado en estudios previos para determinar similitudes y diferencias.

Casos y controles: Se contemplaron las muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y expresión de *Notch 1* y *3* como casos; teniendo como controles las muestras de pacientes de tumores benignos de mama.

Retrospectivo: Se obtuvo la información de muestras de pacientes que ya fueron tratadas por cáncer de mama y de su evolución según el expediente correspondiente.

Ubicación y temporalidad del estudio.

Se llevó a cabo en el hospital de gineco obstetricia No. 3, en el departamento de y patología y oncología quirúrgica; del CMN La Raza del IMSS, México DF. Una vez aprobado por el comité de ética correspondiente; se inició del estudio el mes de febrero del 2017.

## **CRITERIOS DE SELECCIÓN.**

Criterios de inclusión grupo de casos:

## [Escriba el título del documento]

---

- Muestras de pacientes con cáncer de mama invasor (ductal o lobulillar) incluidas en parafina del 2010 al 2015 que expresen *Notch 1 y 3*.
- Que cada caso contara con expediente clínico vigente y completo para la generación de la base de datos.

Criterios de inclusión del grupo control:

- Muestras de pacientes con tumores benignos de mama incluidas en parafina del 2010 al 2015.
- Que cada caso contara con expediente clínico vigente y completo para la generación de la base de datos.

Criterios de no inclusión (para los casos y controles):

- Que no se contara con expediente clínico para poder determinar la evolución de la enfermedad.
- Muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama in situ, metastásico, que hayan recibido quimioterapia o radioterapia previo al diagnóstico inicial; o que cuenten con diagnóstico de doble primario.
- Muestras de pacientes contenidas en parafina que no sean aptas para procesar.

**VARIABLES**

**Cuadro 3. Operacionalización de variables.**

VARIABLES INDEPENDIENTES	CONCEPTUALIZACIÓN	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR OPERACIONAL	PRUEBA ESTADÍSTICA
Expresión de <i>Notch 1</i> y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama.	Presencia del gen <i>Notch 1</i> y 3 en la muestra de cáncer de mama contenida en parafina.	Nominal, dicotómica	Cualitativa	Inmunohistoquímica (+/-).	-Medidas de tendencia central. -Razón de momios.
Muestras de cáncer de mama según clasificación molecular.	Tipo de cáncer de mama según receptores de estrógenos, progesterona y expresión del gen HER 2 Neu.	Nominal, policotómica	Cualitativa	- Luminal A - Luminal B - HER 2 Neu - Triple negativo	-Medidas de tendencia central. -ANOVA.

VARIABLES DEPENDIENTES	CONCEPTUALIZACIÓN	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR OPERACIONAL	PRUEBA ESTADÍSTICA
Recaída de la enfermedad	Presencia de la neoplasia de manera local o a distancia tras 6 meses (mínimo) de período libre de enfermedad o haber terminado tratamiento; diagnosticada por clínica/biopsia o estudio de imagen	Nominal, dicotómica.	Cualitativa	-Biopsia o por estudio de imagen	-Medidas de tendencia central. -Razón de momios

[Escriba el título del documento]

Persistencia de la enfermedad	Presencia de la neoplasia de manera local o a distancia antes de 6 meses de período libre de enfermedad o haber terminado tratamiento; diagnosticada por clínica/biopsia o estudio de imagen	Nominal, dicotómica	Cualitativa	-Biopsia o por estudio de imagen	-Medidas de tendencia central. -Razón de momios
-------------------------------	--	---------------------	-------------	----------------------------------	--

**MUESTRA.**

**TIPO DE MUESTREO.**

No probabilístico, por conveniencia.

**TAMAÑO DE LA MUESTRA.**

Inicialmente se hizo el cálculo de la N con una formula del programa epi-info para casos y controles pero debido a los insumos que se utilizaron para este proyecto se recalculó el tamaño de la muestra con fórmula ANOVA, según el programa STATISTICS versión 10.1; contemplando un tamaño del efecto de 0.2 y considerando 5 grupos de comparación por las características y objetivos del estudio (4 grupos de tumores según subtipo molecular del cáncer de mama y 1 grupo control), potencia de 80%; significancia del 95% y error alfa de 0.05 (ver cuadro x). Obteniendo una  $n$  de 120.

Debido al tipo de muestreo no se contempló ajuste por pérdidas.

Sample Size Calculation (Spreadsheet1) ANOVA, 1-Way Random Effects	
	Value
Number of Groups	5.0000
RMSSE	0.2000
Noncentrality Parameter (Delta)	1.6000
Type I Error Rate (Alpha)	0.0500
Power Goal	0.8000
Actual Power for Required N	0.8004
Required Sample Size (N)	120.0000

Cuadro 4. Cálculo de tamaño de muestra.

## DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO.

Inicialmente se accedió al archivo digital de cada paciente que se encontraba registrada en el periodo de tiempo contemplado por el estudio, es decir del 2010 al 2015, se determinaron datos como la edad, etapa patológica, histología así como el tipo molecular de cáncer de mama, que influyeron en el tratamiento en cada caso; y fundamentalmente se conoció el seguimiento y evolución clínica para determinar si hubo recaída o persistencia de la enfermedad.

Se concentraron los datos en una base para el posterior análisis.

Una vez seleccionados los expedientes y que cumplieron con los criterios de inclusión, se obtuvieron las muestras en parafina del servicio de patología del hospital de gineco obstetricia No.3 del CMN La Raza a las cuales se les realizaron pruebas de inmunohistoquímica y PCR en tiempo real.

Técnica de inmunohistoquímica: A los bloques de parafina se les hicieron cortes con microtomo para fijación a laminillas, seguido de bloqueo de peroxidasas para finalmente con la utilización del anticuerpo para *Notch 1* (Santa Cruz C-20) y *Notch 3* (Sigma Aldrich), determinar la expresión de los respectivos genes en las muestras analizadas.

La interpretación de la inmunohistoquímica se hizo mediante microscopio de campo claro con la asignación relativa en porcentaje de al menos tres campos de cada laminilla evaluada.

PCR en tiempo real: se realizó la obtención de RNA mediante técnicas de desparafinación según el manual RNeasy FFPE (QIAGEN). Las sondas TaqMan (MGB) usadas en este estudio fueron para el gen *Notch 1* ID Hs01062014\_m1, *Notch 3* ID Hs01128537\_m1 y como control interno el gen 18s ribosomal ID\_Hs99999901\_s1 (Applied Biosystem). Para la realización de la PCR en tiempo real en un solo paso (cDNA y PCR tiempo real) se utilizó el reactivo AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Life Technologies, CA, EE.UU.) y para cada muestra se aplicó en un volumen final de reacción en 25µL. Se incluyeron controles de no templado (NTC) y controles positivos (PC) en cada una de las placas analizadas. Todas las reacciones fueron colocadas en hielo hasta el análisis en el equipo correspondiente. Las placas se analizaron en un sistema de PCR en tiempo real 7500-Fast HT (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). Las condiciones de ciclaje fueron las indicadas en el kit AgPath y son las siguientes 45°C 10 minutos, 95°C 10 minutos, y 40 ciclos de 95°C por segundos, y 60°C 45 segundos. Los datos fueron adquiridos y analizados utilizando el software SDS 2.4 (Applied Biosystems, CA, EE.UU). El umbral se fijó manualmente (un nivel que estaba por encima de la línea de base y fue fijado para estar dentro de la región de incremento exponencial de la curva de amplificación) y la línea de base se ajustó automáticamente. La cuantificación absoluta se realizó de acuerdo a la curva estándar que incluyó 5 órdenes de magnitud y también se realizó el análisis de cuantificación relativa por el método del  $\Delta\Delta C_T$ .

De manera inicial se habían propuesto dos grupos de trabajo, el primero conformado por muestras de cáncer de mama que expresan los genes de interés, el segundo estaría conformado por las muestras que no expresaran dichos genes; sin embargo durante la realización del proyecto se encontró que todos los casos con cáncer expresaban los genes *Notch 1* y *3* por lo cual se decidió



incluir como grupo control casos con tumores benignos de mama. Quedando de la siguiente forma la distribución:

2 grupos de trabajo.

- Casos: muestras de cáncer de mama que expresaron *Notch 1* y *3*.
- Controles: tumores benignos con expresión de *Notch 1* y *3*.

Al grupo de casos se subdividió según la clasificación molecular del cáncer de mama (luminal A, luminal B, HER 2 Neu y triple negativo).

Finalmente se realizaron las tablas de contingencia para determinar razón de momios entre los casos con expresión de *Notch 1* y *3* contra los casos que presentaron persistencia y recaída de la enfermedad.

Con toda la información colectada se procedió al análisis estadístico correspondiente.

### **PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Con base a los objetivos y obtención de datos del presente estudio se plantea utilización de estadística descriptiva mediante medidas de tendencia central (media, mediana y moda).

Por otra parte también se hizo uso de estadística analítica al realizar correlación de las variables en todos los subtipos moleculares en estudio mediante ANOVA para las variables cuantitativas comparando medias.

**PROCESAMIENTO DE DATOS.**

El análisis de los datos se hizo mediante SPSS versión 19.0.0

**INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.**

Se recolectaron los datos en una hoja de captura aplicable a cada uno de los grupos de trabajo.

## ASPECTOS ÉTICOS.

1. El investigador garantizó que este estudio tiene apego a la legislación y reglamentación de la Ley General de salud en materia de Investigación para la Salud.
2. De acuerdo al de acuerdo al reglamento de la ley general de salud en materia de investigación este estudio se consideró sin riesgo (artículo 17) ya que se llevó a cabo en muestras de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama (artículo 59); por lo cual no ameritó carta de consentimiento informado.
3. Los procedimientos de este estudio se apegaron a las normas éticas, al reglamento de la ley general de salud en materia de investigación y se llevó a cabo en plena conformidad con los siguientes principios de la declaración de Helsinki (enmiendas en Tokio, Venecia, Hong Kong, Sudáfrica y Brasil 2013) donde el investigador garantizó que:
  - a. Se realizó una búsqueda minuciosa de la literatura científica sobre el tema a realizar.
  - b. Este protocolo fue sometido a evaluación por el comité local de investigación y ética en investigación en salud 1905 del instituto mexicano del seguro social.
  - c. Este protocolo fue realizado por personas científicamente calificadas y bajo la supervisión de un equipo de médicos clínicamente competentes y certificados en su especialidad.

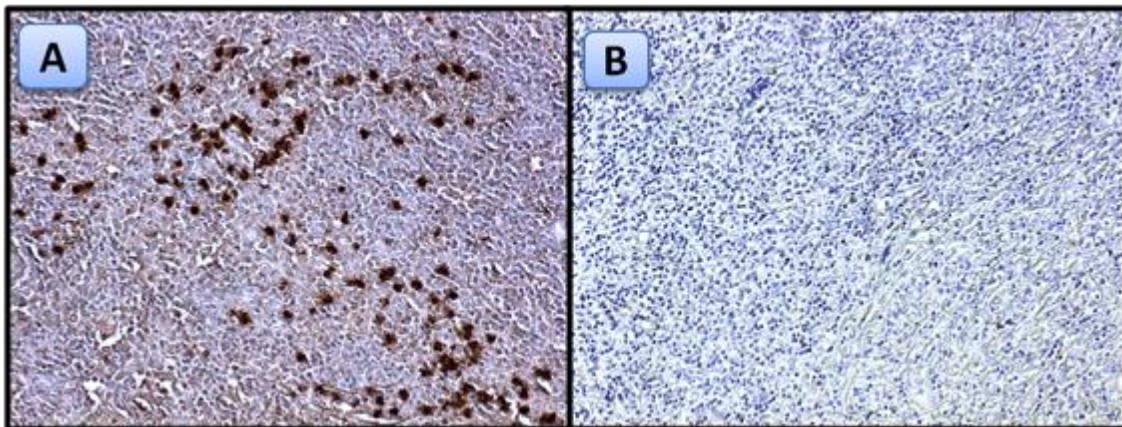
## RESULTADOS.

Se analizaron en total 120 muestras de pacientes en este estudio (98 con diagnóstico de cáncer de mama y 22 por tumores benignos); en el cuadro 5 se resumen las características con base a frecuencia y según la clasificación molecular del cáncer de mama.

<u>TUMOR</u>	<u>FRECUENCIA</u>
BENIGNO (TB)	22
LUMINAL A (LA)	28
LUMINAL B (LB)	22
HER 2 NEU (H2)	24
TRIPLE NEGATIVO (TN)	24

**Cuadro 5. Tipo de tumor y frecuencia.**

En lo que respecta a la inmunohistoquímica de *Notch 1* y *3* en las neoplasias, inicialmente se utilizó como control positivo para *Notch 1* el linfoma de Hodgkin mostrando expresión positiva en células de Reed Sternberg (figura 1), mientras que para el gen *Notch 3* el control fue adenocarcinoma de pulmón (figura 2). Las micrografías muestran las proteínas producto de la expresión de estos genes con su correspondiente control negativo (figura 1B y 2B).



**Figura 1. Inmunohistoquímica de linfoma de Hodgkin como control positivo para *Notch1*. A) Células de Reed Sternberg positivas para *Notch 1*. B) Linfoma de Hodgkin sin anticuerpo (Control negativo). 20X**

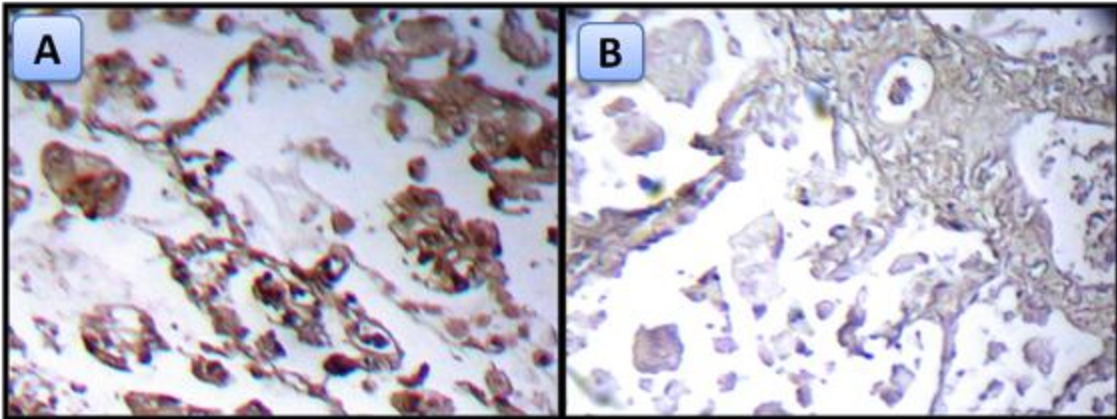


Figura 2. Inmunohistoquímica de Adenocarcinoma de pulmón como control positivo para *Notch 3*. A) Células positivas para *Notch 3*. B) Control negativo. 20X

Lo correspondiente a la inmunohistoquímica del grupo de tumores benignos (TB) se muestra en la figura 3, que indica el gen expresado del lado izquierdo, el control negativo del lado derecho así como la tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) con las características morfológicas del tumor.

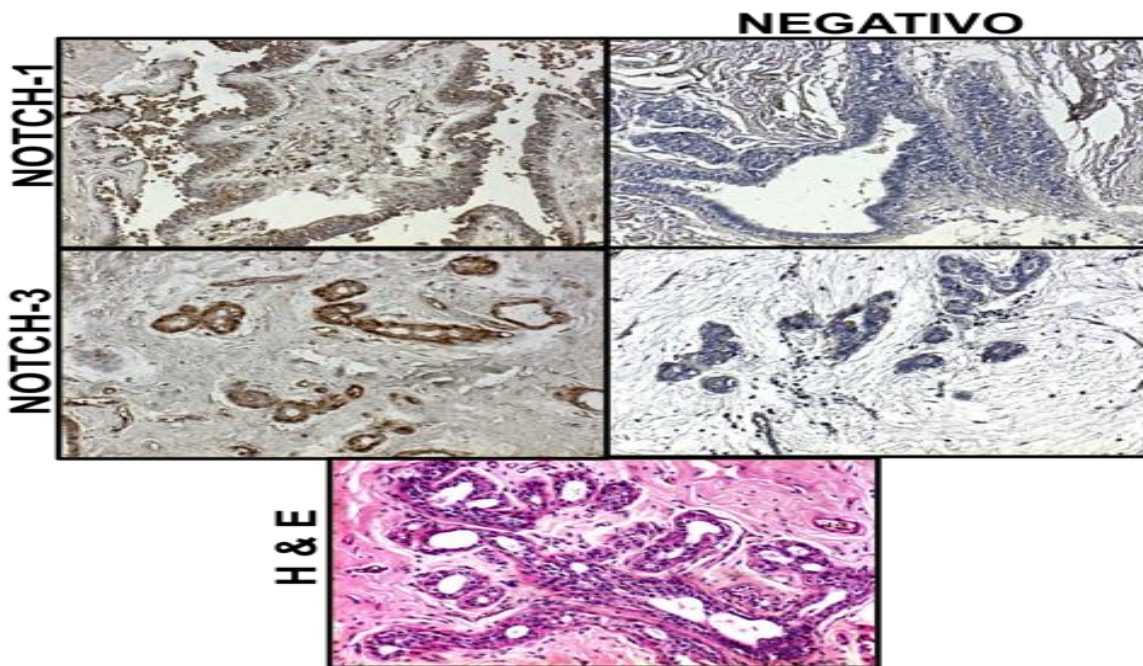
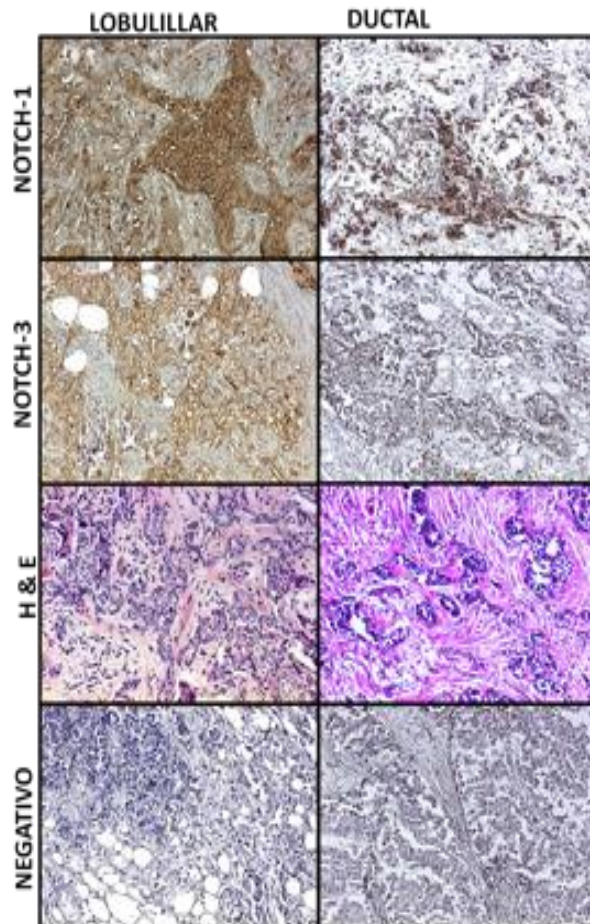


Figura 3. Inmunohistoquímica para *Notch 1* y *3* en muestras de pacientes con tumores benignos. 20X

Como parte de los objetivos del estudio era dividir los casos con cáncer de mama con base a la clasificación molecular, a continuación se muestran los hallazgos correspondientes.

En la figura 4 se muestra del lado izquierdo el tipo histológico lobulillar y del lado derecho el tipo ductal (únicos tipos histológicos considerados en los criterios de inclusión) para los casos Luminales A. También en esta figura se incluyen las micrografías de la tinción de H&E y los controles negativos.



**Figura 4. Inmunohistoquímica para *Notch1* y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama Luminal A. 20X**

En la figura 5 se muestra la inmunohistoquímica para *Notch1* y 3 para el grupo de cáncer de mama Luminal B, sus respectivos controles negativos y los tipos histológicos ductal y lobulillar. Se incluyen las imágenes de la H&E.

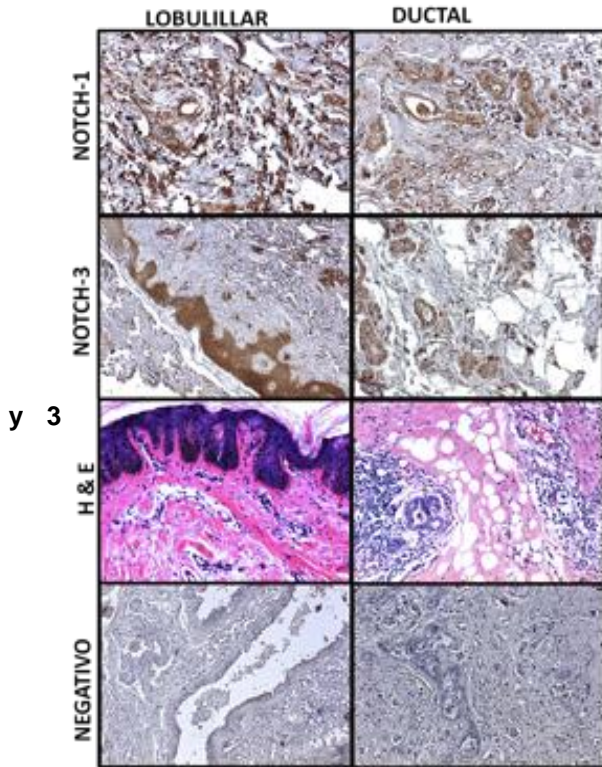
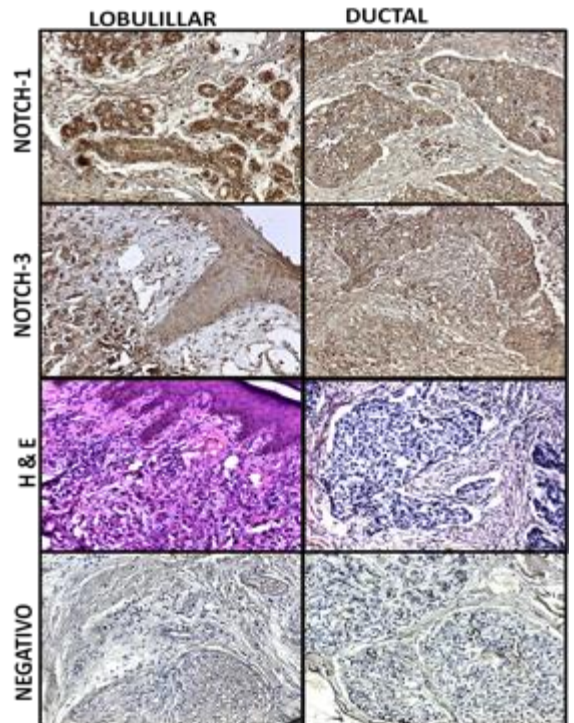


Figura 5. Inmunohistoquímica para *Notch1* en muestras de pacientes con cáncer de mama Luminal B. 20X

Figura 6. Inmunohistoquímica para *Notch1* y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama HER 2 Neu. 20X



En la figura 6 se observa la inmunohistoquímica para *Notch 1* y 3 para el grupo de cáncer de mama HER 2 Neu con sus respectivos controles negativos y los tipos histológicos ductal y lobulillar. Se incluyen las imágenes de la H&E.

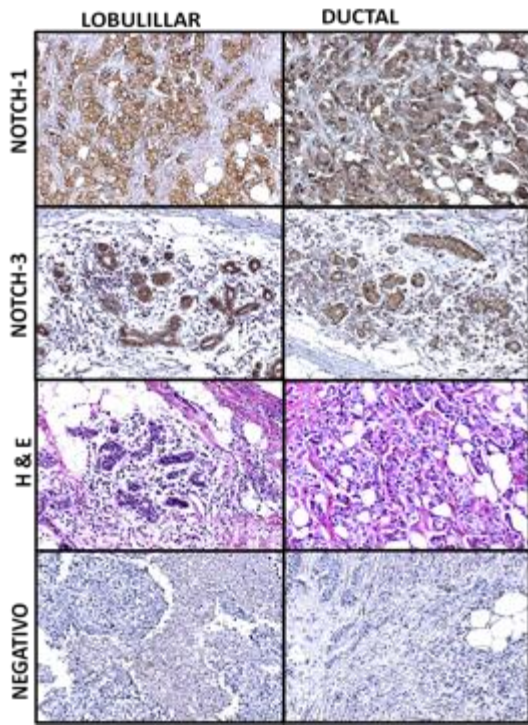


Figura 7. Inmunohistoquímica para *Notch1* y 3 en muestras de pacientes con cáncer de mama Triple Negativo. 20X

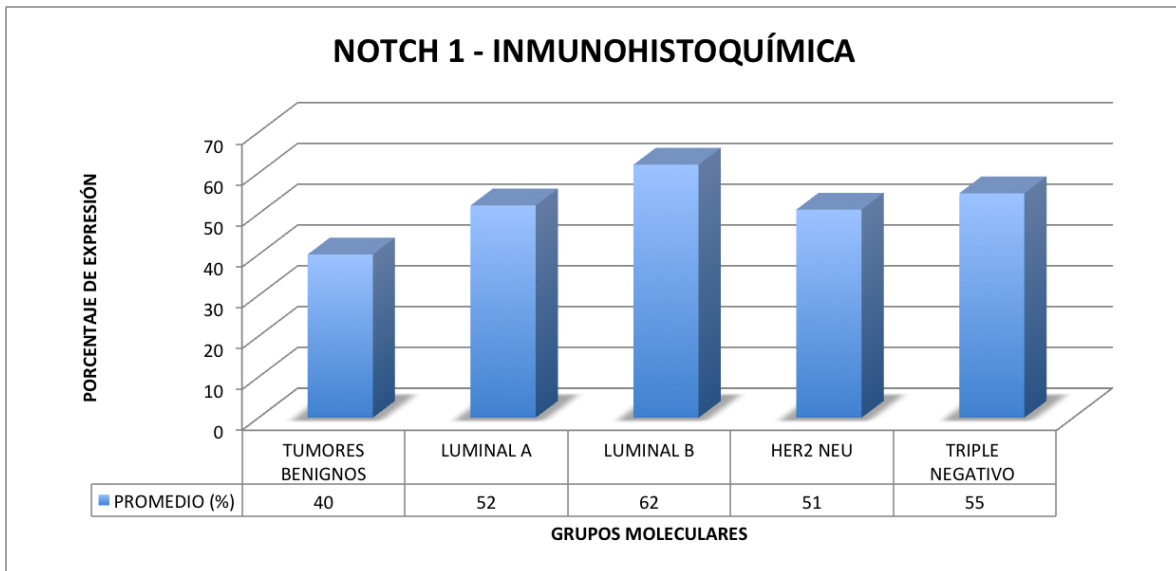
En la figura 7 se muestra la inmunohistoquímica para *Notch 1* y 3 para el grupo de cáncer de mama Triple Negativo, con sus respectivos controles negativos y los tipos histológicos ductal y lobulillar. Se incluyen las imágenes de la H&E.

De acuerdo a la expresión encontrada en la inmunohistoquímica de cada una de las muestras procesadas de los diferentes grupos, se realizó el análisis de la expresión de *Notch 1* y 3 por microscopía de campo claro (Zeiss modelo 473028) y de acuerdo al área del tejido (100%) se determinó el porcentaje de positividad del mismo (se analizaron como mínimo 3 campos). Este porcentaje se graficó



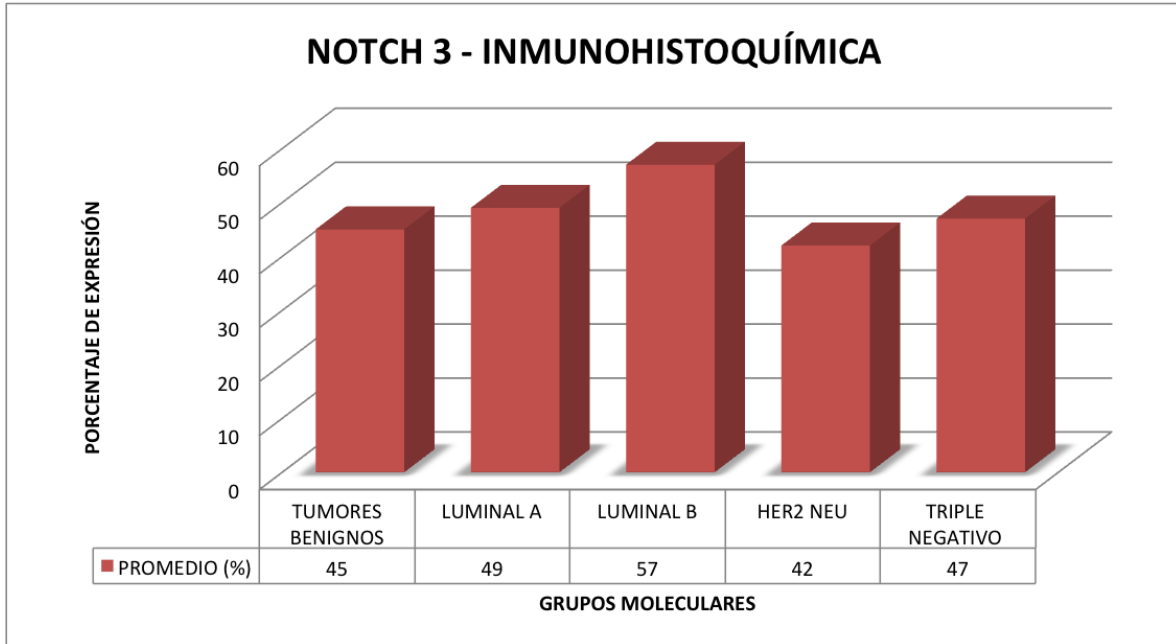
para visualizar de forma rápida la expresión de cada caso y grupo con la finalidad de identificar una tendencia que permitiera justificar un análisis de imagen de cada campo observado.

En el gráfico 1 se observan los promedios de expresión de cada uno de los grupos estudiados para *Notch 1* y en el gráfico 2 para *Notch 3*.



**Gráfico 1. Promedio de expresión por IHQ de cada uno de los grupos para *Notch 1*.**

En el gráfico 1, se observó diferencia estadísticamente significativa tras aplicar ANOVA y comparar 5 medias de los grupos correspondientes; dicha diferencia se encontró entre el grupo de tumores benignos y el grupo Luminal B ( $F=19.07$ ,  $gl=4$ ,  $gl2=115$ ,  $p=0.01$ ); con prueba post hoc de Tukey y T2 de Tamhane.



**Gráfico 2. Promedio de expresión por IHQ de cada uno de los grupos para Notch 3.**

Para el caso de la inmunohistoquímica en *Notch 3* como se representa en el gráfico 2, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

### **Resultados de PCR en tiempo real:**

#### **Cuantificación de la expresión del gen *Notch 1* y *3* por PCR tiempo real.**

Para el análisis de expresión cuantitativa del gen *Notch 1* y *3* se realizó PCR en tiempo real, dentro del procedimiento de esta técnica se requiere realizar la estandarización y la utilización de controles que permitan validar la misma, para lo cual se utilizó RNA proveniente de la línea celular MCF7 que es deriva de cáncer de mama. Ver figura 8 y 9.

Así mismo se requirió evaluar la expresión de un gen de referencia o también llamado constitutivo, seleccionando 18s ribosomal para tal efecto y para ambos genes de interés (*Notch 1* y 3). Este gen se expresó en todas las muestras, lo que valida la presencia de RNA en las mismas.

Las curvas de expresión de 5 órdenes de magnitud están representadas en la figura 8 para el gen *Notch 1* y en la figura 9 para *Notch 3*.

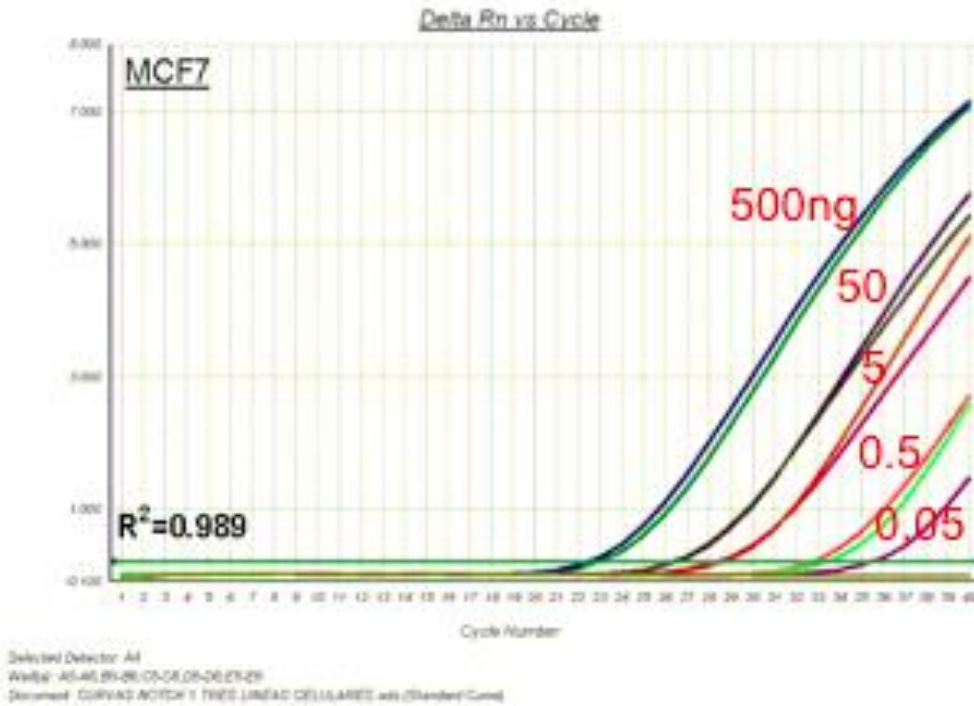
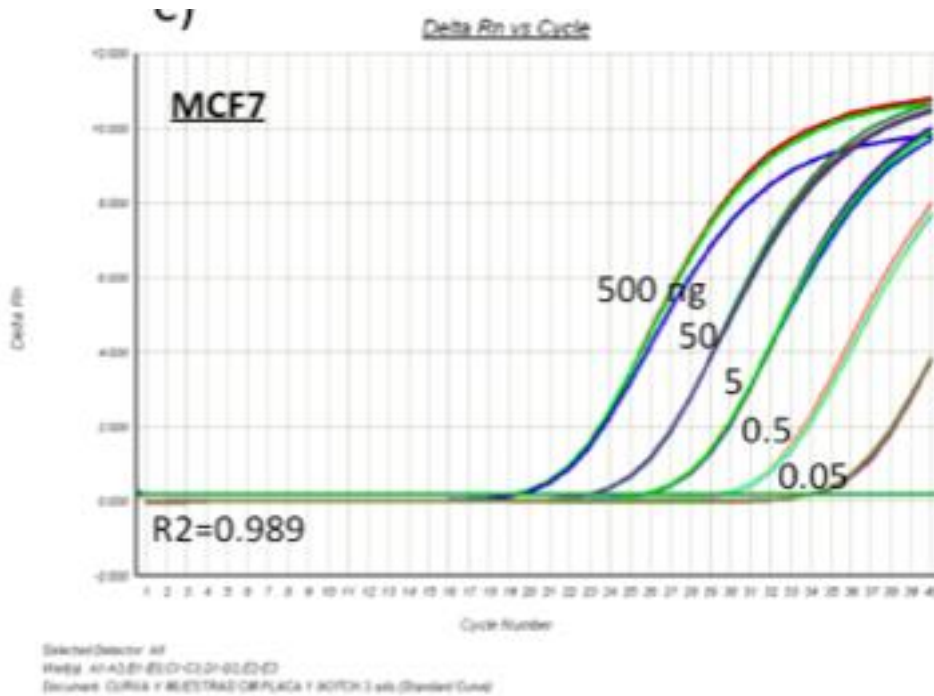


Figura 8. PCR en tiempo real para *Notch 1* en línea celular MCF7.



**Figura 9. PCR en tiempo real para *Notch 3* en línea celular MCF7.**

Una vez elegida la curva estándar (MCF7) con la expresión de los genes de interés, se realizó la cuantificación de las 120 muestras por triplicado, además éstas fueron distribuidas de acuerdo a la clasificación molecular del cáncer de mama (casos) y un grupo de tumores benignos (controles) conformando los grupos como se describió previamente.

Todas las muestras pudieron ser cuantificadas, en algunas dicha cuantificación fue mayor y en otras menor, sin embargo para conocer la cantidad real de cada muestra se calculó el promedio y desviación estándar de cada una de éstas y el análisis se realizó inicialmente por grupos moleculares; después de forma individual, posteriormente se hizo la comparación con los datos obtenidos en PCR tiempo real y de seguimiento clínico.

**Análisis de la expresión del gen *Notch 1* y *3*, comparación entre grupos.**

Para el análisis de datos de PCR tiempo real, inicialmente se realizó la eficiencia de las curvas con referencia al gen constitutivo (18s) y el gen de interés (*Notch 1* y *3*).

Utilizando la cuantificación relativa con el método comparativo del  $C_T$ , en el cual el grupo de tumores benignos (TB) fue utilizado como calibrador y comparándolo en relación a los grupos LA, LB, TN y H2, se calculó el  $\Delta\Delta C_T$ , normalizando con el gen 18s (control endógeno) para ambos genes *Notch 1* y *3*. Los resultados están indicados en el cuadro 6, donde se observó una diferencia significativa en el grupo MH con respecto al grupo calibrador y al resto de los grupos; esto se observó tanto para *Notch 1* como para *Notch 3*.

**Cuadro 6. Cuantificación relativa usando el método comparativo  $C_T$ .**

Grupo	Promedio $C_T$ NOTCH 1	Promedio $C_T$ 18S	$\Delta C_T$ NOTCH1-18S	$\Delta\Delta C_T$ (BM)	NOTCH 1 en relación a *BM ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )
TB*	33.3±0.4	24.1±0.2	9.2±0.4	0.0±0.4	1.0
LA	31.6±0.3	25.6±0.2	6.0±0.4	3.2±0.4	9.0
LB	30.3±0.2	24.2±0.3	6.1±0.3	3.1±0.3	8.7
H2	30.4±0.2	26.3±0.2	4.1±0.2	5.0±0.2	<b>33.1</b>
TN	30.7±0.3	25.1±0.2	5.7±0.3	3.5±0.3	11.5

Grupo	Promedio $C_T$ NOTCH3	Promedio $C_T$ 18S	$\Delta C_T$ NOTCH3-18S	$\Delta\Delta C_T$ (BM)	NOTCH 3 en relación a *BM ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ )
TB*	27.9±0.4	24.1±0.2	3.9±0.2	0.0±0.2	1.00
LA	27.3±0.3	25.6±0.2	1.8±0.2	2.1±0.4	4.29
LB	27.1±0.2	24.2±0.3	2.9±0.3	0.9±0.3	1.91
H2	25.9±0.2	26.3±0.2	-0.3±0.2	4.2±0.2	<b>18.52</b>
TN	27.3±0.4	25.1±0.2	2.2±0.3	1.6±0.3	3.11

\* Tumor benigno: Grupo que se denominó calibrador para el cálculo y se comparó con cada uno de los grupos.

Lo anterior se puede observar en el gráfico 3 para *Notch 1* y para *Notch 3* en el gráfico 4.

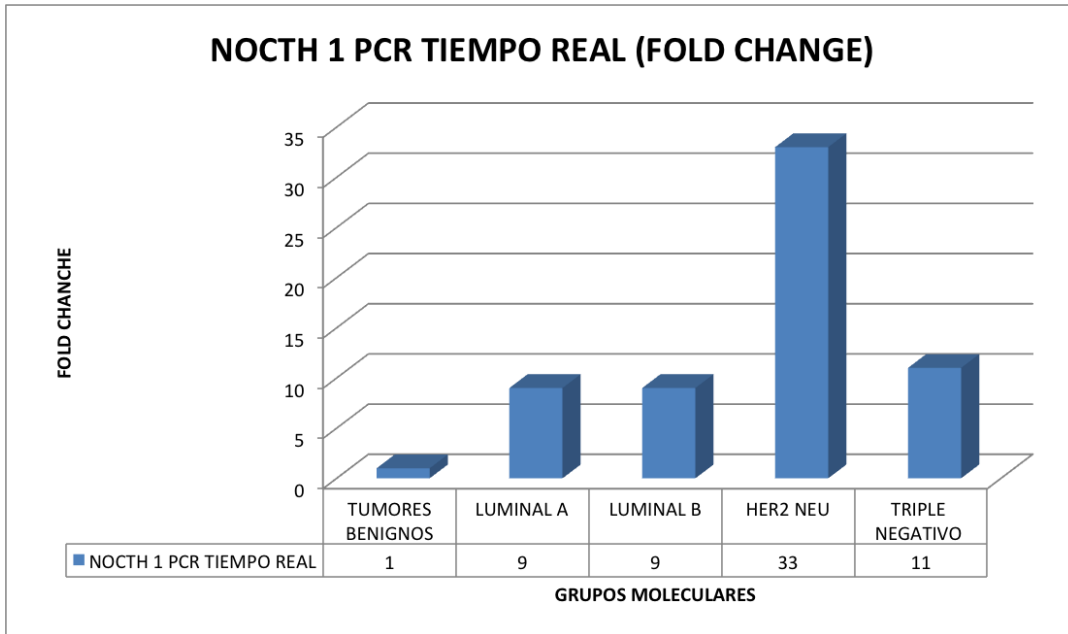


Gráfico 3. “Fold Change” de cada tipo molecular de Ca de mama con respecto al grupo calibrador (TM), para *Notch 1*.

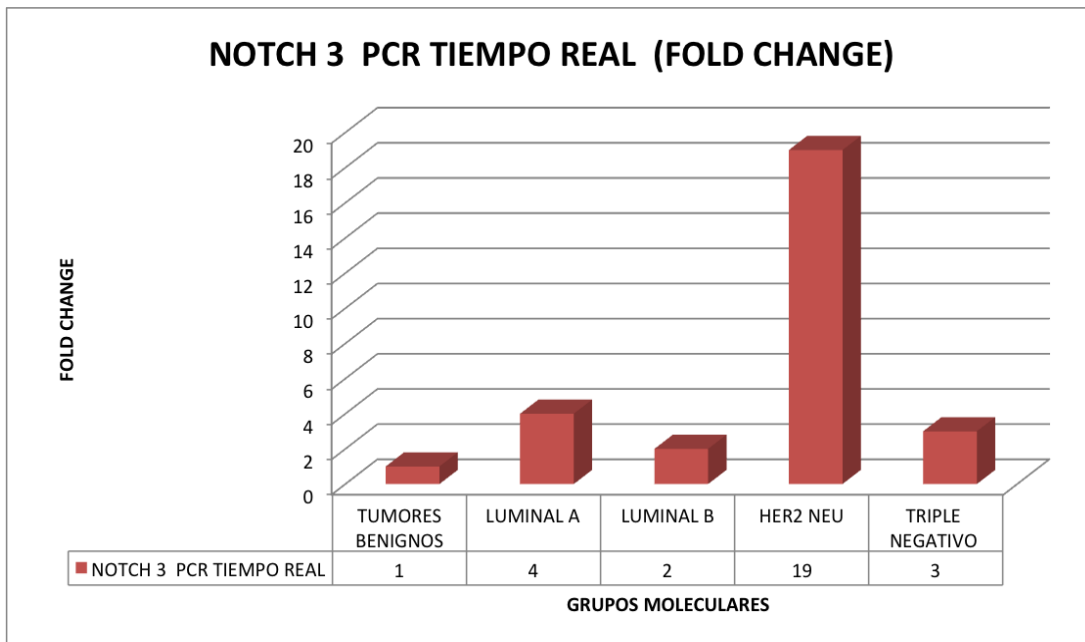


Gráfico 4. “Fold Change” de cada tipo molecular de Ca de mama con respecto al grupo calibrador (TM), para *Notch 3*.

**PRONÓSTICO Y CURSO CLÍNICO: Recaída y persistencia.**

En el análisis de los casos de recaída y persistencia que corresponden al rubro de evolución clínica de la enfermedad, se obtuvieron los siguientes datos en cada grupo de la clasificación molecular.

Se compararon con el porcentaje de expresión por inmunohistoquímica para *Notch* 1 y 3 en cada grupo; y por  $\Delta C_T$  en PCR tiempo real.

**Cuadro 7. Casos de recaída y persistencia en Luminal A (LA).**

Código de muestra	Tipo histológico D=Ductal L=Lobulillar	IHQ %		PCR tiempo real		Recaída	Persistencia
		NOTCH 1	NOTCH 3	NOTCH 1	NOTCH 3		
				$\Delta C_T$ NOTCH1-18s	$\Delta C_T$ NOTCH3-18S		
LA 6787	D	50	40	6.2	-21	X	

**Cuadro 8. Casos de recaída y persistencia en Luminal B (LB).**

Código de muestra	Tipo histológico D=Ductal L=Lobulillar	IHQ %		PCR tiempo real		Recaída	Persistencia
		NOTCH 1	NOTCH 3	NOTCH1	NOTCH 3		
				$\Delta C_T$ NOTC1-18s	$\Delta C_T$ NOTCH3-18S		
LB 3162	L	40	50	5.3	2.84	X	
LB 4924	D	60	60	6.0	3.87	X	
LB 688	L	70	40	-2.9	-0.90	X	
LB 3741	D	80	80	8.9	3.52	X	
LB 4226	D	80	80	5.0	0.03		X
LB 689	L	70	80	9.0	2.78		X

**Cuadro 9. Casos de recaída y persistencia en Her 2 neu (H2).**

Código de muestra	Tipo histológico D=Ductal L=Lobulillar	IHQ %		PCR tiempo real		Recaída	Persistencia
		Notch 1	Notch3	Notch1	Notch3		
				$\Delta C_T$ NOTCH1-18s	$\Delta C_T$ NOTCH3-18S		
H2 2925	D	50	50	3.7	-2.2	X	
H2 3590	L	40	50	3.2	-3.0	X	
H2 7510	D	50	30	5.1	1.3	X	
H2 037	D	70	70	1.6	-3.1		X
H2 2650	D	50	0	-1.2	-7.7		X
H2 3578	D	50	60	3.4	4.4		X
H2 7347	L	20	30	10.6	9.2		X

**Cuadro 10. Casos de recaída y persistencia en Triple Negativo (TN).**

Código de muestra	Tipo histológico D=Ductal L=Lobulillar	IHQ %		PCR tiempo real		Recaída	Persistencia
		NOTCH 1	NOTCH 3	NOTCH 1	NOTCH 3		
				$\Delta C_T$ NOTCH1-18s	$\Delta C_T$ NOTCH3-18S		
TN 2363	D	80	70	-1.5	-1.1	X	
TN 5855	D	60	50	1.3	-2.0	X	
TN 6737	D	0	10	8.2	1.3	X	
TN 768	L	70	50	5.2	2.1	X	
TN 857	D	70	40	0.8	4.5	X	
TN 9101	D	50	40	7.7	4.6		X

Destacaron el grupo de los de HER 2 Neu y Triple Negativo que presentaron más alto índice de recaída y persistencia como se puede apreciar en los cuadros 9 y 10 respectivamente.

No se encontró significancia estadística tras haber realizado tablas de contingencia por lo cual la razón de momios tampoco tuvo relevancia.



## **DISCUSIÓN.**

El cáncer de mama desde hace varios años es considerado una enfermedad sistémica por la manera tan compleja y diversa con que se ha manifestado, de manera clínica y molecular. Cada vez se presentan más casos triple negativo en mujeres jóvenes con el pronóstico inherente a este subtipo molecular, también se han realizado más estudios con nuevos fármacos pero con resultados pobres en sobrevida o periodo libre de enfermedad. En los últimos tiempos se han identificado casos que debutan de manera atípica sin afección o tumor en mama. Todo esto sustenta el hecho de que esta enfermedad es totalmente diversa y pareciera ser cada vez más agresiva, cambiante y por lo tanto más difícil de controlar.

Por lo anterior el conocer más sobre las vías de señalización que se encuentran involucradas en el cáncer y no solo para el cáncer de mama, podrá predecir su comportamiento y evolución lo cual se verá reflejado en el desarrollo de mejoras en los esquemas terapéuticos aumentando la sobrevida. Un ejemplo de lo anterior es el presente trabajo que tiene como objetivo principal analizar la expresión de *Notch 1* y *Notch 3* y su posible asociación con la evolución clínica del cáncer de mama. Es importante recalcar que existen pocos reportes sobre esta asociación y que la mayoría se han realizado en poblaciones diferentes a la mexicana que posee una gran heterogeneidad genética, y que además en su mayoría se han realizado en modelos experimentales como son cultivos celulares y animales de experimentación.

Los resultados observados en nuestra población se apegan a lo reportado en la literatura en cuanto al tipo histológico más frecuente, es decir el carcinoma ductal y lobulillar respectivamente. También se observó que no hubo diferencia en la recaída y persistencia asociada al tipo histológico como lo muestran nuestros resultados y la literatura.

El análisis de la expresión de *Notch 1* y *Notch 3* por inmunohistoquímica en microscopio de campo claro, mostró un comportamiento heterogéneo de la expresión entre las muestras del mismo grupo. En un esfuerzo por realizar un análisis cuantitativo en los diferentes grupos moleculares de cáncer de mama y en tumores benignos por IHQ se obtuvo el promedio de los porcentajes de expresión de cada grupo y se realizaron pruebas estadísticas (ANOVA), encontrando significancia estadística únicamente para *Notch 1* entre el grupo de tumores benignos con el grupo Luminal B no así para *Notch 3*. Lo anterior puede tener relación con que el grupo Luminal B en una de sus variantes incluye también la sobreexpresión de HER 2 Neu.

Está claro que se tiene que realizar otro tipo de análisis que permita demostrar si estadísticamente existe alguna diferencia en la expresión de los genes de interés; como por ejemplo el análisis de densidad óptica integrada.

Es importante señalar que opuesto a lo que se pensaba, se identificó expresión en los tumores benignos; lo cual indica que existe una expresión basal en el tejido tumoral “per se”. Este trabajo abre la necesidad de realizar la cuantificación de los genes en estudio en tejido mamario sin alteración, que permita discriminar una sobreexpresión.

Por otra parte se realizó la técnica de PCR tiempo real para obtener datos más precisos y determinar si hay mayor expresión de los genes en estudio que permita identificar si guardan relación con la persistencia y recaída de la enfermedad, llevando a cabo la cuantificación relativa y absoluta. En la cuantificación relativa mediante el cálculo de  $\Delta C_T$  y  $\Delta\Delta C_T$  se corroboró que los cuatro grupos de tumores invasores presentaron mayor expresión con respecto a los tumores benignos.

Se destaca que el grupo de HER 2 Neu fue el que presentó el valor más alto de “Fold change” tanto para *Notch 1* como para *Notch 3*, aunque habrá que considerar los valores obtenidos por los otros grupos de tumores invasores que

tuvieron mayor número de copias con respecto al grupo calibrador (tumores benignos).

Pero al utilizar esta técnica no se aplicó prueba de ANOVA a las medias de cada grupo tanto para *Notch 1* como *Notch 3* debido a que el grupo calibrador ya mencionado no toma variabilidad al tener en todos los casos valor de 1. Pero no deja de ser interesante y novedoso el hecho de que se contemplara este grupo de tumores benignos.

Por otra parte si comparamos al grupo que mayores recaídas y persistencias tuvo, encontramos que fueron los tumores Triple Negativo y HER 2 Neu poniendo nuevamente a este último grupo en la mira como uno de los de peor pronóstico, corroborando lo reportado por otros autores. Aunque estos dos grupos fueron los más frecuentes en recurrencias y persistencias, solo para los HER 2 Neu se destaca un valor mayor de “Fold Change” (33.1 *Notch 1* y 18.5 *Notch 3*) comparado con los de Triple Negativo (11.5 *Notch 1* y 3.1 *Notch 3*). Estos resultados podrían sugerir que no existe asociación de número de copias con la recurrencia y persistencia (curso clínico) sin embargo esto es discutible, hay que considerar que estos resultados se obtuvieron de muestras incluidas en parafina por lo que representa un gran sesgo debido a que no se cuantifica el RNA utilizado en el tiempo real, aunque en nuestros ensayos se realizó la normalización con el gen de referencia (18s), esto podría considerarse una limitante. Por lo anterior no se pudo calcular razón de momios.

Sin embargo este trabajo permite generar un antecedente que nos oriente sobre la posible expresión de *Notch 1* y *3* y redirigir nuestros esfuerzos a buscar alternativas más afines para la cuantificación de los genes de interés.

Convendría realizar una revisión más especializada de la literatura de muestras de pacientes con cáncer de mama con la intención de identificar la asociación de genes *Notch 1* y *3*, con la evolución clínica enfatizando en la proliferación celular y

metástasis, ya que nuestros resultados no son concluyentes. Nos queda claro que es difícil agrupar los casos por una clasificación específica y esperar que se comporten de manera similar entre ellos, razón que pudiera explicar que la recurrencia y persistencia de la enfermedad no se asocien a un grupo en particular. Por lo tanto, también será difícil esperar que la expresión de los genes de interés se comporten igual entre los miembros de un mismo grupo.

Cabe resaltar que los artículos referidos donde la expresión de *Notch 1* se ha asociado con mejor respuesta a tratamiento al silenciar la vía (estudios *in vitro*; cultivos celulares) no siempre resultan extrapolable a pacientes, ya que en estos estudios no se considera el macro y microambiente en el cual se encuentra el tumor. Un ejemplo claro es la asociación de la obesidad con la expresión de la familia de genes *Notch*, donde Battle M. y colaboradores (2014) proponen que la leptina activa la vía de señalización de *Notch* en modelos murinos causando pobre pronóstico, resistencia a fármacos y mantenimiento del proceso oncogénico.

Desde nuestro conocimiento este es el primer trabajo que realiza el análisis de la expresión de *Notch 1* y *3* (IHQ y PCR tiempo real) en muestras de pacientes con cáncer de mama incluidas en parafina con base a la clasificación molecular pero que incluye a todos los subtipos, esto es relevante debido a que en la mayoría de los estudios reportados solo se realizaron en grupos específicos (HER 2 Neu o Triple Negativo).

El hecho de no demostrar que el pronóstico y curso clínico de la enfermedad se deba a la expresión de *Notch 1* y *3* como se planteó en el protocolo, no significa que *Notch* no esté implicado en este proceso, sino que podría existir alguna(s) molécula(s) no identificadas que detone o sea vínculo para la activación de vías de señalización asociadas.

## [Escriba el título del documento]

---

Estos resultados parecieran desalentadores, sin embargo solo nos muestran la gran complejidad del proceso oncogénico y sus diversas interacciones relacionadas a una extensa variedad de estímulos provenientes del ambiente tumoral. En el análisis de la vía de señalización de *Notch* pudimos corroborar la diversidad de señales y respuestas estudiadas en diversos modelos experimentales.

## CONCLUSIONES.

- En la mayoría de las muestras se identificó la expresión de *Notch 1* y *Notch 3* en los grupos Luminal A, Luminal B, HER 2 Neu y Triple Negativo.
- La expresión de *Notch 1* y *3* en tumores benignos, de manera interesante fue similar a la de los tumores invasores con base a los hallazgos por inmunohistoquímica.
- La evolución o curso clínico de la enfermedad guarda relación con lo reportado en la literatura al estar vinculada con factores de mal pronóstico como la expresión de HER 2 Neu, la etapa clínica y subtipo molecular como el Triple Negativo.
- La expresión de *Notch 1* y *3* no estuvo asociada a la evolución o curso clínico de la enfermedad respecto a recurrencia y persistencia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
2. World Health Organization. Breast cancer: prevention and control. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer>.
3. GLOBOCAN 2012. Actualizado en marzo 2014; consultado en julio 2016]: <http://www.infocancer.org.mx/ambos-sexos-con777i0.html>
4. CENIDSP/INSP. Base de datos de defunciones generales 1990-2010.
5. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010. pp. 347-376.
6. NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology 2016.
7. Aebi S, Davidson T, Gruber G, et al. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011; 22(suppl 6):12-24.
8. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736-1747.
9. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Sexta revisión. Colima, México 2015.
10. Morales L, Reigosa A, Caleiras E, et al. Expresión del HER2/neu en pacientes venezolanas con cáncer de mama localmente avanzado. *Invest clín* 2008;48:69-78.
11. Zerecero O, Carreón A, Valle B, et al. El receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su relación con el cáncer. *VERTIENTES, Revista Especializada en Ciencias de la Salud* 2012;15:15-25.
12. Burgess A. EGFR family: Structure physiology signaling and therapeutics targets. *Growth Factors* 2008;26:263-274.

13. Roskoski R. The ErbB/HER2 receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *BBRC* 2004;319:1-11.
14. Cabrera CM. Estudio comparativo de la amplificación de Her2/neu mediante FISH y PCR cuantitativa en tiempo real en tumores de mama. *Oncología Barcelona* 2005;28:26-30.
15. Mounawar M, Mukeira A, Le-Calvez F, et al. Patterns of EGFR, HER2, TP53 and KRAS mutations in relationship to smoking story. *Cancer Res* 2007; 67:5667-5672.
16. Castiglion F, Tagliabue E, Campiglio M, et al. Role of exon 16- deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:221-232.
17. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-145.
18. Gown A. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008;21:S8-S15.
19. McCarty K, Miller L, Cox E. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:716-721.
20. Allred D, Harvey J, Berardo M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11:155-168.
21. Palacios J, Andreu X, Calasanz M, et al. Recomendación para la determinación de HER2 en cáncer de mama. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). *Rev Esp Patol* 2009;42:3-16.
22. Walker R, Bartlett J, Dowsett M, et al. HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol* 2008;61:818-824.



23. Cohen D, Dabbs D, Cooper K, et al. Interobserver agreement among pathologists for semiquantitative hormone receptor scoring in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2012;138:796-802.
24. Brown R. Quality management in immunohistochemistry - Quality management in anatomic pathology: promoting patient safety through systems improvement and error reduction. The College of American Pathologists. 2005;93-110.
25. Arnould L, Roger P, Mc-Grogan G. Accuracy of Her2 status determination on breast core-needle biopsies (immunohistochemistry, FISH, CISH and SISH vs FISH). *Mod Pathol* 2012;25:675-682.
26. Ji-hyun J, Yang W, Oh S, et al. HER2 stabilizes survivin while concomitantly down-regulating survivin gene transcription by suppressing Notch cleavage. *Biochem J* 2013;451:123-134.
27. *Baker A, Zlobin A, Osipo C.* Notch-EGFR/HER2 bidirectional crosstalk in breast cancer. *Front Oncol* 2014;4:1-20.
28. Avila J, Kissil J. Notch signaling in pancreatic cancer: oncogene or tumor suppressor?. *Trends in Molecular Medicine* 2013;19:320-327.
29. Lobry C, Oh P, Mansour M, et al. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor. *BLOOD* 2014;123:2451-2459.
30. Pacheco A, Raventós H. Genética de la esquizofrenia: avances en el estudio de genes candidatos. *Revista de Biología Tropical* 2004;52:467-473.
31. Espinoza I, Miele L. Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics* 2013;139:95-110.
32. Bravo A, Baizabal V. La vía de señalización Notch y el desarrollo embrionario animal. *REB* 2005;24:87-96.
33. Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, et al. A novel tumor suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukemia. *Nature* 2012;473:230–233.

34. Schwarzer R, Dörken B, Jundt F. Notch is an essential upstream regulator of NF- $\kappa$ B and is relevant for survival of Hodgkin and Reed–Sternberg cells. *Leukemia* 2012;26:806-813.
35. Zhou W, Wang G, Guo S. Regulation of angiogenesis via Notch signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1836. 2013:304-320.
36. Bohn O, Maeda T, Filatov A, et al. Utility of LRF/Pokemon and NOTCH1 Protein Expression in the Distinction Between Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma and Classical Hodgkin Lymphoma. *Int J Surg Pathol* 2014; 22:6-11.
37. Tiacci E, Döring C, Brune V, et al. Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *BLOOD* 2012;20:4609-4620.
38. Pajcini KV, Speck NA, Pear WS. Notch signaling in mammalian hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2011;25:1525-1532.
39. Santos L, León-Galván M, Marino-Marmolejo EN. Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud pública de México* 2006; 48:155-164.
40. Gridley T. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* 2003;12:1-9.
41. Pear W, Aster J. T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: A human cancer commonly associated with aberrant Notch 1 signaling. *Curr Opin Hematol* 2004;11:426-433.
42. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003;33:416-421.

43. Schwarzer R, Jundt F. Notch and NF-B Signaling Pathways in the Biology of Classical Hodgkin Lymphoma. *Curr Mol Med* 2011;11:236-245.
44. Renne C, Martin-Subero J, Eickernjager M. Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell-specific gene expression, in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 2006;169:655-664.
45. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005;5:251-262.
46. Gueçaimburú R. Genética. *Rev Urug Cardiol* 2014;29:421-429.
47. Maslen C, Babcock D, Robinson S, et al. CRELD1 mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome. *Am J Med Genet A* 2006;140:2047-2049.
48. Yuan Z, Kohsaka T, Ikegaya T, et al. Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. *Hum Mol Genet* 1998;7:1363-1369.
49. Jain R, Rentschler S, Epstein J. Notch and cardiac outflow tract development. *Ann NY Acad Sci.* 2010; 1188:184-90.
50. McBride K, Riley M, Zender G, et a. NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand induced signaling. *Hum Mol Genet* 2008;17:2886-2893.
51. Wu X, Liu W, Tang D, et al. Prognostic values of four Notch receptor mRNA expression in gastric cancer. *Scientific Reports* 2016;6:28044-28053.
52. Oba K. Role of chemotherapy for advanced/recurrent gastric cancer: an individual-patient-data meta-analysis. *Eur J Cancer* 2013;49:1565-1577.
53. Kato M. Notch signaling in gastrointestinal tract. *Int J Oncol* 2007;30:247-251.
54. Miele L, Miao H, Nickolo B. NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target. *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6:313-323.

55. Alberts B, Johnson A, Morgan D, et al. Molecular biology of the cell. 6th ed. New York: Garland Science; 2015. pp. 867-869.

56. Hirose H, Ishii I, Mimori K, et al. Notch pathway as candidate therapeutic target in Her2/Neu/ErbB2 receptor-negative breast tumors. *Oncology Reports* 2010;23:35-43.

57. Chen X, Duan N, Zhang C, et al. Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Journal of Cancer* 2016;7:314-323.

58. Huang J, Lyu H, Wang J. MicroRNA regulation and therapeutic targeting of survivin in cancer. *Am J Cancer Res* 2015;5:20-31.

59. Tang C, Lu Y, Xie J. Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis. *Anticancer Drugs* 2009;20:249-258.

60. Gu Y, Jin S, Wang F. Clinicopathological significance of PI3K, Akt and survivin expression in gastric cancer. *Biomed Pharmacother* 2014;68:471-475.

61. Li J, Feng Q, Kim J. Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology* 2001;142:370-380.

62. Kang L, Mao J, Tao Y, et al. MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Science* 2015;106:700-708.

63. Speiser J, Ersahin C, Osipo C. The Functional Role of Notch Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *Vitamins and Hormones*. 2013;93:277-297.

64. Bauer R, Brown M, Cress D, et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple negative phenotype. *Cancer* 2007;109:721-728.

65. Beverly L, Felsher D, Capobianco A. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: Implications for initiation and regression. *Cancer Research* 2005;65:7159–7168.

66. Cheang M, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 2007;14:1368-1376.

67. Santio N, Sebastin K, Landor J, et al. Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells. *Oncotarget* 2016;7:43220-43237.

68. Dent R, Trudeau M, Pritchard K, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research* 2007;13:4429-4434.

69. Diaz L, Cryns V, Symmans W, et al. Triple negative breast - carcinoma and the basal phenotype: From expression profiling to clinical practice. *Advances in Anatomic Pathology* 2007;14:419-430.

70. Horwitz K, Dye W, Harrell J, et al. Rare steroid receptor-negative basal-like tumorigenic cells in luminal subtype human breast cancer xenografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:5774-5779.

71. Mo Y, Tang H, Miele L. Notch-Associated MicroRNAs in Cancer. *Current Drug Targets* 2013;14:1157-1166.

72. Su F, Zhu S, Ruan J, et al. Combination therapy of RY10-4 with the  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT shows promise in treating HER2-amplified breast cancer. *Oncotarget* 2015;7:4142-4154.

73. Abravanel D, Belka G, Pan T, et al. Notch promotes recurrence of dormant tumor cells following HER2/neu-targeted therapy. *J Clin Invest* 2015;125:2484-2496.

74. Saphner T, Tormey D, Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol* 1996;14:2738-2746.
75. Mathiesen R. Persistence of disseminated tumor cells after neoadjuvant treatment for locally advanced breast cancer predicts poor survival. *Breast Cancer Res* 2012;14:117-127.
76. Hurley J. Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:1831-1838.
77. Reedijk M. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* 2005;65:8530-8537.
78. Parker J. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160-1167.
79. Chanrion M. A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen treated primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:1744-1752.
80. Cui J, Li P, Liu X, et al. Abnormal expression of the Notch and Wnt/ $\beta$ catenin signaling pathways in stem-like ALDH(hi)CD44+ cells correlates highly with Ki-67 expression in breast cancer . *Oncology Letters* 2015;9:1600-1606.
81. Dai X, Li Y, Bai Z, et al. Molecular portraits revealing the heterogeneity of breast tumor subtypes defined using immunohistochemistry markers. *Scientific Reports* 2015;5:1-10.
82. Ory V, Tassi E, Cavalli ER, et al. The nuclear coactivator amplified in breast cancer 1 maintains tumor initiating cells during development of ductal carcinoma in situ. *Oncogene* 2014;33:3033-3042.

83. Liu J, Shen J, Wen X, et al. Targeting Notch degradation system provides promise for breast cancer therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016;104:21-29.

84. Osipo C, Patel P, Rizzo P. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor. *Oncogene* 2008;27:5019-5032.

85. Yaswen Paul. Reinforcing targeted therapeutics with phenotypic stability factors. *Cell Cycle* 2005;13:3818-3822.

86. Lipsey C, Harbuzariu A, Daley-Brown D, et al. Oncogenic role of leptin and Notch interleukin-1 leptin crosstalk outcome in cancer. *World J Methodol* 2016;6:43-55.

87. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nature Med* 2001;7:548-552.

88. Chrestensen C, Shuman J, Eschenroeder A, et al. MNK1 and MNK2 regulation in HER2- overexpressing breast cancer lines. *J Biol Chem* 2007;282:4243-4252.

89. Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, et al. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer* 2006;42:1219-1224.

90. Anderson L, Gibbons G. Notch: a mastermind of vascular morphogenesis. *J Clin Invest* 2007;117:299-302.

91. Lin Q, Donahue S, Ruley H. Genome maintenance and mutagenesis in embryonic stem cells. *Cell Cycle* 2006;5:2710-2714.

92. Ommiska J, Bartkova J, Heinonen M. The DNA damage signalling kinase ATM is aberrantly reduced or lost in BRCA1/ BRCA2-deficient and ER/PR/ERBB2-triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2008;27:2501-2506.

93. Han M, Deng H, Jiang R. Effect of Trastuzumab on Notch-1 Signaling Pathway

in Breast Cancer SK-BR3 Cells. *Chin J Cancer Res* 2012;24:213–219.

94. Lewis G, Li G, Dugger D. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 2008; 68:9280-9290.

95. Guo S, Liu M, Gonzalez R. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1815:197-213.

96. Ubb A, Soilleux E, Turley H. Expression of vascular notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer. *Am J Pathol* 2010;176:2019-2028.

97. Chen J, Chang H, Peng X, et al. 3,6-dihydroxyflavone suppresses the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells by inhibiting the Notch signaling pathway. *Scientific Reports* 2016;6:1-9.

98. Gleeson F, Kerr S, Kipp B, et al. Targeted next generation sequencing of endoscopic ultrasound acquired cytology from ampullary and pancreatic adenocarcinoma has the potential to aid patient stratification for optimal therapy selection. *Oncotarget* 2016;1:1-10.

99. Ortiz F, Gutiérrez F, Sanmartín E, et al. Association of Notch pathway down-regulation with Triple Negative/Basal-like breast carcinomas and high tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs. *Exp Mol Pathol* 2016;100:460-468.

100. Fernández P, Valdés-Cañedo F. Determinación de factores pronósticos. *Cad Aten Primaria* 2001;4:26-29.

101. González JM, Morales M, López Z, et al. Factores pronósticos del cáncer de mama. *Revista Cubana de Cirugía* 2011;50:130-138.

102. Lee W, Lee J, Han J. Analysis of prognostic factors and treatment modality changes in breast cancer: a single study in Korea. *Yousei Med J* 2007;48:465-473.

103. Singletary S, Allred C, Ashley P. Revision of the American Committee on



cancer staging system for breast. J Clin Oncol 2002;20:3628-3636.

104. González I, García J. Historia natural del cáncer de mama. Toko-Gin Pract 2002;61:264-269.

105. Seguí MA. Estudio del valor pronóstico de la expresión del oncogén p53 y otros factores clínico-patológicos en el cáncer de mama sin afectación ganglionar axilar. [tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Medicina. 1999. pp.185-189.

106. Kruk J. Association of lifestyle and other risk factors with breast cancer according to menopausal status. A case control study in the region of western Pomerania (Poland). Asian Pac J Cancer Prev 2007;8:513-524.

107. Fuster C, Martínez N, García A, et al. Factores pronósticos del cáncer de mama, un modelo predictivo. Rev Oncol 2004;6:472-482.

[Escriba el título del documento]

ANEXO 1. Instrumento de recolección de datos.

No	NOMBRE	NSS	EDAD	FECHA DX	HISTOLOGÍA	ETAPA	ETAPA PATOLÓGICA	TIPO MOLECULAR	TX	RECAIDA	PERSISTENCIA	QT	RT	PLE MESES	ESTADO ACTUAL	IHQ-RNA (+/-) NOTCH 1	IHQ-RNA (+/-) NOTCH 3
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	

ANEXO 2.


México DF, a 17 de octubre del 2016.

FORMATO CARTA DE CONFIDENCIALIDAD.

El C. José Damián Gómez Archila (Investigador responsable) del proyecto titulado: "Pronóstico y curso clínico de las pacientes con cáncer de mama y expresión de notch 1 y 3", con domicilio ubicado en Av. Renato Leduc 58 colonia Toriello Guerra delegación Tlalpan DF; me comprometo a resguardar, mantener la confidencialidad y no hacer mal uso de los documentos, expedientes, reportes, estudios, actas, resoluciones, oficios, correspondencia, acuerdos, directivas, directrices, circulares, contratos, convenios, instructivos, notas, memorandos, archivos físicos y/o electrónicos, estadísticas o bien, cualquier otro registro o información que documente el ejercicio de las facultades para la evaluación de los protocolos de investigación, a que tenga acceso en mi carácter investigador responsable, así como a no difundir, distribuir o comercializar con los datos personales contenidos en los sistemas de información, desarrollados en el ejercicio de mis funciones como investigador responsable.

Estando en conocimiento de que en caso de no dar cumplimiento se estará acorde a la sanciones civiles, penales o administrativas que procedan de conformidad con lo dispuesto en la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental, la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares y el Código Penal del Estado de Nuevo León, a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, y demás disposiciones aplicables en la materia.

Acepto:

  
José Damián Gómez Archila  
Nombre y Firma.