



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

**EXPRESIÓN DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS (P53, TOP2a)  
EN BIOPSIAS DE MUJERES MEXICANAS CON CÁNCER DE  
MAMA**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
JISELA DIMAS GONZÁLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. MARCO ANTONIO TERÁN PORCAYO  
INSTITUTO ESTATAL DE CANCEROLOGÍA “DR. ARTURO  
BELTRÁN ORTEGA”, SSA**

**COMITÉ TUTOR:  
DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS  
INSTITUTO NACIONAL DE MÉDICINA GENÓMICA, SSA  
DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2019**



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.



**Este proyecto se realizó en el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” en Acapulco Guerrero y en el Instituto Nacional de Medicina Genómica en la Ciudad de México bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Terán Porcayo.**

**Comité tutor:**

**Dr. Marco Antonio Terán Porcayo, IECAN-SSA**

**Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas, INMEGEN-SSA**

**Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, CCG-UNAM**

**La alumna agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. 175068) para realización de esta tesis y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).**



## ÍNDICE

<b>Figuras y Tablas .....</b>	<b>III</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Glándula mamaria.....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Epidemiología del CaMa .....</b>	<b>3</b>
<b>3.3 Características del CaMa .....</b>	<b>4</b>
<b>3.3.1 Etapas del CaMa.....</b>	<b>4</b>
<b>3.3.2 Subtipos histológicos de CaMa .....</b>	<b>6</b>
<b>3.3.3 Subtipos clínicos de CaMa .....</b>	<b>6</b>
<b>3.4 P53.....</b>	<b>7</b>
<b>3.4.1 SNPs del gen TP53 .....</b>	<b>8</b>
<b>3.5 Mutaciones del gen TP53 en cáncer .....</b>	<b>9</b>
<b>3.6 TOP2a .....</b>	<b>11</b>
<b>3.7 TOP2a y cáncer.....</b>	<b>12</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>14</b>
<b>8. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>15</b>
<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>9.1 Pacientes .....</b>	<b>16</b>
<b>9.2 Clasificación de alteraciones genéticas .....</b>	<b>16</b>
<b>9.3 Extracción de ADN genómico .....</b>	<b>16</b>
<b>9.4 Extracción de proteínas .....</b>	<b>17</b>
<b>9.5 PCR punto final y secuenciación .....</b>	<b>17</b>
<b>9.6 qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) .....</b>	<b>17</b>
<b>9.7 Western blot.....</b>	<b>18</b>
<b>9.8 PLA (Proximity Ligation Assay)-qPCR .....</b>	<b>19</b>



<b>9.9 Inmunohistoquímica.....</b>	<b>21</b>
<b>9.10 Análisis estadístico.....</b>	<b>21</b>
<b>10 RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
<b>10.1 Características clínico-patológicas de las mujeres con CaMa .....</b>	<b>23</b>
<b>10.2 Alteraciones del gen <i>TP53</i> y expresión de la proteína .....</b>	<b>25</b>
<b>10.3 Alteraciones del gen <i>TOP2a</i> y expresión de la proteína .....</b>	<b>30</b>
<b>10.4 Asociación de características de las mujeres con CaMa.....</b>	<b>31</b>
<b>10.5 Análisis de sobrevida de las mujeres con CaMa.....</b>	<b>33</b>
<b>11. DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>12. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>13.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>40</b>
<b>14. REFERENCIAS.....</b>	<b>41</b>
<b>15. ARTÍCULO .....</b>	<b>49</b>

## **Figuras y Tablas**

<b>Figura 1.</b> Estructura de la glándula mamaria femenina .....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer .....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Etapas del CaMa de acuerdo al sistema TNM.....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Subtipos histológicos y moleculares de CaMa.....	<b>7</b>
<b>Figura 5.</b> Funciones y estructura de la proteína p53 .....	<b>8</b>
<b>Figura 6.</b> Frecuencia de SNPs en el gen TP53 en individuos sanos.....	<b>9</b>
<b>Figura 7.</b> Mutaciones del gen <i>p53</i> y funciones .....	<b>11</b>
<b>Figura 8.</b> TOP2a estructura y alteraciones genéticas .....	<b>13</b>
<b>Figura 9.</b> Estandarización y validación del método qPCR para el gen TOP2a ....	<b>18</b>
<b>Figura 10.</b> Estandarización de PLA-qPCR para proteína p53 .....	<b>14</b>
<b>Figura 11.</b> Características clínicas y patológicas de las pacientes con CaMa .....	<b>25</b>
<b>Figura 12.</b> PCR (Polymerase Chain Reaction) y secuencia del gen <i>p53</i> exones 5-6 .....	<b>27</b>
<b>Figura 13.</b> Frecuencia de SNPs en el intrón 7 del gen p53 .....	<b>28</b>



<b>Figura 14.</b> Alteraciones del gen <i>p53</i> y expresión de la proteína en mujeres con CaMa .....	30
<b>Figura 15.</b> Alteraciones del gen <i>TOP2a</i> y expresión de la proteína en mujeres con CaMa .....	31
<b>Figura 16.</b> MCA (Multiple Correspondence Analysis) en mujeres con CaMa .....	32
<b>Figura 17.</b> Valor pronóstico de p53 en mujeres con CaMa .....	34
<b>Figura 18.</b> Valor pronóstico de TOP2a en mujeres con CaMa .....	35
<b>Tabla 1.</b> Características clínicas, patológicas y antropométricas de las pacientes con CaMa .....	17
<b>Tabla 2.</b> Genes p53 y TOP2a en pacientes con CaMa .....	20

## Abreviaturas

**BC:** Breast Cancer, por sus siglas en ingles

**CaMa:** Cáncer de Mama

**TP53:** Tumor Protein p53, por sus siglas en ingles

**TOP2a:** Topoisomerasa 2 alfa

**qPCR:** quantitative Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en ingles

**PLA:** Proximity Ligation Assay, por sus siglas en ingles

**SBR:** Scarff–Bloom–Richardson, por sus siglas en ingles

**TNBC:** Triple Negative Breast Cancer, por sus siglas en ingles

**Non-TNBC:** Non Triple Negative Breast Cancer, por sus siglas en ingles

**TN:** Triple Negativo

**No-TN:** No Triple Negativo

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ASCO:** American Society of Clinical Oncology, por sus siglas en ingles

**CAP:** College of American Pathologist, por siglas en ingles

**HER2:** Human Epidermal growth factor Receptor type 2, por sus siglas en ingles



**RH:** Receptores Hormonales

**RE:** Receptors de Estrógenos

**RP:** Receptores de Progesterona

**PRD:** Proline Rich Domain, por sus siglas en ingles

**TADs:** Transactivation Domains, por sus siglas en ingles

**DBD:** DNA Binding Domain, por sus siglas en ingles

**SNPs:** Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en ingles

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**kDa:** kilodalton

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**Dx:** Diagnóstico

**IECan:** Instituto Estatal de Cancerología

**MAC:** Multiple Correspondence Analysis, por sus siglas en ingles

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**A/C:** Adriamicina/Ciclofosfamida

**FAC:** 5-Fluorouracilo, Adriamicina, Ciclofosfamida

**Pb:** Pares de bases

**DS:** Desviación Estándar



## 1. ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a disease with different clinical, histological, and molecular characteristics, frequently presenting mutated tumour-suppressing genes and oncogenes. P53 is a known tumour suppressor that is often mutated in BC; several mutations in p53 inhibit its role as a transcriptional repressor of several oncogenes. Topoisomerase 2 alpha (TOP2a) is a gene target of p53, and it is also a known target for anthracyclines. The aim of this study was to analyse the genetic alterations of *p53* and *TOP2a* genes and levels of protein expression, as well as their association with survival in Mexican women with BC. A total of 102 biopsies were collected (tumour and adjacent tissues) from patients with BC. To identify point mutations and deletions in the *TP53* gene, the Sanger sequencing method was carried out. Deletions or amplifications for *TOP2a* gene were determined using quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). In addition, the expression of the TOP2a and p53 proteins was evaluated by Western blot. Furthermore, p53 protein expression was analysed by Proximity Ligation Assay (PLA)-qPCR. Only 28.5% of the patients were found to have Triple Negative Breast Cancer (TNBC); the average age at the time of diagnosis of these patients was 50 years, and Scarff–Bloom–Richardson (SBR) histological grade III ( $p=0.0089$ ). No differences in point mutations or deletions of *TP53*, deletions or amplifications and protein expression level of TOP2a were observed between women with TNBC and non-TNBC patients. However, patients with TNBC showed p53 protein overexpression as determined by PLA-qPCR and Western blot ( $p<0.0001$ ). Furthermore, we found an association between TOP2a amplification and overexpression of its protein in patients with TNBC ( $p<0.0001$ ). Concerning p53 overexpression resulted in a lower survival in patients with BC.



## 2. RESUMEN

El cáncer de mama (CaMa) es una enfermedad compleja con diferentes características clínicas, histológicas y moleculares, frecuentemente presenta genes supresores de tumor y oncogenes mutados. P53 es un supresor de tumor que comúnmente está mutado en CaMa; varias mutaciones puntuales en el gen *TP53* inhiben su papel como represor transcripcional de varios oncogenes. Topoisomerasa 2 alfa (TOP2a) es un gen blanco de p53 y es un blanco de antraciclinas. El objetivo de este estudio fue analizar las alteraciones genéticas de los genes *TP53* y *TOP2a*, la expresión de sus proteínas, y su asociación con la sobrevida en mujeres Mexicanas con CaMa. Un total de 102 biopsias fueron colectadas (tumor y tejido adyacente) de mujeres con CaMa. Las mutaciones puntuales y las deleciones en el gen *TP53* se identificaron mediante secuenciación con el método de Sanger. Las deleciones y amplificaciones del gen *TOP2a* se determinaron mediante qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). La expresión de las proteínas p53 y TOP2a se evaluaron mediante Western blot. Además, se determinó la expresión de la proteína p53 mediante PLA (Proximity Ligation Assay)-qPCR. El 28.5% de las mujeres fueron subtipo Triple negativo (TN), con una edad promedio al momento del diagnóstico de 50 años y 82.8% con grado histológico SBR (Scarff–Bloom–Richardson) III. No se encontraron diferencias entre las mujeres TN y no-TN en las mutaciones puntuales o deleciones del gen *TP53*, deleciones o amplificaciones y expresión de la proteína TOP2a. Sin embargo, las mujeres con subtipo TN mostraron sobreexpresión de la proteína p53 determinada por PLA-qPCR y Western blot ( $p < 0.0001$ ). Además, nosotros encontramos una asociación entre la amplificación de *TOP2a* y sobreexpresión de su proteína en las mujeres con subtipo TN ( $p < 0.0001$ ). Por último, las mujeres con CaMa con p53 sobreexpresada presentaron una menor sobrevida.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Glándula mamaria

La glándula mamaria esta compuesta por piel, tejido subcutáneo donde se encuentran los adipocitos y el tejido mamario que incluye estroma y parénquima, y su función es la producción de leche. La glándula mamaria contiene lóbulos en un rango de 15-20 y estos lóbulos están conformados por lobulillos, los lóbulos se conectan a través de una red de ramificaciones tubulares (ductos) que desembocan en el pezón, y en los espacios entre los lóbulos se encuentra el tejido adiposo (Pandya S, 2011).

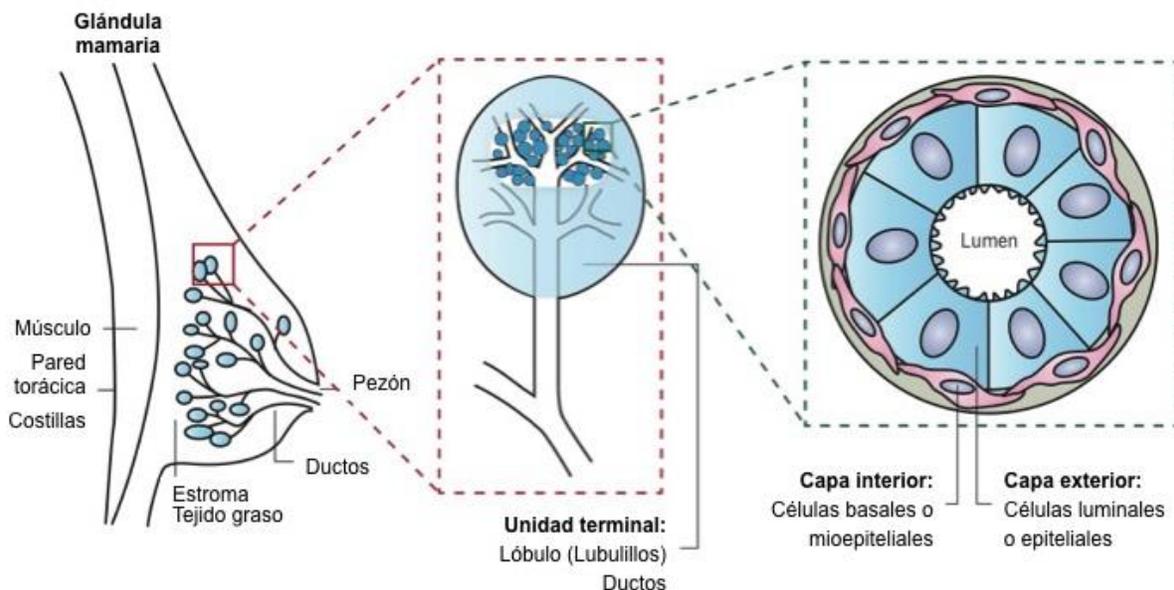
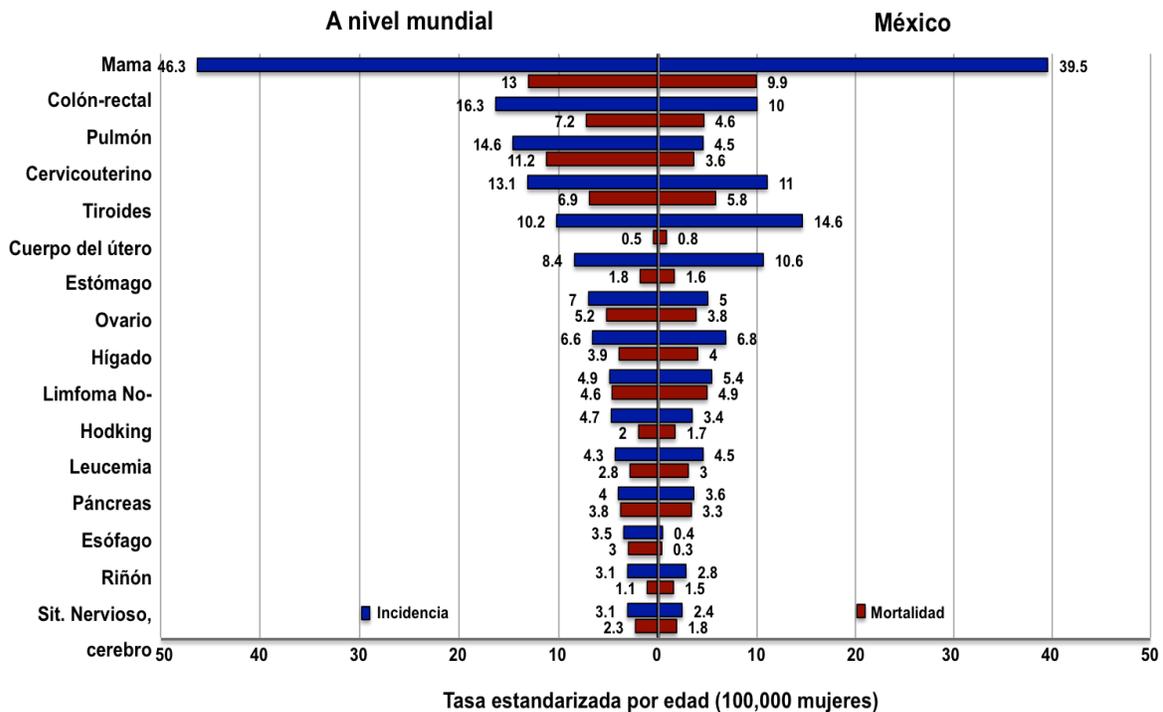


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria femenina (Wong E, 2012).

#### 3.2 Epidemiología del CaMa

El CaMa es la primera causa de incidencia y mortalidad en la población femenina a nivel mundial y en México. En el año 2018 se reportaron tasas de incidencia de 46.3 por 100,000 mujeres y mortalidad de 13 defunciones por 100,000 mujeres a nivel mundial; específicamente en mujeres mexicanas las tasas de incidencia fueron de 39.5 por 100,000 mujeres y mortalidad de 9.9 defunciones por 100,000 mujeres (Figura 2) (Globocan, 2018).



**Figura 2.** Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer en la población femenina a nivel mundial y en México (Globocan, 2018).

### 3.3 Características del CaMa

El cáncer de mama (CaMa) es una enfermedad heterogénea y compleja que se desarrolla en las células de la glándula mamaria, y se asocia con diferentes características histopatológicas, biológicas y clínicas importantes para determinar el pronóstico y el tratamiento de los pacientes. La heterogeneidad es un sello o marca del cáncer, en CaMa se ha observado heterogeneidad entre los diferentes pacientes (inter-tumor), y ello se debe a que existen diferentes poblaciones celulares en el tumor de un paciente (intra-tumor) (Turashvili G, 2017).

#### 3.3.1 Etapas del CaMa

Los tumores de CaMa se dividen en 2 etapas en general: tempranas (etapa 0, I y II) y tardías (etapa III y IV). Acordando con el sistema de TNM por el American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC) para asignar a los tumores una etapa se utilizan las siguientes características: Tamaño



del tumor (T), estatus de ganglios linfáticos (N: lymph node) y metástasis a distancia (M) (AJCC, 2016; Turashvili G, 2017). En la etapa 0 solo existe un carcinoma *in situ* y no ha invadido la membrana basal. Las siguientes etapas presentan un tamaño de tumor y presencia o ausencia de ganglios linfáticos hasta la última etapa IV donde existe metástasis hacia otro órgano. T1 corresponde a un tumor <2 cm de tamaño, T2 tumor >2cm – 5 cm, un tumor T3 es >5 cm y finalmente un tamaño T4 puede ser cualquier tamaño y una extensión directa hacia la pared del pecho (AJCC, 2016). Por otra parte, N1 corresponde a micrometástasis en 1-3 ganglios linfáticos, N2 metástasis en 4-9 ganglios linfáticos axilares, N3 es la presencia de metástasis en más de 10 ganglios linfáticos (AJCC, 2016).

Etapas		Sistema TNM del AJCC			
		Tumor	Ganglios linfáticos	Metástasis	
Etapas Tempranas	0	Tumor in situ	N0	M0	
	I	A	T1	N0	M0
		B	T0, T1*	N1**	M0
	II	A	T0, T1* T2	N1** N0	M0
		B	T2 T3	N1 N0	M0
	Etapas Tardías	III	A	T0, T1*, T2 T3 T3	N2 N1 N2
B			T4 T4 T4	N0 N1 N2	M0
C			Cualquier Tamaño	N3	M0
IV		Cualquier Tamaño	Cualquier # Ganglios linfáticos	M1	

**Figura 3.** Etapas del CaMa de acuerdo al sistema TNM. T1\*= tamaño de tumor <1 mm, N1\*\*= micrometástasis en ganglios linfáticos.



### 3.3.2 Subtipos histológicos de CaMa

Dentro de las características importantes intrínsecas del tumor se encuentra el tipo histológico del tumor, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció la existencia de al menos 17 tipos histológicos distintos (Weigelt B, 2009). De manera general el tumor se puede clasificar en carcinoma *in situ* e invasivo (infiltrante); a su vez el carcinoma *in situ* se puede subdividir en ductal o lobulillar y corresponde a un 25% de los tumores de CaMa, y el 75% restante corresponde a tumores de CaMa invasivos (Malhotra GK, 2010). La mayoría de los tumores de CaMa son carcinomas de tipo histológico ductal invasivo (70-80%), seguido carcinomas lobulillar invasivo (5-15%) y otros tipos histológicos (mucinoso, papilar, tubular, neuroendocrino, medular, mixtos, etc.) son menos frecuentes <2% (Figura 4B) (Weigelt B, 2009; Malhotra GK, 2010).

### 3.3.3 Subtipos clínicos del CaMa

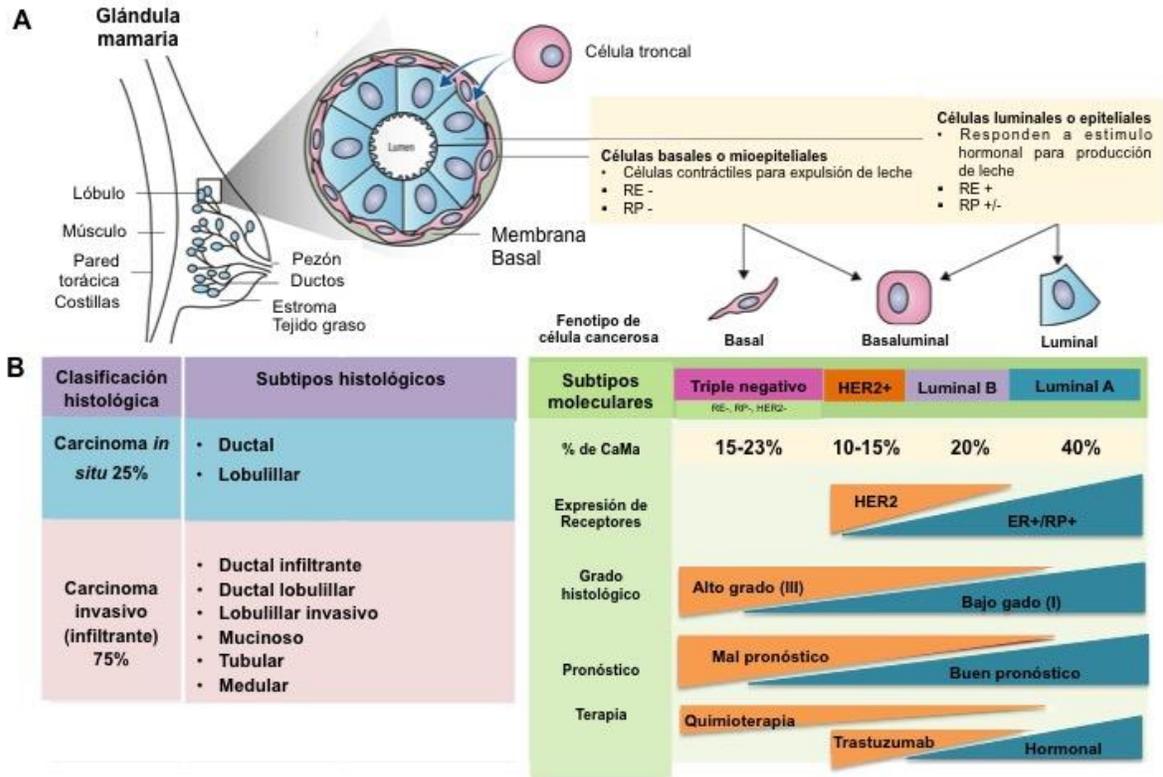
La expresión de receptores hormonales (RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona) y HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2) se evalúan de manera rutinaria en el CaMa por inmunohistoquímica (IHQ) acorde con las recomendaciones de la ASCO/CAP. La expresión o ausencia de estos receptores permite establecer biomarcadores pronósticos y predictivos para determinar el tratamiento de las mujeres con CaMa (Turashvili G, 2017).

Además, de acuerdo al estatus de los RH y HER2 determinados a través de IHQ se puede clasificar a los tumores de CaMa en los siguientes subtipos: **RH positivos**, son tumores que expresan RE y/o RP aproximadamente el 80% y 60-70% respectivamente y la expresión de un solo receptor es raro; alrededor del 70% corresponden a este subtipo clínico. **HER2** (Human Epidermal growth factor Receptor-2) positivo es otro subtipo que sobreexpresa la proteína y se encuentra en un rango de 15-20% de los tumores de CaMa. Finalmente, el subtipo **triple negativo (TN)** no expresa ninguno de las receptores (RE-, RP-, Her2+) (Turashvili G, 2017).

Adicionalmente, existe la clasificación molecular que se determina a través de microarreglos y permite clasificar a los tumores de CaMa en los siguientes



subtipos: basal (triple negativo), HER2 positivo, Luminal A y Luminal B (Figura 4A)(Malhotra GK, 2010).



**Figura 4.** Subtipos histológicos y moleculares de CaMa. A) Subtipos histológicos de CaMa, B) Subtipos moleculares de CaMa.

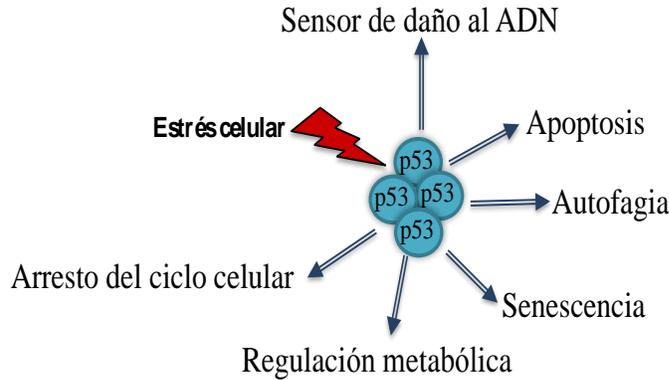
### 3.4 P53

P53 es un supresor de tumor que puede ser inducido por diversas señales de estrés como daño al ADN, activación de oncogenes, entre otros. P53 actúa como factor de transcripción regulando diversos procesos celulares como: arresto del ciclo celular, muerte celular, reparación del ADN, metabolismo, respuesta antioxidante (Figura 5A) (Biegging KT, 2014; Chen J, 2016). La proteína p53 es un tetrámero y estructuralmente contiene múltiples dominios funcionales: 2 dominios de activación transcripcional (TADs), dominio rico en prolina (PRD), dominio de unión al ADN (DBD) y dominio de oligomerización a través del cual los monómeros de p53 interactúan para formar el tetrámero; además, presenta diferentes

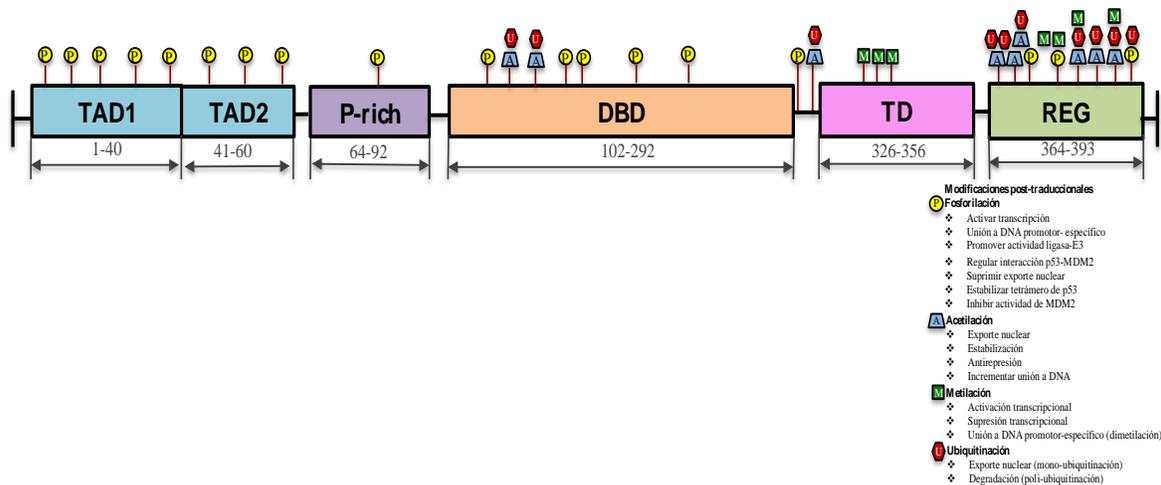


modificaciones post-traduccionales importantes en la función de la proteína p53 (Figura 5B) (Cho Y, 1994, Garcia PB, 2014).

A



B



**Figura 5.** Funciones y estructura de la proteína p53. A) Funciones de p53, B) Estructura de la proteína p53.

### 3.4.1 SNPs del gen *TP53*

Los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) son cambios de un solo nucleótido por otro, es el tipo más frecuente de cambio en el ADN, y se encuentra presentes en al >1% de la población. El gen *TP53* es polimórfico, actualmente se ha identificado 80 SNPs en diferentes poblaciones de estudio. La mayoría de los SNPs (90%) están situados en intrones, sitios de splicing o en regiones no codificantes (Figura 6) (Huszno J, 2018).



Sin embargo, estos cambios pueden afectar el riesgo de cáncer, progresión y respuesta al tratamiento. Unos de los SNPs más frecuente reportados es SNP72 (rs1042522) localizado en exón 4 permitiendo variante de Arginina 72 o Prolina 72 y juega una papel en diferentes tipos de cáncer (Dahabreh IJ, 2013; Huszno J, 2018).

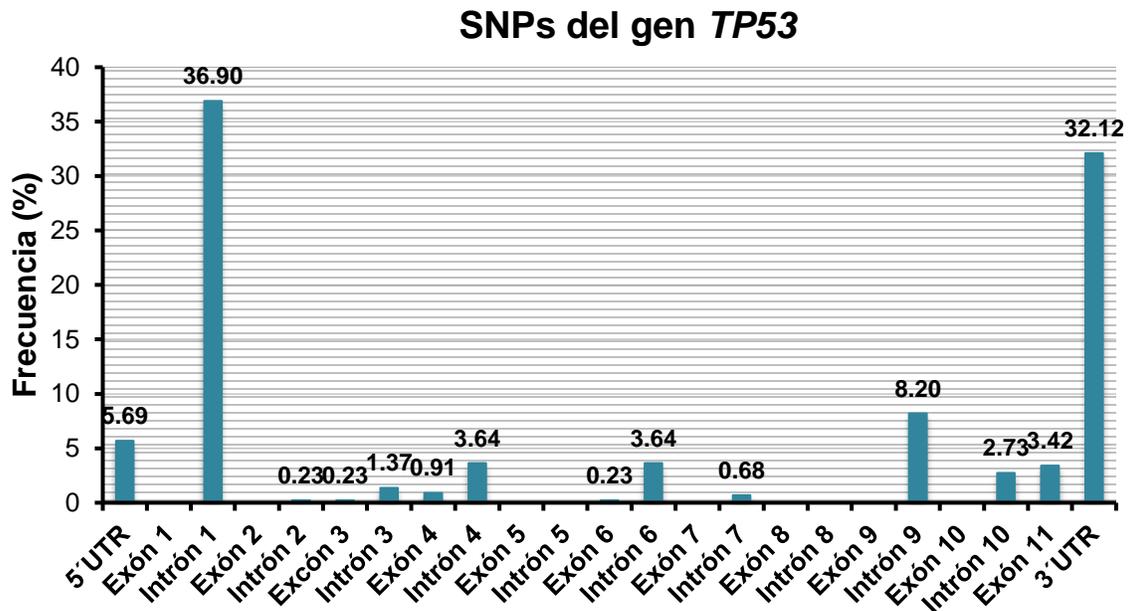


Figura 6. Frecuencia de SNPs en el gen *TP53* en individuos sanos.

### 3.5 Mutaciones del gen *TP53* en cáncer

El 50% de los diferentes tipos de cáncer presentan mutaciones en la región codificante de la proteína p53 (Petitjean A, 2007). Específicamente en tumores de CaMa del 21-27% de las pacientes presentan alteraciones en el gen *TP53* (Olivier M, 2006; Olivier M, 2010; Banerji S, 2012; Fountzilias G, 2016). Aproximadamente 4,250 mutaciones se han reportado para el gen *TP53* en tumores de CaMa, ~90% de estas mutaciones se identificaron en el dominio de unión a ADN de p53 y se han asociado con peor pronóstico y pobre respuesta al tratamiento a base de antraciclina (Figura 7A) (<http://www.p53.iarc.fr/>; Olivier M, 2006; Fernández-Cuesta L, 2012).

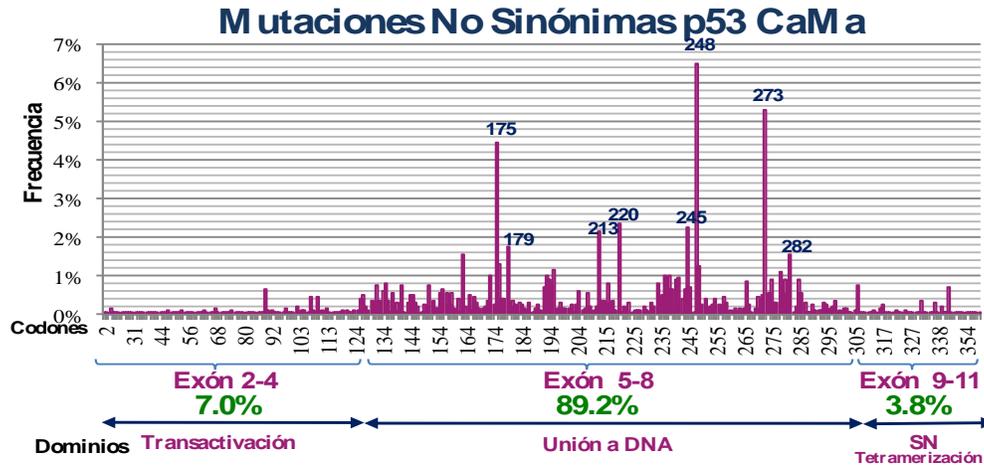
Las mutaciones en el gen *TP53* pueden inducir la pérdida de la proteína y como consecuencia su función, o generar proteínas mutantes que funcionen como un



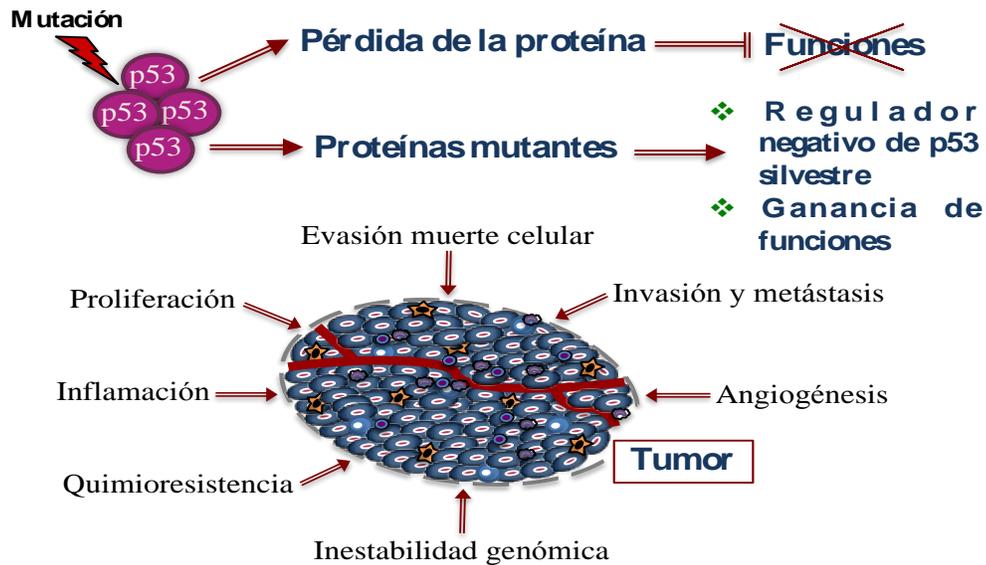
regulador negativo dominante de la proteína p53 silvestre y ganar funciones diferentes a las que realiza la proteína p53 (Brosh R, 2009; Aschauer L, 2016). Dentro de las funciones que pueden adquirir las mutantes de p53 son: activación de invasión y metástasis promoviendo un fenotipo más agresivo en el tumor (Olive KP, 2004). Inducir señales proliferativas y evasión de los supresores de tumor, promoviendo la expresión de MYC, PCNA, HLF17 y EGFR e inhiben a p63 y p73 miembros de la familia de p53 (Frazier MW, 1998; Gaiddon C, 2001; Wang W, 2013; Ali A, 2014;). Las mutantes de p53 pueden promover resistencia a muerte celular y drogas quimioterapéuticas (Oren M, 2010); también, pueden inducir angiogénesis promoviendo la expresión del factor pro-angiogénico VEGFA, HIF1, ID4 y citosinas pro-angiogénicas como IL-8 (Fontemaggi G, 2009; Khromova NV, 2009). Además, pueden desencadenar inflamación incrementando la actividad de NF-kB sobre TNF $\alpha$  y regulando la expresión de IL-1Ra (Weisz L, 2007). Otra característica de los tumores es la inestabilidad genómica y las mutantes de p53 se han asociado con alteraciones como aneuploidía, translocaciones de cromosomas y amplificaciones (Samassekou O, 2014). Las células tumorales requieren metabolitos para su proliferación y las mutantes de p53 pueden promover glicolisis y reprogramar el metabolismo celular (Zhou G, 2014); Además, las mutantes de p53 pueden remodelar la cromatina a través de la regulación de genes reguladores de cromatina como: MLL1/2 y MOZ que incrementan la metilación y acetilación de las histonas respectivamente (Zhu J, 2015). Por otra parte, la sobreexpresión de las mutantes de p53 con función disminuida o abatida son frecuentemente asociadas con la resistencia a fármacos estándar del cáncer como antraciclinas, cisplatino, antimetabolitos (gemcitabina), antiestrógenos (tamoxifen) e inhibidores-EGFR (cetuximab), debido a que las mutaciones en el gen de *pTP53* suelen generar cambios conformacionales en la proteína (He C, 2017; Hientz K, 217). Además, p53 silvestre actúa como represor transcripcional del gen *TOP2a*. Mientras que las mutantes de p53 no inhiben la expresión del gen *TOP2a*, favoreciendo el proceso de carcinogénesis (Figura 7B) (Wang Q, 1997; Joshi AA, 2003).



A



B



**Figura 7.** Mutaciones del gen *TP53* y funciones. A) Mutaciones en el gen *TP53* en tumores de CaMa, B) Funciones de p53 mutantes.

### 3.6 TOP2a

El gen *TOP2a* codifica una enzima nuclear dependiente de ATP que forma complejos de división TOP2a-ADN, su función es controlar el super-enrollamiento del ADN a través de la división temporal y ligación de las hebras del ADN liberando la tensión (Rybenkov VV, 1997; Ali Y, 2016). TOP2a está involucrada en diversos procesos celulares como: replicación del ADN, transcripción y segregación de cromosomas (Chen T, 2015). La proteína TOP2a tiene un peso



molecular de 170 kDa y estructuralmente presenta 3 dominios: dominio ATPasa, dominio de escisión/ religación y dominio variable; además, presenta modificaciones post-traduccionales (Figura 8A) (Chen T, 2015). La fosforilación en Ser-1106 es clave y se ubicada en el dominio catalítico, otros sitios de fosforilación están localizados en el dominio C-terminal y esta modificación es clave para regular la función de TOP2a (Chikamori K, 2003; Escargueil AE, 2000). Varias proteínas están involucradas en la fosforilación proporcionando estabilidad e incrementando la actividad de TOP2a como: Caseína quinasa II $\beta$ , p38 $\gamma$ , IPk1 y Plk3 (Iida M, 2008; Qi X, 2011; Shapiro PS, 1999). BRCA1 forma un complejo con pRb y ubiquitina a TOP2a para su degradación y regular de esta manera la decatenación del ADN (Shinagawa H, 2008). TOP2a también es modificada por sumoilación por SUMO-2/3 específicamente en la mitosis para regular la separación de los cromosomas (Azuma Y, 2003). Además, TOP2a puede ser modificada por 2 enzimas histonas desacetilasas HDAC1 y HDAC2 e incrementar la actividad de TOP2a (Tsai SC, 2000).

La regulación del gen *TOP2a* depende de varios estímulos, negativamente puede ser regulado por p53 silvestre a través de su promotor (Sandri MI; 1996; Wang Q, 1997). Mientras que NF-Y induce positivamente la expresión del gen *TOP2a*, cuando p53 interfiere con la unión de NF-Y en las secuencias regulatorias del promotor de TOP2a disminuye la expresión del gen *TOP2a* (Belluti S, 2013).

### 3.7 TOP2a y cáncer

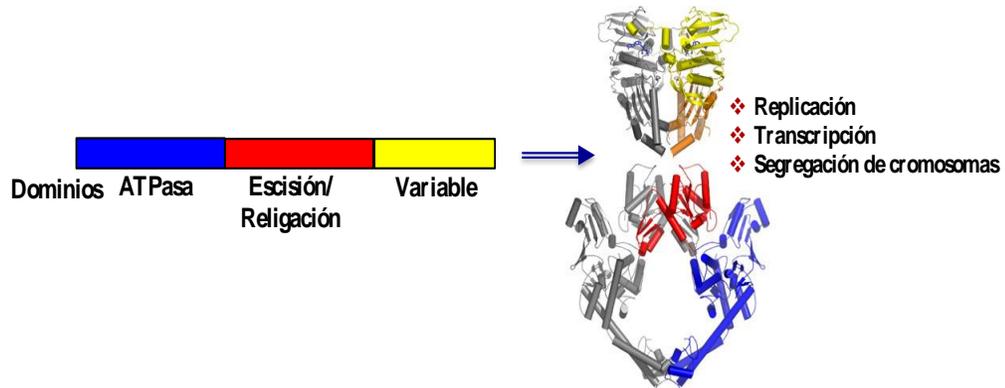
En cáncer TOP2a se considera un blanco molecular de antraciclinas, la sobreexpresión de la proteína puede ser un factor predictivo de sensibilidad a un esquema de antraciclinas, mientras que la delección del gen *TOP2a* se ha asociado con un resistencia a este mismo fármaco (Bartlett JM, 2010; Brase JC, 2010; Di Leo A, 2011; Won HS, 2014). Inversamente, la disminución de la proteína TOP2a se considera un marcador de buen pronóstico (Figura 8B) (Györffy B, 2010; Qiao JH, 2015).

Pacientes con CaMa en etapas tempranas que presentaron una baja expresión de TOP2a y un grado de tumor bajo se consideraron factores de buen pronóstico con

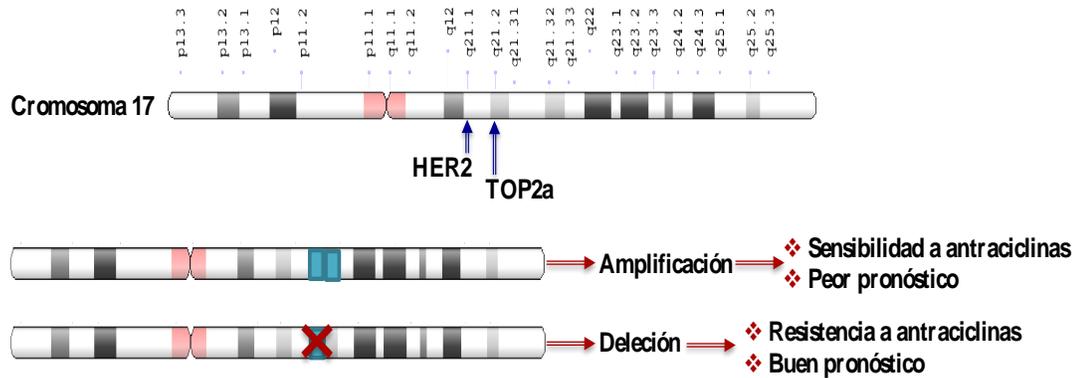


una supervivencia de 5 años sin evidencia de enfermedad, después de recibir quimioterapia adyuvante a base de antraciclinas (Biesaga B, 2011). En otro estudio la sobreexpresión de la proteína TOP2a se asoció a pacientes TN que presentaron tumores de tamaño grande y de grado alto, con ganglios linfáticos positivos estadísticamente significativo. Además, la sobreexpresión de la proteína TOP2a fue un factor de mal pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad a 5 años en pacientes TN con una tasa de supervivencia del 26.9% (Zheng H, 2016).

A



B



**Figura 8.** TOP2a estructura y alteraciones genéticas. A) Estructura de la proteína TOP2a, B) Alteraciones genéticas de TOP2a.



## 4. JUSTIFICACIÓN

El CaMa es una enfermedad compleja y heterogénea con diferentes características clínicas, histológicas y moleculares; y se considera un problema de salud pública a nivel mundial y en México. Existen diferentes marcadores que se utilizan para clasificar los tumores de CaMa en diferentes subtipos debido a la heterogeneidad que se presenta a nivel clínico, histopatológico, expresión de genes y de proteínas. Los biomarcadores que se determinan de manera rutinaria son: receptores hormonales (RE, RP) y HER2. Sin embargo, existen otros marcadores que pueden estar con precaución debido

## 5. HIPÓTESIS

La expresión y/o alteraciones genéticas de los biomarcadores (p53, TOP2a) son factores de mal pronóstico en biopsias de mujeres mexicanas con cáncer de mama.

## 6. OBJETIVO GENERAL

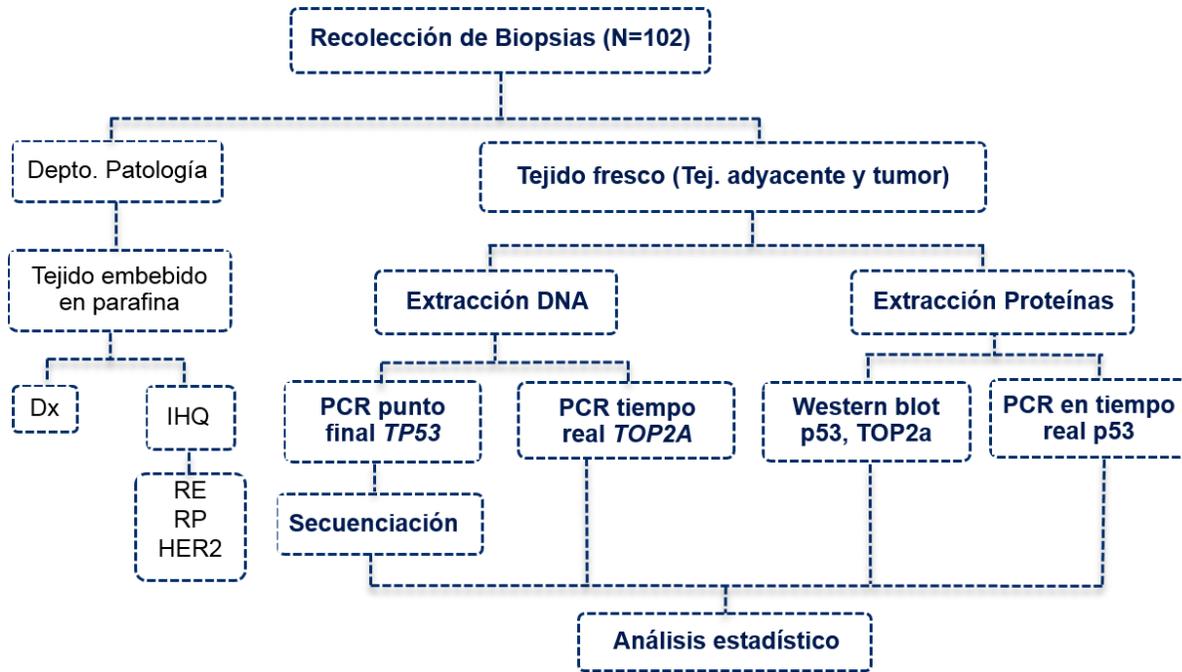
Determinar la expresión de los biomarcadores pronóstico (p53, TOP2a) en biopsias de CaMa obtenidas de mujeres mexicanas.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la frecuencia de mutaciones en el dominio de unión al ADN de p53 en biopsias de CaMa.
2. Analizar la expresión de la proteína p53 en biopsias de CaMa.
3. Determinar delección o amplificación del gen *TOP2a* en biopsias de CaMa.
4. Analizar la expresión de la proteína TOP2a en biopsias de CaMa.
5. Determinar asociación de características clínico-patológicas y el valor pronóstico de p53 y TOP2a de las mujeres con CaMa.



## 8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 Pacientes

Se colectaron 102 biopsias de tejido fresco (adyacente y tumor) de pacientes con CaMa atendidas durante el periodo de Septiembre de 2011 a Diciembre de 2012 en el Instituto Estatal de Cancerología (IECan) “Dr. Arturo Beltrán Ortega”, hospital de tercer nivel ubicado en Acapulco, Guerrero, México. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: pacientes que aceptaron participar voluntariamente con carta de consentimiento informado, residentes del Estado de Guerrero, cualquier edad al momento del diagnóstico (rango 31-85 años), carcinoma ductal infiltrante, etapa clínica I, II y III, sin tratamiento neoadyuvante, inmunohistoquímica (RE, RP, HER2), y diagnóstico de CaMa confirmado por el departamento de Patología del IECan. Se revisaron los expedientes clínicos para obtener las características clínico-patológicas y ginecológicas. Criterios de exclusión: pacientes con antecedente de cáncer, recurrencia de cáncer y embarazadas. Criterios de eliminación: biopsias con material biológico insuficiente y con historial médico incompleto. El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación del IECan.

### 9.2 Clasificación de alteraciones genéticas

Las alteraciones genéticas de *TP53* y *TOP2a* fueron clasificadas como: mutaciones a pequeña escala (mutaciones puntuales y deleciones) para el gen *TP53* y mutaciones a gran escala (amplificaciones y deleciones) para el gen *TOP2a*.

### 9.3 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de las biopsias de CaMa (adyacente y tumor) se realizó mediante el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, GmbH Germany) de acuerdo a las especificaciones del protocolo. El ADN genómico obtenido se cuantificó y se verificó la integridad amplificando el gen constitutivo *GAPDH* mediante PCR en punto final.



#### 9.4 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas totales de las biopsias de tejido mamario (adyacente y tumor) se realizó mediante el Kit Ambion PARIS (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las proteínas se cuantificaron utilizando el Kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo scientific), y la integridad de las proteínas se verificó a través de electroforesis en geles SDS-PAGE al 8% y teñidos con azul de coomassie.

#### 9.5 PCR punto final y secuenciación

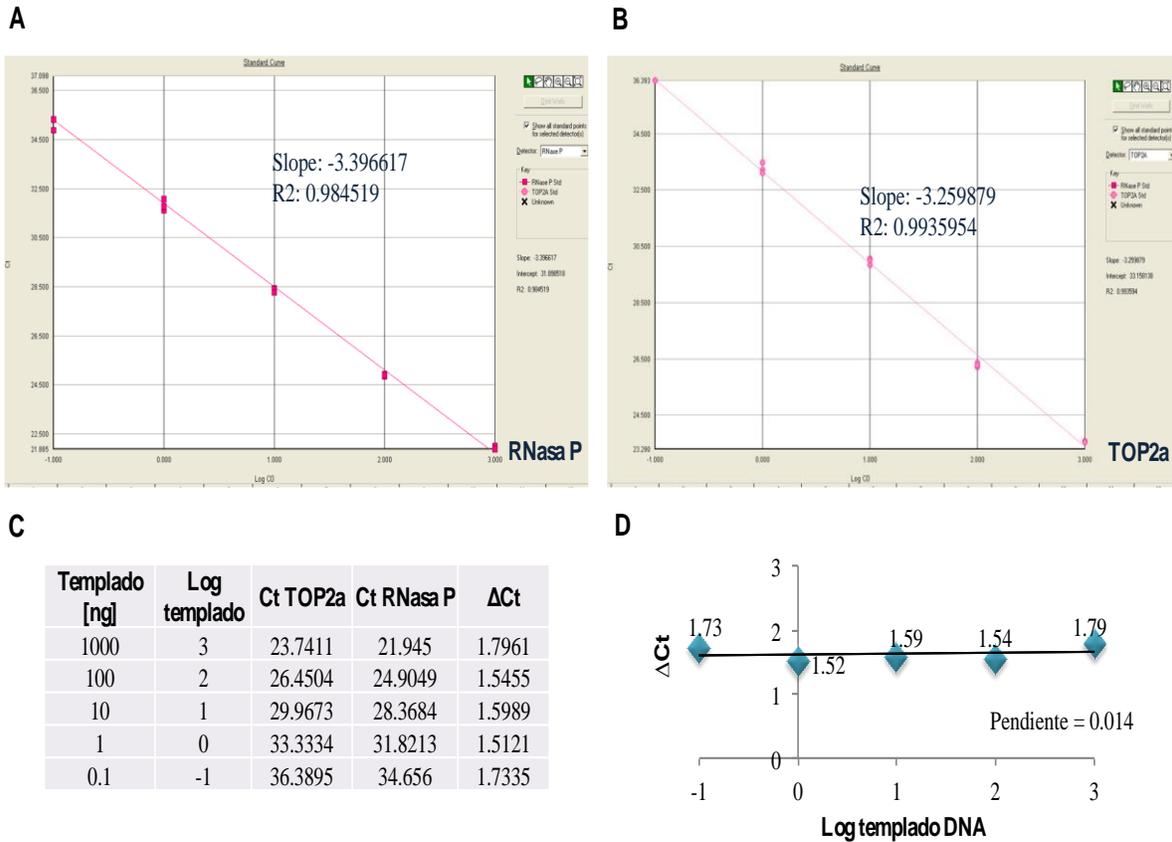
Para amplificar el dominio de unión a ADN de *TP53* (exones 5-8) se diseñaron 2 juegos de oligonucleótidos utilizando el software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster, CA USA). Un par de oligonucleótidos amplifican un fragmento de 459 pb del exón 5 y 6 (F 5'-TTCCTCTTCCTACAGTAC-3', R 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCA-3'); y el otro un fragmento de 510 pb del exón 7 y 8 (F 5'-GTGTTATCTCCTAGGTTG-3', R 5'-TCCTCCACCGCTTCTTGT-3'). Los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, GmbH Germany) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Los amplicones se cuantificaron y se secuenciaron en el equipo Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Foster, CA USA). Las secuencias de ADN obtenidas de las biopsias de las pacientes se analizaron con el software MEGA6.

#### 9.6 qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)

Para determinar el número de copias del gen *TOP2a* (amplificación y delección) se realizaron reacciones dúplex por triplicado con 20 ng de ADN (adyacente o tumor), sonda TaqMan Copy Number Assay para el gen *TOP2a* marcada con FAM (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA), sonda TaqMan Copy Number Reference para el gen *RNasa P* marcado con VIC (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA) y TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA USA) de acuerdo a las especificaciones. Los valores de Ct obtenidos se importaron al software CopyCaller versión 2.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA) para el análisis. La validación del método se realizó previamente con curvas estándar para el gen *TOP2a* y *RNasa P* con diluciones seriadas de ADN genómico (1000-



0.1ng) por triplicado de una mezcla (n=5) de sangre periférica de mujeres sanas (control negativo) y ADN genómico de la línea celular de CaMa SKBR3 (gen *TOP2a* amplificado, control positivo) (Figura 9).



**Figura 9.** Estandarización y validación del método qPCR para el gen *TOP2a*. A) Curva estándar del gen *RNasa P*, B) Curva estándar del gen *TOP2a*, C) Tabla de valores del Ct del gen *TOP2a* y *RNasa P*, D) Gráfica de eficiencias de reacción entre el gen *RNasa P* y *TOP2a*.

### 9.7 Western blot

Para este ensayo se utilizaron 30 ug de proteínas totales (tejido adyacente y tumor) que fueron separadas en geles SDS-PAGE al 10%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas en membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) y se bloquearon con leche libre de grasa al 5% durante 1 hr a temperatura ambiente. La membrana se incubo con anticuerpo primario *TOP2a*



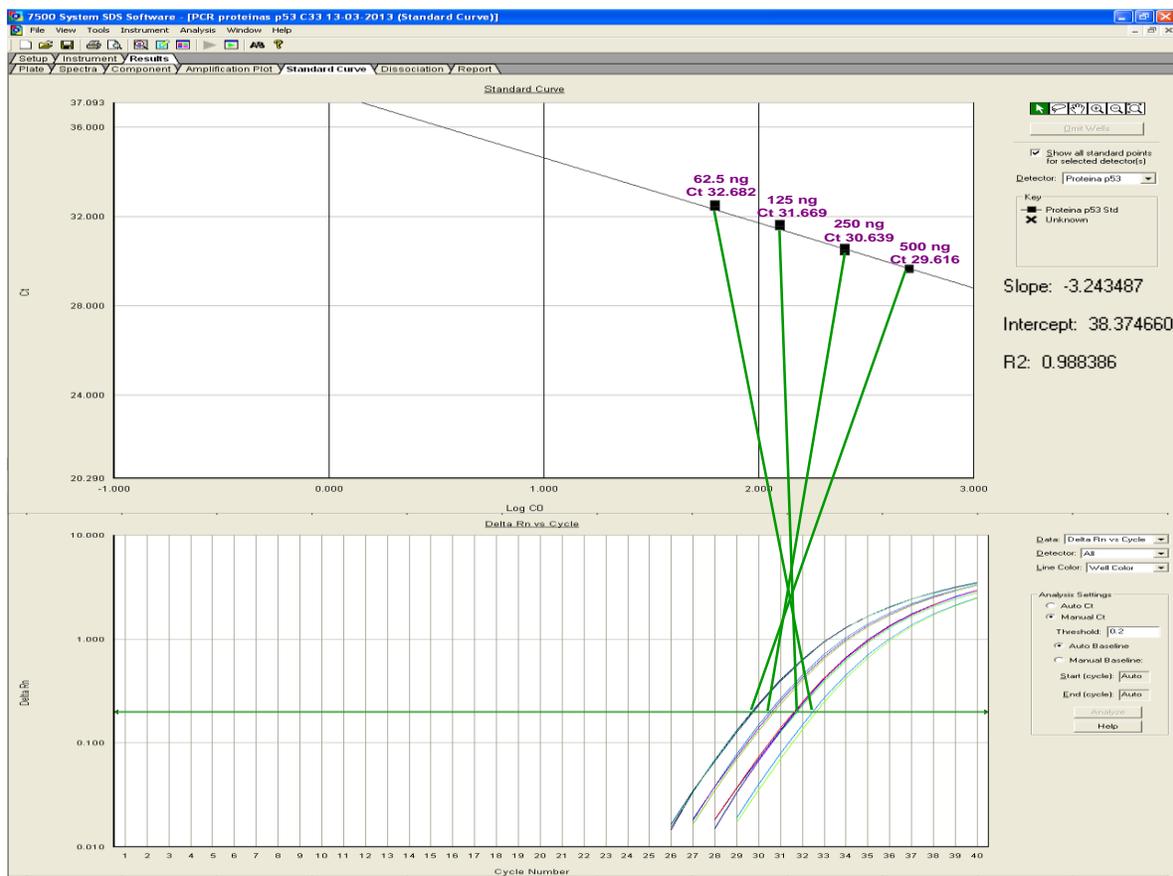
policlonal de conejo anti-humano (Abcam, Cambridge UK) o anticuerpo primario p53-HRP (Horseradish Peroxidase) monoclonal de ratón anti-humano (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX USA) toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS/Tween-20 0.1%. Adicionalmente, la membrana para identificar TOP2a se incubó 1 hr a temperatura ambiente con anticuerpo secundario de conejo-HRP (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) y se repitieron los lavados con TBS/Tween-20 0.1%. La detección de las proteínas se realizó con el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL USA) de acuerdo a las especificaciones del protocolo, y la señal de la quimioluminiscencia fue detectada en VersaDoc Imaging Systems (Bio-Rad, CA USA). El anticuerpo primario B-Tubulina monoclonal de ratón anti-humano (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) fue utilizado como control de carga. El análisis de densitometría se realizó en el software ImageJ. La expresión de la proteína TOP2a primero fue normalizando (tejido adyacente y tumor) con el control de carga (B-Tubulina), después el tejido de tumor es normalizado con el tejido adyacente. La expresión de la proteína p53 fue normalizado solo contra el control de carga (B-Tubulina), porque la vida media de la proteína p53 es corta y no es posible detectar expresión en el tejido adyacente.

### **9.8 PLA (Proximity Ligation Assay)-qPCR**

Para el ensayo de PLA se utilizaron 200 nM de la sonda 3' Prox-Oligo o 5' Prox-Oligo (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA) se incubaron por separado con 200 nM de anticuerpo p53 policlonal biotinilado (R&D System, Minneapolis USA) durante 60 min a temperatura ambiente. Después se adicionó el Assay Probe Storage Buffer y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente 1 µg de lisado de proteínas (adyacente o tumor) por triplicado se incubó con 250 pmol de la mezcla de sondas 3' y 5' Prox-Oligo con anticuerpo p53 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, a cada lisado de proteínas se le adicionó la reacción de ligación (Ligation Reaction Buffer 20X, Ligasa 1x) y se incubaron 10 min a 37°C y 10 min a 4°C; en seguida se adicionó proteasa 1X y se incubaron 10 min a 37°C, 5 min a 95°C y 4°C∞ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA).



Para el ensayo de qPCR se mezcló TaqMan® Protein Assays Fast Master Mix 2X, Universal PCR Assay 20X (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA) y 9 µl de lisado de proteínas que se obtuvieron del ensayo de PLA. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2 min a 95°C y 40 ciclos (15 seg a 95°C, 1 min a 60°C). Los valores de Ct obtenidos fueron exportados al software ProteinAssist™ software versión 1.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA USA) donde se realizó el análisis de cuantificación relativa. Previo al análisis de los lisados de proteínas de las pacientes de CaMa se realizó un rango dinámico y se verificó la eficiencia de la reacción del ensayo con una curva estándar de cuatro punto de diluciones seriadas por triplicado con lisados de proteínas de la línea celular C33A (Figura 10). Los puntos de corte para determinar la expresión relativa de la proteína p53 fue <1.0 disminución y >1.0 sobreexpresión.



**Figura 10.** Estandarización del ensayo PLA-qPCR de la proteína p53 rango dinámico y eficiencia de reacción. Panel superior curva estándar triplicados



dilución 1:2 [500-62.6 ng proteínas totales de C33A]. Panel inferior, plano de amplificación de la proteína p53.

### 9.9 Inmunohistoquímica

La determinación de receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) y HER2 se realizó en el Departamento de Patología del IECAN. Se utilizaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor de las biopsias de tejido de CaMa embebidos en parafina y los anticuerpos primarios que se utilizaron son: Receptor de Estrógeno Clona 1D5 monoclonal de ratón anti-humano (Biocare Medical, Concord, CA, USA), Receptor de Progesterona Clona PgR 636 monoclonal de ratón anti-humano (Dako, CA, USA) y Oncoproteína c-erbB-2 polyclonal de conejo anti-humano (Dako, CA, USA). El sistema de detección utilizado fue Mouse/Rabbit UnoVue HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, CA, USA). Por cada biopsia se analizó un control positivo seleccionado previamente por el patólogo como control de calidad interno. Para la interpretación de resultados se utilizó el sistema Allred y para HER2 la positividad de células (3+ positivo, 2+ intermedio, 0-1+ negativo). Las biopsias de HER2 con una positividad intermedia (2+) por inmunohistoquímica se enviaron al laboratorio de inmunohistoquímica y patología molecular (INMUNO Q, México D. F.) para realizar la prueba SISH (Silver In Situ Hibridation) para HER2, la amplificación del gen *HER2* es un resultado positivo; adicionalmente en el laboratorio de referencia INMUNO Q se realiza el control de calidad externo.

### 9.10 Análisis estadístico

Las pacientes se dividieron en 2 subtipos (grupos): las mujeres con subtipo no-TN expresan al menos uno de los receptores (RE, RP o HER2) y las mujeres con subtipo TN no expresan RE, RP ni HER2. La comparación de las características clínicas y patológicas, mutaciones puntuales y deleciones del gen *TP53*, amplificación y deleción del gen *TOP2a*, alteraciones genéticas (mutación o deleción) y SNPs del gen *TP53* se analizaron por subtipo mediante  $X^2$ . La edad al momento del diagnóstico se comparó con un ajuste no lineal tipo gaussiano para frecuencias relativas acumuladas. La expresión relativa de las proteínas p53 y TOP2a que se determinaron a través de PLA-qPCR y/o Western blot se analizaron



mediante pruebas múltiples de *t*. El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para comparar la expresión relativa de las proteínas p53 y TOP2a versus alteraciones de los genes. En todos los casos, un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

El MCA (Multiple Correspondence Analysis) utilizado, es un método descriptivo para determinar la relación entre grupos específicos (Hill MO. 1974). El MCA utiliza la prueba de  $\chi^2$  para evaluar la asociación entre las variables clínicas y patológicas (subtipos, grado histológico SBR), mutaciones a gran escala del gen *TOP2a* (amplificación o delección), mutaciones a escala pequeña del gen *TP53* (mutación puntual o delección) y la expresión relativa de las proteínas p53 y TOP2a. El análisis de correspondencia registra 2 series de combinaciones generando un score calculado para cada grupo. La primera combinación (Dimensión 1) define una escala de variación que permite una discriminación alta entre grupos. La segunda combinación (Dimensión 2) define la dispersión máxima entre grupos no correlacionados y la expresión relativa de las proteínas p53 y TOP2a. Para comparar los valores de la expresión relativa de las proteínas TOP2a y p53, los resultados fueron divididos en percentiles de 33% y 66%. Tres series de cada variables se generaron: disminución <33% (<0.9), expresión basal (normal) 33-66% (0.9-1.1) y sobreexpresión >66% (>1.1) (Hill MO. 1974). Finalmente, las curvas de supervivencia fueron determinadas usando el método de Kaplan-Meier y verificado por la prueba de Log-rank (Mantel-Cox) con un periodo de seguimiento de 26 meses, las pacientes de este estudio continúan en seguimiento.



## 10 RESULTADOS

### 10.1 Características clínico-patológicas de las mujeres con CaMa

La población total fue de 102 mujeres con CaMa, de las cuales el 71.5% fueron diagnosticadas como no-TN y el 28.5% como TN (Figura 11A). La edad al momento del diagnóstico de las mujeres TN en promedio fue de 50.2 ( $\pm 11.3$ ) años, mientras que para las mujeres no-TN fue de 55.01 ( $\pm 10.3$ ) en promedio (Tabla 1). Las frecuencias relativas acumuladas de ambos grupos fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) (Figura 11B). Las mujeres TN presentaron 82.7% de grado histológico SBR III ( $p = 0.0089$ ) (Figura 11C) y el 37.9% de recurrencia ( $p = 0.017$ ) (Figura 11D), cuando se compararon con las mujeres no-TN con 50.6% de grado histológico SBR III y 15.1% de recurrencia. Además, las mujeres TN presentan solamente etapa clínica II y III ( $p = 0.539$ ) (Figura 11E), un tamaño de tumor grande ( $p = 0.393$ ) (Figura 11F) y una frecuencia alta de ganglios linfáticos N2 ( $p = 0.935$ ) (Figura 11G); aunque, no se observaron diferencias significativas entre pacientes no-TN y TN. Las otras características clínico-patológicas y antropométricas analizadas en las mujeres con CaMa por subtipo se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características clínicas, patológicas y antropométricas de las mujeres con CaMa.

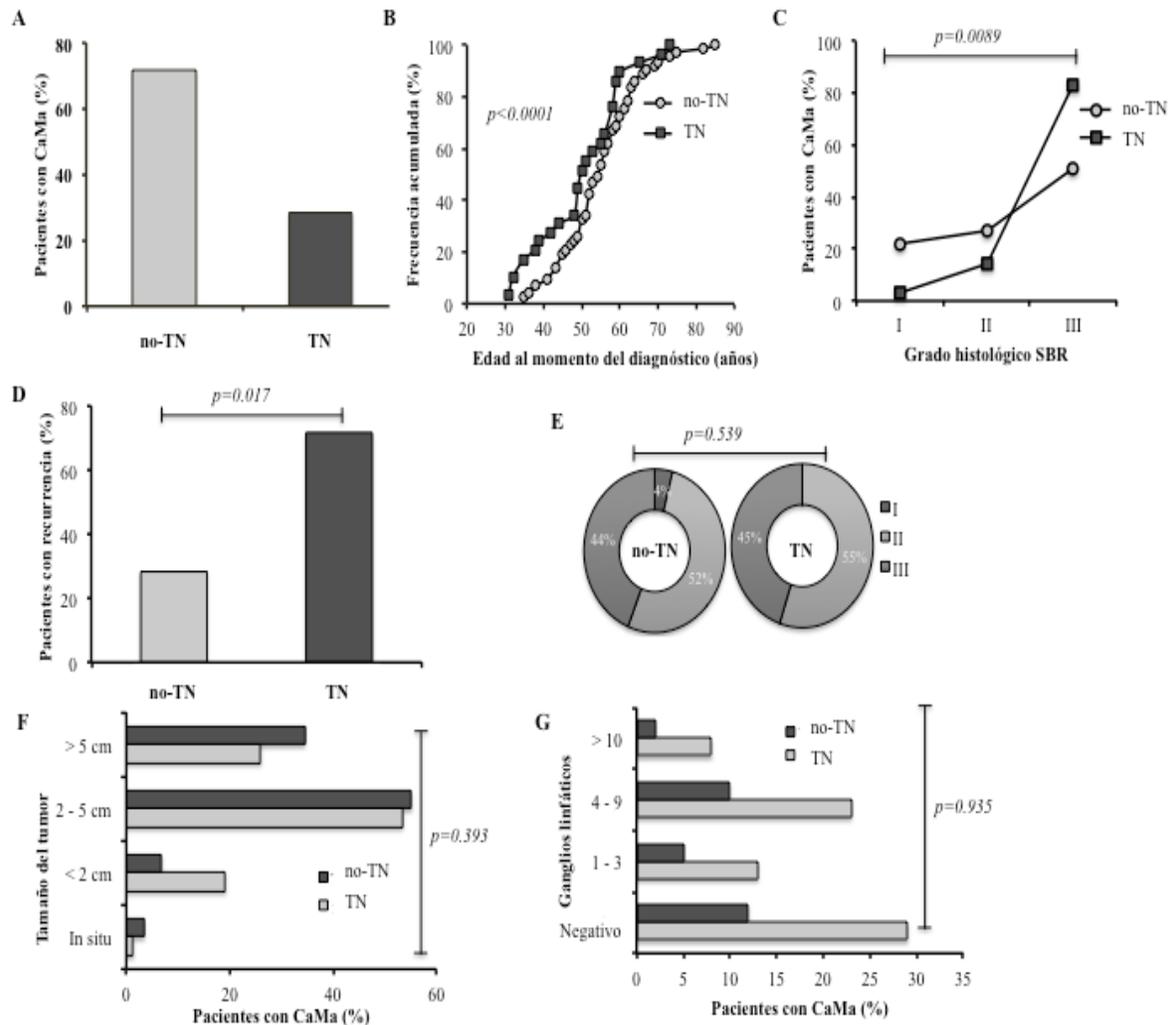
Características	no-TN (n=73)	TN (n=29)	Significancia Valor P*
<b>Edad al momento del diagnóstico (años)</b>	55.0 ( $\pm 10.3$ )	50.2 ( $\pm 11.3$ )	0.077
<b>Edad del primer embarazo (años)</b>	16.9 ( $\pm 8.4$ )	19.2 ( $\pm 7.0$ )	0.382
<b>Tiempo de supervivencia (meses)</b>	25.8 ( $\pm 0.8$ )	24.1 ( $\pm 4.0$ )	<b>0.002</b>
<b>Sobrevivencia (%)</b>	95.8	79.3	<b>0.015</b>
<b>Lactancia (%)</b>	83.6	86.2	0.777
<b>Uso de hormonas (%)</b>	28.8	34.5	0.636
<b>Antecedentes de CaMa (%)</b>	15.1	31.0	0.096
<b>Estado de menopáusico (%)</b>			



Pre-menopausia	27.4	37.9	0.343
Post-menopausia	72.6	62.1	
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup> (%)</b>			
Normal	20.5	37.9	0.176
Sobrepeso	43.8	37.9	
Obesidad	35.6	24.1	
<b>Radioterapia (%)</b>	45.2	55.2	0.130
<b>Quimioterapia adyuvante (%)</b>	91.8	100.0	0.097
<b>Esquema de quimioterapia adyuvante (%)</b>			
A/C	31.8	10.7	0.039
FAC	68.2	89.3	
<b>Recurrencia (%)</b>	15.1	37.9	<b>0.017</b>
<b>Sitio de recurrencia (%)</b>			
Locoregional	18.2	18.2	0.999
Distancia	81.8	81.8	
<b>Etapa clínica (%)</b>			
I	4.1	0.0	0.539
II	52.1	55.2	
III	43.8	44.8	
<b>Tamaño del tumor (%)</b>			
T0	1.4	3.4	0.394
T1	19.2	6.9	
T2	53.4	55.2	
T3	26.0	34.5	
<b>Ganglios linfáticos (%)</b>			
Negativos	39.7	41.4	0.935
N1	17.8	17.2	
N2	31.5	34.5	
N3	11.0	6.9	
<b>Grado histológico SBR (%)</b>			
I	21.9	3.4	<b>0.009</b>
II	27.4	13.8	
III	50.7	82.8	

IMC, índice de masa corporal; SBR, Scarff-Bloom-Richardson; A/C, Adriamicina/Ciclofosfamida; FAC, 5-Fluorouracilo, Adriamicina y Ciclofosfamida.

\* Valor de P  $\leq$  0.05 se consideró estadísticamente significativo



**Figura 11.** Características clínicas y patológicas de las mujeres con CaMa. A) Mujeres con subtipo TN y no-TN. B) Frecuencia acumulada de la edad al momento del diagnóstico, C) Grado histológico SBR, D) Recurrencia, E) Etapa clínica, F) Tamaño del tumor, G) Ganglios linfáticos. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 10.2 Alteraciones del gen *TP53* y expresión de la proteína

El supresor de tumor p53 es mutado aproximadamente en el 50% de los diferentes tipos de cáncer, nosotros evaluamos mutaciones de escala pequeña (mutaciones puntuales y deleciones) en este gen a través de secuenciación de los exones 5-8, que son frecuentemente mutados. Nosotros encontramos el 27.5% de alteraciones en el gen *p53* de las mujeres con CaMa, de las cuales el 9.8% son mutaciones



puntuales (de sentido erróneo) y el 17.7% corresponden a deleciones específicas en los exones 5-6 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Genes *p53* y *TOP2a* de las mujeres con CaMa.

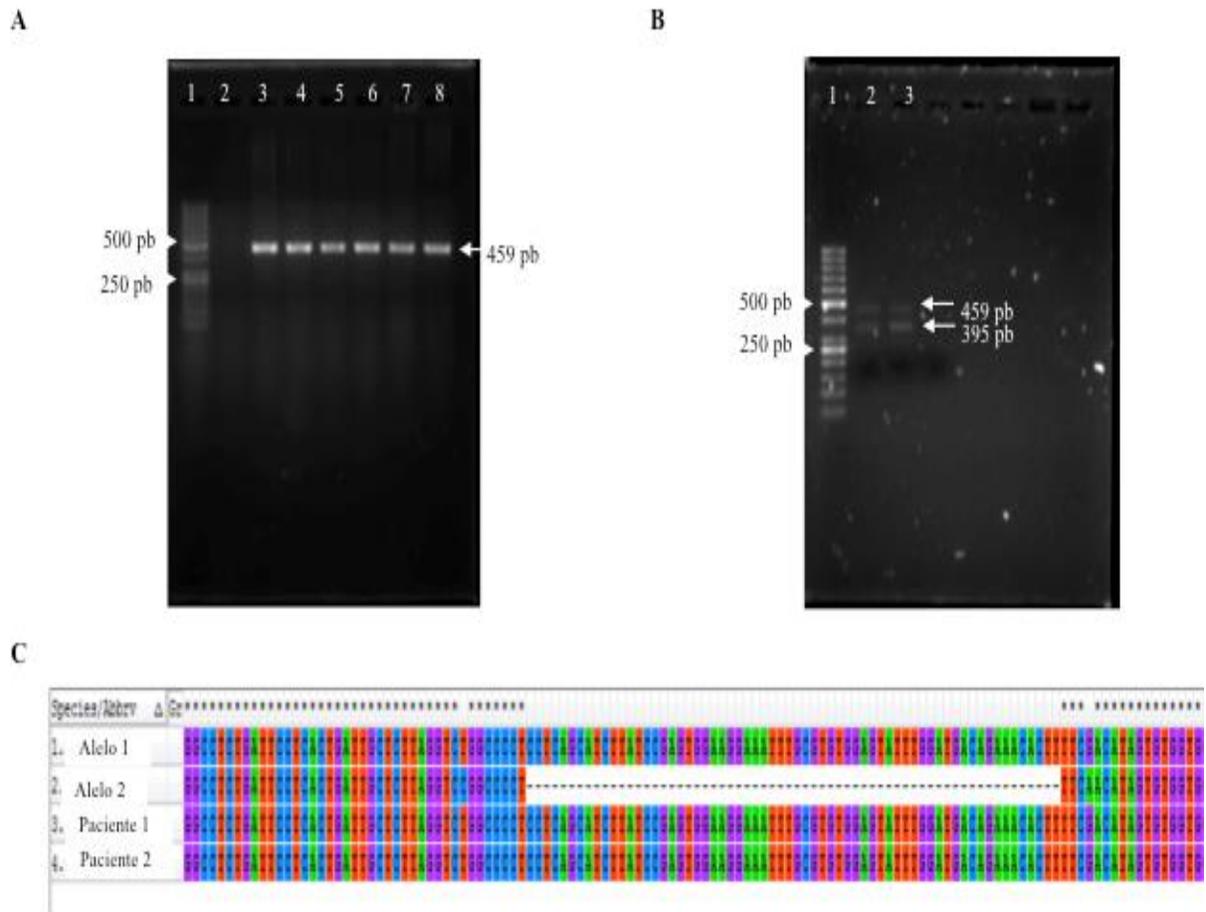
Gen	Posición	Características	Frecuencia (%) (n=102)
<b>Gen <i>TP53</i> silvestre</b>			72.5
<b>Alteraciones en el gen <i>TP53</i></b>			27.5
<b>Subcategorías de las alteraciones del gen <i>TP53</i></b>			
Mutación puntual	*Exones 5-8	Proteína truncada o cambio en un aminoácido	9.8
Delección	*Exones 5-6	Proteína trunca	17.7
<b>SNPs en el gen <i>TP53</i></b>			
SNP rs12947788	Intrón 7	No cambia la expresión de la proteína	25.5
SNP rs12951053	Intrón 7	No cambia la expresión de la proteína	25.5
<b>Gen <i>TOP2a</i> silvestre</b>			67.6
<b>Alteraciones en el gen <i>TOP2a</i></b>			32.4
<b>Subcategorías de las alteraciones del gen <i>TOP2a</i></b>			
Delección	Gen	No hay expresión de la proteína	20.6
Amplificación	Gen	Modifica la expresión de la proteína (disminución o sobreexpresión)	11.8

\* Se secuenciaron del exón 5-8 del gen *TP53* gene.

La mayoría de los amplicones de PCR correspondientes a los exones 5-6 muestran un patrón de migración similar por electroforesis (459 pb, peso molecular esperado); sin embargo, en algunas mujeres observamos 2 amplicones uno que corresponde al peso molecular esperado y otro de ~395 pb, sugiriendo que un



alelo presenta una delección (Figura 12A). Nosotros identificamos una delección ~64 pb ubicada en los codones 191-216 (exón 6) (Figura 12B).

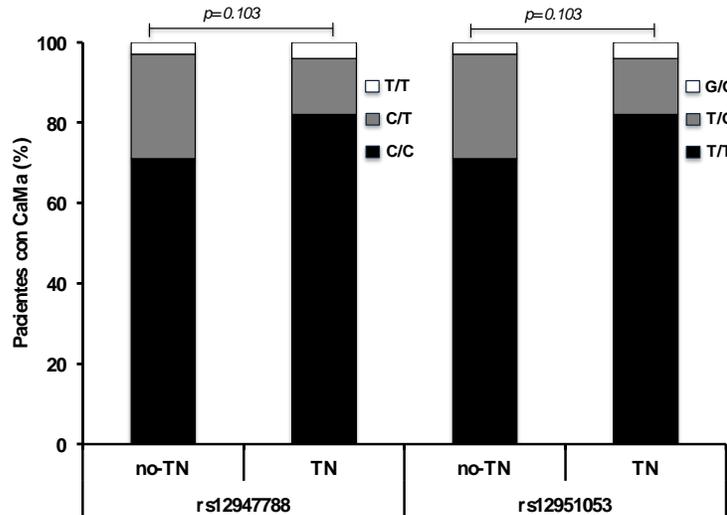


**Figura 12.** PCR (Polymerase Chain Reaction) y secuencia del gen *TP53* exones 5-6. A) Productos de PCR de los exones 5-6: carril 3-8 mujeres sin mutación puntual ni delección, carril 1 marcador de peso molecular y carril 2 control negativo de la PCR. B) Productos de PCR de los exones 5-6: carriles 2-3 mujeres con delección en 1 alelo, carril 1 marcador de peso molecular y carril 4 control negativo de la PCR.

Adicionalmente, a través de la secuenciación identificamos 2 SNPs rs1294778 y rs12951053 localizados en el intrón 7, ambos con una frecuencia del 25.4% en la población de estudio (Tabla 2). Ambos SNPs se identificaron en las mismas pacientes y el genotipo los SNP's (homocigoto o heterocigoto) es igual; sin embargo, no observamos diferencias significativas cuando se comparan por subtipo (Figura 13). Además, tampoco identificamos diferencias significativas en



las mutaciones puntuales o deleciones del gen *TP53* entre las mujeres TN y no-TN ( $p=0.0655$ ) (Figura 14A).



**Figura 13.** Frecuencia de SNP's (rs2947788 y rs12951053) en el intrón 7 del gen *TP53* de las mujeres con CaMa.

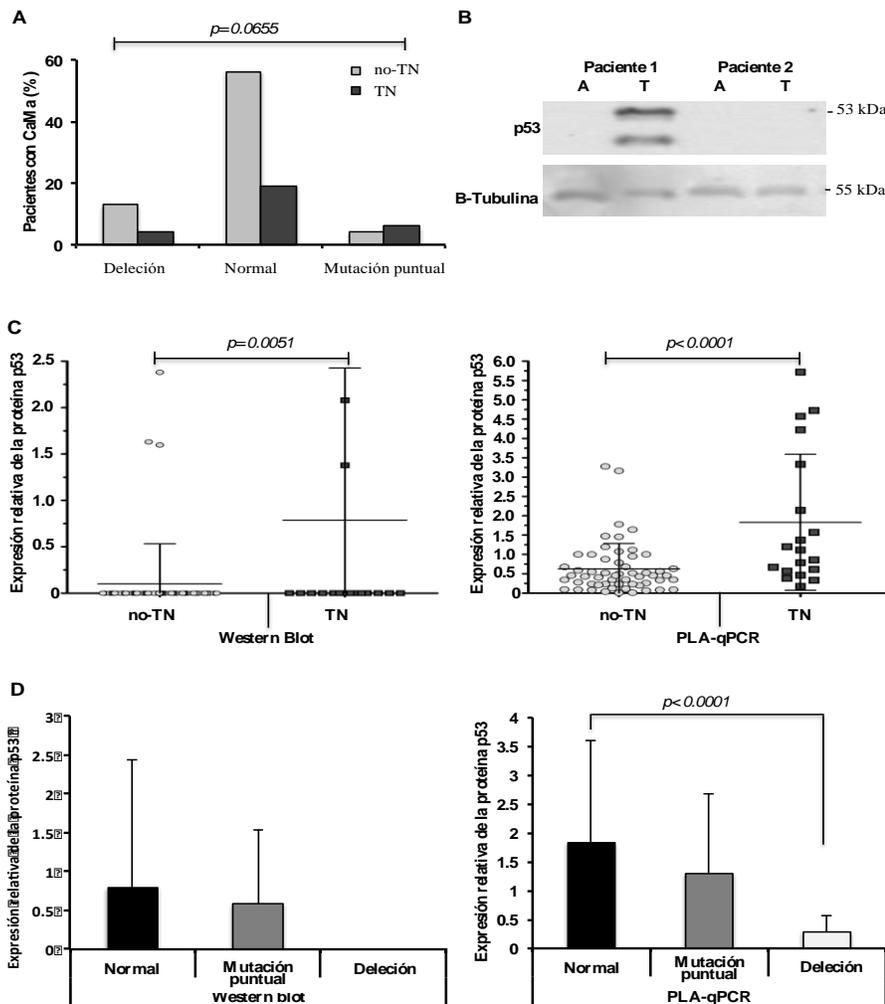
Para determinar si las mutaciones puntuales o las deleciones en el gen *TP53* modifican la expresión de su proteína, todas las muestras de CaMa se analizaron por Western blot. Una imagen representativa de Western blot de la proteína p53 se muestra en la Figura 14B. Cuando se compararon los niveles de expresión de la proteína p53, nosotros observamos una diferencia estadísticamente significativa con un promedio de  $0.78 (\pm 1.63)$  en las mujeres TN ( $p=0.005$ ) comparado con las mujeres no-TN (promedio  $0.10 \pm 0.43$ ) (Figura 14C). La expresión relativa de la proteína p53 se normalizo utilizando como control de carga (B-Tubulina), porque los niveles de expresión de la proteína p53 en el tejido adyacente tienen una vida media corta y no se pudieron detectar con esta técnica. En contraste, las proteínas mutantes de p53 se caracterizan por tener una vida media larga (Fountzilias G, 2016; Kim JY, 2016).

Posteriormente, nosotros validamos los resultados de la proteína p53 utilizando PLA-qPCR, una técnica más sensible que Western blot. Nosotros encontramos que la expresión de la proteína p53 en promedio fue de  $1.83 (\pm 1.75)$  en las



mujeres TN y 0.62 ( $\pm 0.65$ ) en las mujeres no-TN, la diferencia de estos resultados fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.0001$ ) (Figura 14C).

Además, analizamos la asociación de las alteraciones genéticas de *TP53* y la expresión de la proteína p53. Nosotros observamos que las mujeres con deleciones en el gen *TP53* presentaron baja o nula expresión de la proteína p53 con ambas técnicas PLA-qPCR y Western blot (Figura 14D). Mientras que las pacientes con mutaciones puntuales en el gen *TP53* presentaron baja o sobreexpresión de la proteína p53 a través de PLA-qPCR y Western blot (Figura 14D). Algunas de las mujeres no presentaron alteraciones (mutaciones puntuales o deleciones) en los exones 5-8 pero presentaron sobreexpresión de la proteína p53. Esto puede deberse a que las mujeres con CaMa presentan mutaciones, pero están ubicadas fuera de la región analizada del gen *TP53* en este estudio (Figura 14D).

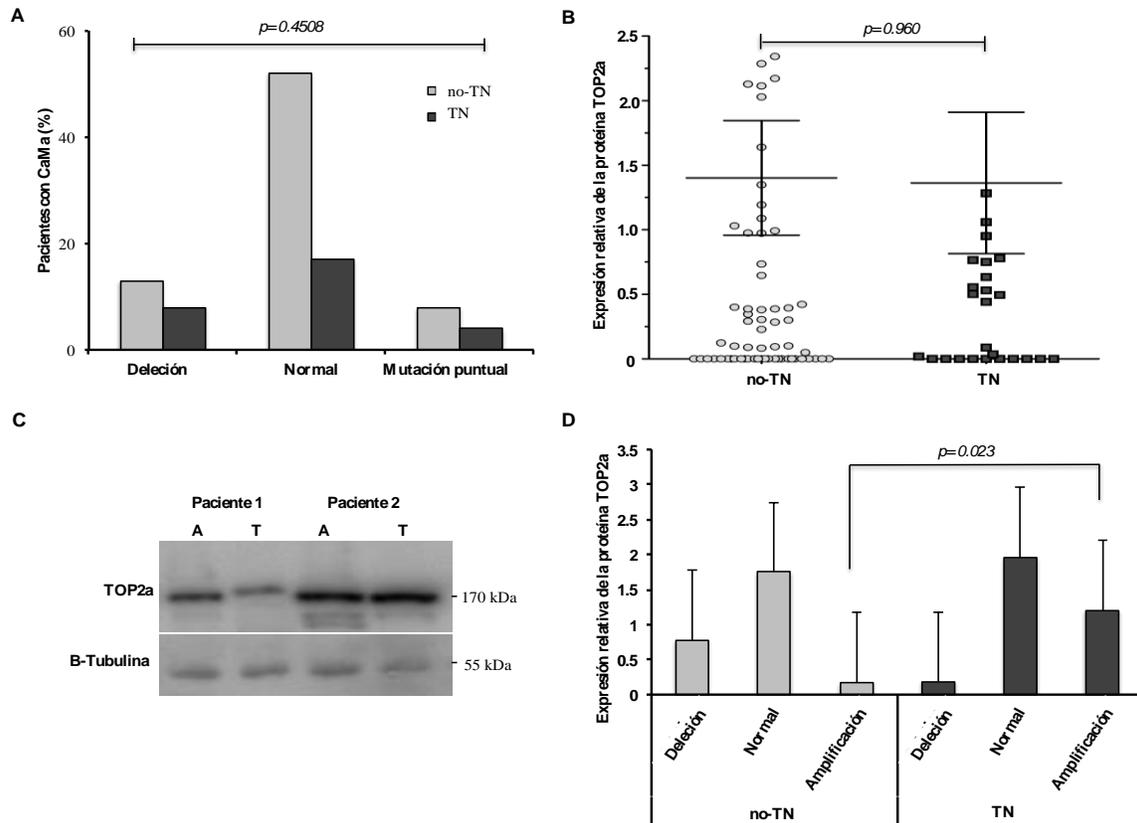




**Figura 14.** Alteraciones del gen *TP53* y expresión de la proteína en las mujeres con CaMa. A) Alteraciones (mutación puntual o delección) en el gen *TP53*. B) Imagen representativa del Western blot de la proteína p53 y B-Tubulina, A (tejido adyacente) y T (tejido de tumor). C) Expresión relativa de la proteína p53 analizada por PLA-qPCR y Western blot, D) Comparación de las alteraciones genéticas de *TP53* (eje X) y la expresión relativa de la proteína p53 (eje y) a través de Western blot y PLA-qPCR. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.  $\pm$  desviación estándar (DS).

### 10.3 Alteraciones del gen *TOP2a* y expresión de la proteína

Similar a p53, el gen *TOP2a* presenta alteraciones en cáncer. Nosotros evaluamos mutaciones de gran escala (amplificaciones o delecciones) en el gen *TOP2a* mediante qPCR. Nosotros encontramos que el 32.4% de las mujeres analizadas presentaron alteraciones en el gen, el 20.6% corresponden a delecciones y el 11.8% presentaron amplificaciones en el gen *TOP2a* (Tabla 2). Sin embargo, no observamos diferencias significativas en las delecciones ni en las amplificaciones del gen *TOP2a* cuando se compararon entre mujeres TN y no-TN ( $p=0.450$ ) (Figura 15A). Para determinar si las amplificaciones o mutaciones tienen algún efecto en la expresión de la proteína TOP2a, las biopsias de CaMa (adyacente y tumor) se analizaron mediante Western blot. Nosotros observamos que la expresión de la proteína TOP2a en promedio fue de 1.36 ( $\pm 2.95$ ) en mujeres TN y 1.40 ( $\pm 2.95$ ) en las mujeres no-TN. Ambos grupos de mujeres presentaron niveles de expresión similares de la proteína TOP2a sin diferencias significativas ( $p=0.960$ ) (Figura 15B). Una imagen representativa de Western blot de proteínas obtenidas de 2 mujeres con CaMa para TOP2a. B-Tubulina fue utilizada como control de carga (Figura 15C). Cuando comparamos las amplificaciones o delecciones con la expresión de la proteína TOP2a, nosotros observamos una expresión alta de la proteína TOP2a en mujeres que no presentan alteraciones en el gen y disminución de la proteína en mujeres que presentaron delecciones en el gen *TOP2a*. Por último, las mujeres TN con sobreexpresión de la proteína TOP2a y amplificación del gen presentaron diferencias significativas cuando se compararon con mujeres no-TN ( $p=0.023$ ) (Figura 15D).



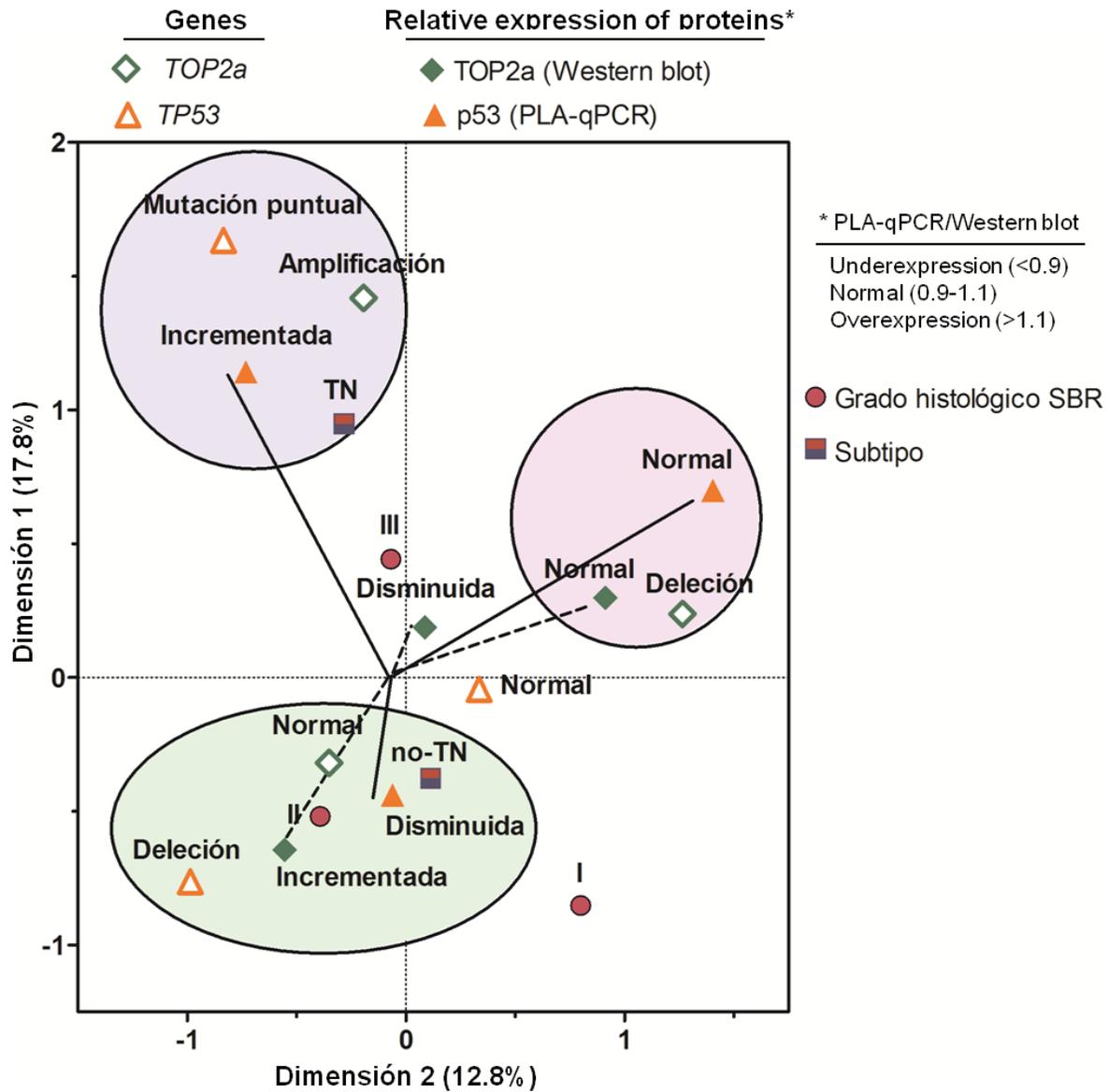
**Figura 15.** Alteraciones del gen *TOP2a* y expresión de la proteína en las mujeres con CaMa. A) Alteraciones (amplificación o delección) del gen *TOP2a*, B) Expresión relativa de la proteína *TOP2a* por subtipo. C) Imagen representativa de Western blot de la proteína *TOP2a* y B-Tubulina en 2 pacientes con CaMa, A (tejido adyacente) y T (tejido de tumor). Comparación de las alteraciones del gen *TOP2a* (eje x) y expresión relativa de la proteína a través de Western blot (eje y). Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.  $\pm$  desviación estándar (DS).

#### 10.4 Asociación de características de las mujeres con CaMa

Para determinar la asociación entre las características clínicas y patológicas (subtipo, grado histológico), alteraciones genéticas de *TP53* y *TOP2a*, y expresión de sus proteínas, se analizaron mediante MCA. Nosotros identificamos 3 grupos mediante MCA: el primer grupo son mujeres con subtipo TN que se asociaron con las mutaciones puntuales del gen *TP53* y sobreexpresión de su proteína. Además, detectamos la amplificación del gen *TOP2a* en este grupo, pero no se asoció con la expresión de la proteína *TOP2a*. El segundo grupo se asoció con mujeres no-TN, delección del gen *p53*, proteína *p53* disminuida, el gen *TOP2a* no presentó alteraciones, aunque hay sobreexpresión de su proteína y presentan el grado



histológico SBR II. El tercer grupo fueron mujeres de ambos grupos (TN, no-TN) con delección del gen *TOP2a* y expresión basal (normal) de ambas proteínas p53 y TOP2a (Figura 16).



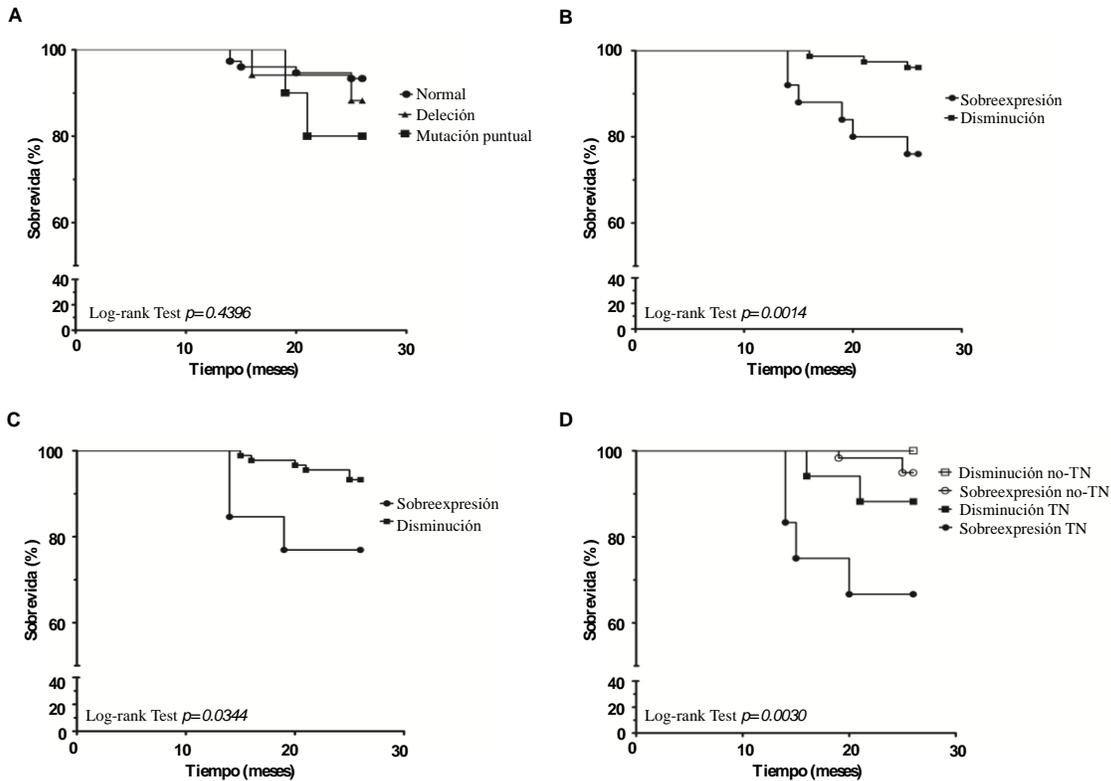
**Figura 16.** MCA (Multiple Correspondence Analysis) de las mujeres con CaMa. En este análisis observamos tres grupos: en el primero mujeres con subtipo TN con mutaciones puntuales en el gen *TP53* y su proteína incrementada, y amplificación del gen *TOP2a*. El segundo grupo son mujeres con subtipo no-TN con delección del gen *TP53* y su proteína disminuida, y la proteína *TOP2a* incrementada. El tercer grupo son mujeres de ambos subtipos, con una expresión basal de las proteínas p53 y *TOP2a*, y gen *TOP2a* deletado. La suma de la dimensión 1 y 2 representó el 30% de la variación total exhibida por los datos.



### 10.5 Análisis de sobrevida de las mujeres con CaMa

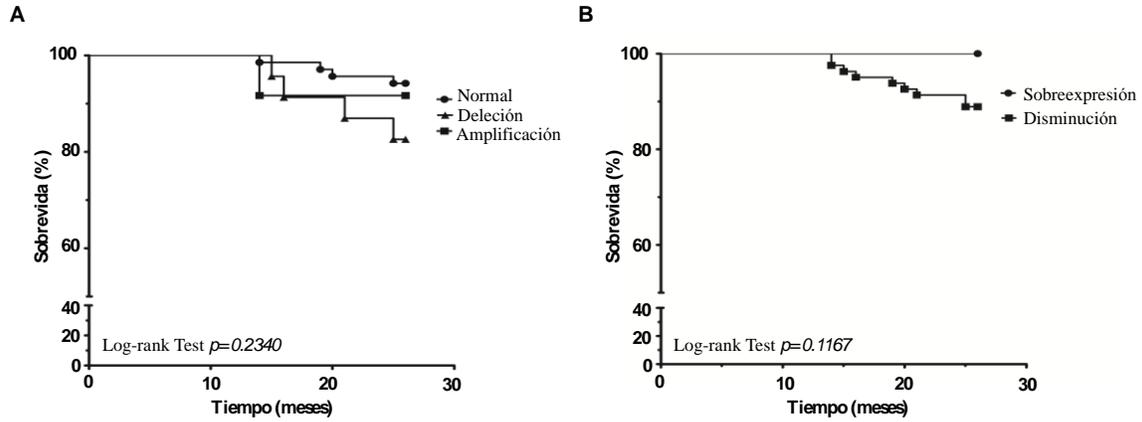
El periodo de seguimiento de las mujeres del estudio con CaMa fueron 26 meses y continúan en seguimiento. Nosotros observamos una sobrevida total del 91.2% en la población de estudio. En las mujeres TN observamos una sobrevida del 79.3% y en las mujeres no-TN del 95.8% ( $p=0.015$ ) (Tabla 1). El tiempo de sobrevida para la población de estudio en promedio fue de 25.36 meses, para las mujeres TN fue de 24.1 meses y en las mujeres no-TN de 25.8 meses ( $p=0.002$ ) (Tabla 1).

Posteriormente, nosotros analizamos el factor pronóstico de las mutaciones puntuales o deleciones en el gen *TP53*. Las mujeres con CaMa que presentaron deleción en el gen *TP53* tuvieron una sobrevida del 88.2% y las pacientes con mutaciones puntuales presentaron una sobrevida del 80%; sin embargo, ninguna alteración tuvo significancia estadística (Figura 17A). En contraste cuando analizamos la expresión de la proteína p53 a través de PLA-qPCR, nosotros observamos que la proteína p53 sobreexpresada se asocia con una menor sobrevida (76%) comparada con la proteína p53 disminuida (96%), sugiriendo que es un factor de mal pronóstico ( $p=0.0014$ ) (Figura 17B). Similarmente, cuando analizamos los niveles de expresión de la proteína p53 obtenidos mediante Western blot, observamos una asociación entre la sobreexpresión de p53 y una disminución en la sobrevida (76%,  $p=0.0344$ ) (Figura 17C). Por último, cuando analizamos la expresión de la proteína p53 por subtipo y la sobrevida, observamos que las mujeres TN con la proteína p53 incrementada presentaron menor sobrevida ( $p=0.0030$ ) (Figura 17D).



**Figura 17.** Valor pronóstico de p53 en mujeres con CaMa. A) Alteraciones del gen *TP53* (mutación puntual o delección), B) Proteína p53 disminuida o sobreexpresada mediante PLA-qPCR, C) Proteína p53 disminuida o sobreexpresada mediante Western blot, D) Proteína p53 disminuida o sobreexpresada por subtipo. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Finalmente, nosotros analizamos si la amplificación o la delección en el gen *TOP2a* son factor de mal pronóstico. Para realizar el análisis las mujeres incluidas en el estudio se dividieron en tres grupos: 1) mujeres sin alteraciones en el gen *TOP2a* (normal) con una sobrevida del 94.2%, 2) mujeres con amplificación del gen con una sobrevida del 91.6%, y 3) las mujeres con delección presentaron una sobrevida del 82.6% ( $p=0.234$ ) (Figura 18A). Con respecto a la expresión de la proteína *TOP2a*, las mujeres con la proteína disminuida tuvieron una sobrevida de 88.8% y no fue estadísticamente significativa ( $p=0.349$ ) (Figura 18B).



**Figura 18.** Valor pronóstico de TOP2a en las mujeres con CaMa. A) Alteraciones en el gen *TOP2a* (amplificación o delección), B) Proteína TOP2a disminuida o sobreexpresada. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.



## 11. DISCUSIÓN

Nosotros observamos que la sobreexpresión de la proteína p53 se asoció con una sobrevida menor y puede ser considerada un factor de mal pronóstico en mujeres mexicanas con CaMa.

En nuestro estudio, las mujeres TN se caracterizaron por ser mujeres jóvenes al momento del diagnóstico, con grado histológico SBR III y presentar recurrencia, lo cual se ha reportado previamente ([Liedtke C, 2008](#); [Lara-Medina F, 2011](#)). Además, otros estudios también han reportado una alta frecuencia de pacientes TN mexicanas o hispanas residentes de EUA ([Liedtke C, 2008](#); [Lara-Medina F, 2011](#); [Banegas MP, 2014](#)), similar a nuestros resultados.

Nosotros no encontramos relación entre las amplificaciones o deleciones y la expresión de la proteína TOP2a. Brase y col. identificaron solo una asociación en el límite entre el RNAm de TOP2a y los niveles de la proteína ([Brase JC, 2010](#)). Sin embargo, las amplificaciones o deleciones no fueron consideradas factores pronósticos como en nuestra población de estudio. Otros estudios también coinciden con nuestros resultados al no identificar diferencias estadísticas como factores pronóstico ([Qiao JH, 2015](#); [Fountzilias G, 2012](#)). Sin embargo, en otros estudios la sobreexpresión de la proteína TOP2a se considera un factor de mal pronóstico ([Brase JC, 2010](#); [Györffy B, 2010](#); [Hau W, 2015](#)).

Las mutaciones puntuales (sentido erróneo) en el gen *TP53* localizadas en el dominio de unión a ADN (exones 5-8) se han asociado con un peor pronóstico y se han considerado factores predictivos de no respuesta a los esquemas con antraciclinas ([Olivier M, 2006](#); [Fernández-Cuesta L, 2012](#)). Nosotros encontramos alteraciones (mutaciones puntuales o deleciones) del gen *TP53* con frecuencias similares a las reportadas ([Banerji S, 2012](#); [Fountzilias G, 2016](#); [Dobes P, 2014](#)). Las alteraciones más frecuentes identificadas en nuestro estudio fueron las deleciones (17%), a pesar de que las mutaciones puntuales se reportan más comúnmente. Sin embargo, similar a nuestro estudio varios reportes con diferentes tipos de cáncer también han encontrado deleciones en el gen *TP53* en un rango del 8-25% ([Dufour A, 2013](#); [Delfau-Larue MH, 2014](#); [Bazrafshani MR, 2016](#)). Nosotros observamos las deleciones solamente en los exones 5-6 del gen



*TP53*. Una muestra de ADN de una paciente fue caracterizada con una delección de 65 pb en los codones 191-216 (exón 6), que no se ha reportado en la base de datos de mutaciones en tumores para el gen *TP53* (<http://wwwp53.iarc.fr/>). Desafortunadamente, no fue posible caracterizar todas las delecciones detectadas en las mujeres del estudio debido a que la muestra biológica fue insuficiente. Acorde con previos reportes, nosotros encontramos que las mutaciones puntuales son más frecuentes en las mujeres con subtipo TN (Fountzilias G, 2016; Kim JY, 2016; Millis SZ, 2015). Además, se sabe que las mutaciones puntuales pueden incrementar la vida media de la proteína p53 y esto favorecen la sobreexpresión (Fountzilias G, 2016; Kim JY, 2016). Acorde con estos reportes, nosotros observamos sobreexpresión de la proteína p53 en las mujeres TN con mutaciones puntuales. Sin embargo, ni las mutaciones puntuales ni las delecciones en el gen *TP53* se asociaron con la sobrevida. Nosotros observamos que las mujeres con mutaciones puntuales en el gen *TP53* tienen un sobrevida menor (80%) que no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.4396$ ); sin embargo, es posible que con un tamaño de muestra más grande las mutaciones puntuales sean un factor de mal pronóstico. La sobreexpresión de la proteína p53 fue estadísticamente significativa asociada con una sobrevida menor ( $p=0.0014$ ), nosotros sugerimos que puede ser un factor de mal pronóstico en mujeres mexicanas con CaMa. Este resultado fue observado utilizando ambas técnicas para su análisis PLA-qPCR y Western blot; adicionalmente, la sobreexpresión de la proteína p53 fue de peor pronóstico en las mujeres con subtipo TN. Nuestros resultados coincide con otros estudios que reportan que la sobreexpresión de la proteína p53 es un factor de peor pronóstico en CaMa y especialmente en el subtipo TN (Yang P, 2013; Ren J, 2014; Maeda T, 2016). Por lo tanto, en el futuro se puede proponer la identificación de mujeres con subtipo TN (que por sí solo es un subtipo de mal pronóstico) que presenten sobreexpresión de la proteína p53 (como un biomarcador pronóstico) para establecer políticas de salud y sugerir un tratamiento más personalizado para este grupo.

Las mutaciones de *TP53* también se consideran factores predictivos de no respuesta a los esquemas de tratamiento con antraciclinas (Fernández-Cuesta L,



2012; Delfau-Larue MH, 2014; Lehmann BD, 2015). Por otra parte, la sobreexpresión de la proteína TOP2a se considera un factor predictivo de sensibilidad al esquema con antraciclinas, mientras que la delección del gen se asocia con un incremento a la resistencia del mismo esquema (Bartlett JM, 2010; Brase JC, 2010; Di Leo A, 2011; Won HS, 2014). Nosotros no determinamos el valor predictivo de estas moléculas con el esquema de antraciclinas, debido a que las mujeres no fueron tratadas con quimioterapia neoadyuvante en el estudio. Sin embargo, es posible que al terminó del seguimiento de 5 años de las mujeres, nosotros pudiéramos establecer una asociación entre recurrencia, alteraciones genéticas, expresión de las proteínas p53 y TOP2a, y la quimioterapia. Nosotros sugerimos que la recurrencia es el resultado de una respuesta negativa al esquema de antraciclinas porque 94.1% de las mujeres del estudio recibieron quimioterapia adyuvante que contiene antraciclinas A/C (Adrimiacina y Ciclofosfamida) y FAC (5-Fluorouracil, Adriamicina y Ciclofosfamida). Hasta el tiempo de seguimiento (26 meses) solo el 21.5% de las mujeres han presentado recurrencia, de estas el 8.1% presentaron delección del gen *TOP2a*, que se ha asociado previamente con resistencia a antraciclinas (Bartlett JM, 2010; Brase JC, 2010; Di Leo A, 2011; Won HS, 2014). Además, el 18.1% de las mujeres con recurrencia tienen sobreexpresión de la proteína TOP2a, que se considera un factor de sensibilidad a las antraciclinas (Bartlett JM, 2010; Brase JC, 2010; Di Leo A, 2011; Won HS, 2014), y el 27.2% de las mujeres con recurrencia tienen mutaciones en el gen *TP53*, que se consideran de peor pronóstico para el tratamiento de antraciclinas (Fernández-Cuesta L, 2012; Dobes P, 2014; Lehmann BD, 2015).

Finalmente, usando MCA nosotros identificamos tres grupos que definen nuestra población de estudio. El primer grupo comprende mujeres con TN y mutaciones en el gen *TP53*, sobreexpresión de la proteína p53 y amplificación del gen *TOP2a*. Este grupo reúne características de reportes previos en el que describen alteraciones en el gen *TP53*, sobreexpresión de su proteína en mujeres con TN. El segundo grupo comprende mujeres no-TN demostrando que la delección del gen *TP53* se relaciona con la disminución de su proteína, el gen *TOP2a* no presenta



alteración, pero hay sobreexpresión de su proteína y grado histológico SBR II. En este grupo se encuentran las pacientes que presentan la delección de 65 pb en el gen *TP53*, esto explica la disminución de la proteína. Por otra parte las mutantes de p53 pueden inducir la expresión de *TOP2a*, nosotros no encontramos ninguna correlación entre las mutaciones de *TP53* (sobreexpresión de p53) y sobreexpresión de la proteína TOP2a, sugiriendo que existen otros mecanismos diferentes a las mutaciones del gen *TP53* que pueden inducir o regular la expresión del gen *TOP2a* (Srikantan S, 2011; Tamaichi H, 2013). El tercer grupo incluye mujeres TN y no-TN con delecciones en el gen *TOP2a* y expresión basal de las proteínas TOP2a y p53. Este análisis nos permitió identificar grupos bien definidos de las mujeres asociadas con las características analizadas en este estudio, pero también se observan que exhiben heterogeneidad que es un sello o marca de cáncer. Además, MCA ha sido utilizado para asociar características clínico-patológicas de mujeres con cáncer (Rodriguez-Lara V, 2014). Las limitaciones de nuestro estudio es el tiempo de seguimiento corto de las mujeres (26 meses), insuficiente material genético para identificar las delecciones en todas las mujeres con alteración en el gen *TP53*, y así como determinar el valor predictivos de p53 y TOP2a. Además, es necesario validar nuestros resultados en población mexicana con un tamaño de muestra más grande.



## 12. CONCLUSIÓN

Nuestra población de estudio se caracterizó por una frecuencia alta de mujeres con subtipo TN cuyas características son: mujeres jóvenes con grado histológico SBR III, mutaciones en *TP53* y sobreexpresión de su proteína. La sobreexpresión de la proteína p53 fue asociada con una menor sobrevida en mujeres con CaMa, surgiéndose como un factor de mal pronóstico en nuestra población de estudio.

## 13. PERSPECTIVAS

Concluir el seguimiento  $\geq 5$  años de las mujeres con CaMa incluidas en el estudio y analizar nuevamente el valor pronóstico de p53 y TOP2a.

Evaluar el valor predictivo de los biomarcadores p53 y TOP2a en las mujeres con CaMa de la población de estudio con un seguimiento  $\geq 5$  años.



## 14. REFERENCIAS

1. Ali A, Shah AS, Ahmad A. Gain-of-function of mutant p53: mutant p53 enhances cancer progression by inhibiting KLF17 expression in invasive breast carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2014;354:87-96.
2. American Joint Committee on Cancer (AJCC). 8th Edition, 2016.
3. Ali Y, Abd Hamid S. Human topoisomerase II alpha as a prognostic biomarker in cancer chemotherapy. *Tumour Biol.* 2016;37:47-55.
4. Aschauer L, Muller PA. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:460-466.
5. Azuma Y, Arnaoutov A, Dasso M. SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol.* 2003;163:477-487.
6. Banegas MP, Tao L, Altekruze S, Anderson WF, John EM, Clarke CA, Gomez SL. Heterogeneity of breast cancer subtypes and survival among Hispanic women with invasive breast cancer in California. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;144:625-634.
7. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, *et al.* Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature.* 2012;486:409-409.
8. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, McConkey C, Jordan S, Twelves CJ, *et al.* Predictive markers of anthracycline benefit: A prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). *Lancet Oncol.* 2010;11:266-274.
9. Bazrafshani MR, Nowshadi PA, Shirian S, Daneshbod Y, Nabipour F, Mokhtari M, *et al.* Deletion/duplication mutation screening of TP53 gene in patients with transitional cell carcinoma of urinary bladder using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cancer Med.* 2016;5:145-152.
10. Belluti S, Basile V, Benatti P, Ferrari E, Marverti G, Imbriano C. Concurrent inhibition of enzymatic activity and NF- $\kappa$ B-mediated transcription of Topoisomerase-II $\alpha$  by bis-DemethoxyCurcumin in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2013;4:e756.



11. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:359-370.
12. Biesaga B, Niemiec J, Ziobro M, Wysocka J, Kruczak A. Prognostic potential of topoisomerase II $\alpha$  and HER2 in a retrospective analysis of early advanced breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline chemotherapy. *Breast*. 2011;20:338-350.
13. Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, Sültmann H, Bojar H, Koelbl H, *et al*. ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction. *Clin Cancer Res*. 2010;16:2391-2401.
14. Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:701-713.
15. Chen J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6:a026104.
16. Chen T, Sun Y, Ji P, Kopetz S, Zhang W. Topoisomerase II $\alpha$  in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene*. 2015;34:4019-4031.
17. Chikamori K, Grabowski DR, Kinter M, Willard BB, Yadav S, Aebersold RH, *et al*. Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem*. 2003;278:12696-12702.
18. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*. 1994; 265:346-355.
19. Dahabreh IJ, Schmid CH, Lau J, Varvarigou V, Murray S and Trikalinos TA: Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: A systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. *Am J Epidemiol* 177: 1317-1325, 2013.
20. Delfau-Larue MH, Klapper W, Berger F, Jardin F, Briere J, Salles G, *et al*: High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2014;125:604-611.



21. Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, Piette F, Ejlertsen B, Pritchard KI, *et al.* HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: A meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2011;12:1134-1142.
22. Dobes P, Podhorec J, Coufal O, Jureckova A, Petrakova K, Vojtesek B, Hrstika R. Influence of mutation type on prognostic and predictive values of TP53 status in primary breast cancer patients. *Oncol Rep.* 2014;32:1695-1702.
23. Dufour A, Palermo G, Zellmeier E, Mellert G, Duchateau-Nguyen G, Schneider S, *et al.* Inactivation of TP53 correlates with disease progression and low miR-34a expression in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood.* 2013;121:3650-3657.
24. Escargueil AE, Plisov SY, Filhol O, Cochet C, Larsen AK. Mitotic phosphorylation of DNA topoisomerase II alpha by protein kinase CK2 creates the MPM-2 phosphoepitope on Ser-1469. *J Biol Chem.* 2000; 275:34710-34718.
25. Fernández-Cuesta L, Oakman C, Falagan-Lotsch P, Smoth K, Quinaux E, Buyse M, *et al.* Prognostic and predictive value of TP53 mutations in node-positive breast cancer patients treated with anthracycline- or anthracycline/taxane-based adjuvant therapy: results from the BIG 02/98 phase III trial. *Breast Cancer Res.* 2012;14:R70.
26. Fontemaggi G, Dell'Orso S, Trisciuglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, *et al.* The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16:1086-1093.
27. Fountzilas G, Christodoulou C, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Xanthakis I, *et al.* Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *J Transl Med.* 2012;10:212.
28. Fountzilas G, Giannoulatou E, Alexopoulou Z, Zagouri F, Timotheadou E, Papadopoulou K, *et al.* TP53 mutations and protein immunopositivity may predict for poor outcome but also for trastuzumab benefit in patients with early breast cancer treated in the adjuvant setting. *Oncotarget.* 2016;7:32731-32753.
29. Frazier MW, He X, Wang J, Gu Z, Cleveland JL, Zambetti GP. Activation of c-



- myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol. Cell Biol.* 1998;18:3735-3743.
30. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell Biol.* 2001; 21:1874-1887.
  31. Garcia PB, Attardi LD. Illuminating p53 function in cancer with genetically engineered mouse models. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;27:74-85.
  32. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect to 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123: 725-731.
  33. Hau W, Sa KD, Zhang X, Jia LT, Zhao J, Yang AG, *et al.* MicroRNA-139 suppresses proliferation in luminal type breast cancer cells by targeting Topoisomerase II alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463:1077-1083.
  34. He C, Li L, Guan X, Xiong L, Miao X. Mutant p53 Gain of Function and Chemoresistance: The Role of Mutant p53 in Response to Clinical Chemotherapy. *Chemotherapy.* 2017;62:43-53.
  35. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget.* 2017;8:8921-8946.
  36. Hill MO. Correspondence analysis: a neglected multivariate method. *Appl Stat.* 1974;3:340-354.
  37. Huszno J, Grzybowska E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2018 Jul;16(1):34-40.
  38. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
  39. <http://www.p53.iarc.fr/>
  40. Iida M, Matsuda M, Komatani H. Plk3 phosphorylates topoisomerase IIalpha at Thr(1342), a site that is not recognized by Plk1. *Biochem J.* 2008;411:27-32.
  41. Joshi AA, Wu Z, Reed RF, Suttle DP. Nuclear factor-Y binding to the topoisomerase II alpha promoter is inhibited by both the p53 tumor suppressor and anticancer drugs. *Mol Pharmacol.* 2003;63:539-367.



42. Khromova NV, Kopnin PB, Stepanova EV, Agapova LS, Kopnin BP. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett.* 2009;276:143-151.
43. Kim JY, Park K, Jung HH, Lee E, Cho EY, Lee KH, *et al.* Association between mutation and expression of TP53 as a potential prognostic marker of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat.* 2016;48:1338-1350.
44. Lara-Medina F, Pérez-Sánchez V, Saavedra-Pérez D, Blake-Cerda M, Arce C, Motola-Kuba D, *et al.* Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer.* 2011;117:3658-3669.
45. Lehmann BD, Ding Y, Viox DJ, Jiang M, Zheng Y, Liao W, *et al.* Evaluation of public cancer datasets and signatures identifies TP53 mutant signatures with robust prognostic and predictive value. *BMC Cancer.* 2015;15:179.
46. Liedtke C, Mazouni C, Hess KS, André F, Tordai A, Mejia JA, *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:1275-1281.
47. Maeda T, Nakanishi Y, Hirotani Y, Fuchinoue F, Enomoto K, Sakurai K, *et al.* Immunohistochemical co-expression status of cytokeratin 5/6, androgen receptor, and p53 as prognostic factors of adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer. *Med Mol Morphol.* 2016;49:11-21.
48. Millis SZ, Gatalica Z, Winkler J, Vranic S, Kimbrough J, Reddy S, *et al.* Predictive biomarker profiling of > 6000 Breast Cancer patients shows heterogeneity in TNBC, with treatment implications. *Clin Breast Cancer.* 2015;15:473-481.
49. Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, *et al.* Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.* 2004;119:847-860.
50. Olivier M, Hollstein M and Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a001008.



51. Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, *et al.* The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1157-1167.
52. Oren M, Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2:a001107.
53. Pandya S, Moore RG. Breast development and anatomy. *Clin Obstet Gynecol.* 2011;54:91-95.
54. Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007;26:2157-2165.
55. Qi X, Hou S, Lepp A, Li R, Basir Z, Lou Z, Chen G. Phosphorylation and stabilization of topoisomerase II $\alpha$  protein by p38 $\gamma$  mitogen-activated protein kinase sensitize breast cancer cells to its poisons. *J Biol Chem.* 2011;286:35883-35890.
56. Qiao JH, Jiao DC, Lu ZD, Yang S, Liu ZZ. Clinical significance of topoisomerase 2A expression and gene change in operable breast cancer. *Tumor Biol.* 2015;36:6833-6838.
57. Ren J, Chen QC, Jin F, Wu HZ, He M, Zhao L, *et al.* Overexpression of Rsf-1 correlates with pathological type, p53 states and survival in primary breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:5595-5608.
58. Rodriguez-Lara V, Peña-Mirabal E, Baez-Saldaña R, Esparza-Silva AL, García-Zepeda E, Cerbon-Cervantes MA, *et al.* Estrogen receptor beta and CXCR4/CXCL12 expression: differences by sex and hormonal status in lung adenocarcinoma. *Archives Med Res.* 2014;45:158-169.
59. Rybenkov VV, Ullsperger C, Vologodskii AV, Cozzarelli NR. Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases. *Science,* 1997; 277:690-693.
60. Samassekou O, Bastien N, Lichtensztein D, Yan J, Mai S, Drouin R. Different TP53 mutations are associated with specific chromosomal rearrangements, telomere length changes, and remodeling of the nuclear architecture of telomeres. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53:934-950.



61. Sandri MI, Isaacs RJ, Ongkeko WM, Harris AL, Hickson ID, Brogginini M *et al.* p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:4464-4470.
62. Shapiro PS, Whalen AM, Tolwinski NS, Wilsbacher J, Froelich-Ammon SJ, Garcia M, *et al.* Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase II alpha through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1999;19:3551-3560.
63. Shinagawa H, Miki Y, Yoshida K. BRCA1-mediated ubiquitination inhibits topoisomerase II alpha activity in response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:939-949.
64. Srikantan S, Abdelmohsen K, Lee EK, Tominaga K, Subaran SS, Kuwano Y, *et al.* Translational control of TOP2A influences doxorubicin efficacy. *Mol Cell Biol.* 2011;31:3790-3801.
65. Tamaichi H, Sato M, Porter AC, Shimizu T, Mizutani S, Takagi M. Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and sensitivity to topoisomerase II inhibitor. *Cancer Sci.* 2013;104:178-184.
66. Tsai SC, Valkov N, Yang WM, Gump J, Sullivan D, Seto E. Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat Genet.* 2000;26:349-353.
67. Turashvili G, Brogi E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:227.
68. Wang Q, Zambetti GP, Suttle DP. Inhibition of DNA topoisomerase II $\alpha$  gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol.* 1997;17:389-397.
69. Wang W, Cheng B, Miao L, Mei Y, Wu M. Mutant p53-R273H gains new function in sustained activation of EGFR signaling via suppressing miR-27a expression. *Cell Death Dis.* 2013;4:e574.
70. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol.* 2010;4:192-208.
71. Weisz L, Damalas A, Lontos M, Karakaidos P, Fontemaggi G, Maor-Aloni R, *et al.* Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67:2396-2401.



72. Won HS, Lee KE, Sung SH, Choi MY, Jo JY, Nam EM, *et al.* Topoisomerase II alpha and microtubule associated protein-tau as a predictive marker in axillary lymph node positive breast cancer. *Tumori*. 2014;100:80-86.
73. Wong E. Breast cancer pathogenesis and histologic vs. molecular subtypes. Posted December 29, 2012.
74. Yang P, Du CW, Kwan M, Liang SX, Zhang GJ. The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. *Sci Rep*. 2013;3:2246.
75. Zheng H, Li X, Chen C, Chen J, Sun J, Sun S, *et al.* Quantum dot-based immunofluorescent imaging and quantitative detection of TOP2A and prognostic value in triple-negative breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:5519-5529.
76. Zhou G, Wang J, Zhao M, Xie TX, Tanaka N, Sano D, *et al.* Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation. *Mol Cell*. 2014;54:960-974.
77. Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, Barsyte-Lovejoy D, Alawar R, *et al.* Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature*. 2015; 525:206-212.



## 15. ARTÍCULO



## Overexpression of p53 protein is a marker of poor prognosis in Mexican women with breast cancer

JISELA DIMAS-GONZÁLEZ<sup>1</sup>, VILMA MALDONADO-LAGUNAS<sup>1</sup>, JOSÉ DÍAZ-CHÁVEZ<sup>2</sup>,  
MARÍA EUGENIA LÓPEZ-ARELLANO<sup>3</sup>, JOSÉ MUÑOZ-CAMACHO<sup>4</sup>,  
MARCO ANTONIO TERÁN-PORCAYO<sup>4\*</sup> and ALFREDO LAGUNAS-MARTÍNEZ<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Genomic Medicine, México City, México; <sup>2</sup>National Cancer Institute, México City, México;

<sup>3</sup>National Institute for Forestry, Agriculture and Livestock Research, Jiutepec, Morelos, México;

<sup>4</sup>State Cancer Institute 'Dr. Arturo Beltrán Ortega', Acapulco, Guerrero, México;

<sup>5</sup>National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos, México

Received November 30, 2016; Accepted February 2, 2017

DOI: 10.3892/or.2017.5553

**Abstract.** Breast cancer (BC) is a disease with different clinical, histological and molecular characteristics, frequently presenting mutated tumour-suppressing genes and oncogenes. P53 is a known tumour suppressor that is often mutated in BC; several mutations in p53 inhibit its role as a transcriptional repressor of several oncogenes. Topoisomerase 2 $\alpha$  (TOP2 $\alpha$ ) is a gene target of p53, and it is also a known target for anthracyclines. The aim of the present study, was to analyse the genetic alterations of p53 and TOP2 $\alpha$  genes and their levels of protein expression, as well as their association with survival in Mexican women with BC. A total of 102 biopsies were collected (tumour and adjacent tissues) from patients with BC. To identify point mutations and deletions in the p53 gene, the Sanger sequencing method was carried out. Deletions or amplifications for TOP2 $\alpha$  gene were determined using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In addition, the expression of the TOP2 $\alpha$  and p53 proteins was evaluated by western blotting. Furthermore, p53 protein expression was analysed by proximity ligation assay (PLA)-qPCR. Only 28.5% of the patients were found to have triple-negative breast cancer (TNBC); the average age at the time of diagnosis of these patients was 50 years, and Scarff-Bloom-Richardson (SBR) histological grade III (p=0.0089). No differences in point mutations or deletions in p53, and deletions or amplifications as well as protein

expression level of TOP2 $\alpha$  were observed between patients with TNBC and non-TNBC patients. However, patients with TNBC showed p53 protein overexpression as determined by PLA-qPCR and western blotting (p<0.0001). Furthermore, we found an association between TOP2 $\alpha$  amplification and overexpression of its protein in patients with TNBC (p<0.0001). Concerning p53, overexpression resulted in a lower survival in patients with BC.

### Introduction

Breast cancer (BC) is a complex and biologically heterogeneous disease, presenting diverse histopathological, clinical and molecular characteristics whose importance must be highlighted when determining its prognosis and treatment outcome. Through immunochemistry, BC is classified as hormone receptor (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>)-positive, human epidermal growth factor receptor-2 (HER2<sup>+</sup>)-positive and triple-negative (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> and HER2<sup>-</sup>). Approximately 21-27% of BC tumours possess a mutated p53 gene (1-4).

P53 plays an important role in cell growth arrest, cell death, DNA repair, invasion and metastasis (5). P53 is a tumour suppressor gene whose protein possesses three domains: trans-activating, DNA binding and oligomerization (6). To date, ~4,250 p53 gene mutations have been reported in BC tumours; ~90% of these mutations are found within the DNA binding domain of p53, and these are associated with worse prognosis and poor response to anthracycline treatment [<http://www.p53.iarc.fr/>] (1,7). Previous studies have demonstrated that p53 mutants favour cancer development; e.g., p53<sup>wild</sup> acts as a transcriptional repressor of the TOP2 $\alpha$  gene. However, p53 mutants fail to inhibit the expression of TOP2 $\alpha$ , thus, promoting the carcinogenic process (8,9). Overexpression of the topoisomerase 2 $\alpha$  (TOP2 $\alpha$ ) protein is considered a predictive factor with respect to anthracycline sensitivity, whereas its deletion status is associated with increased resistance to the same drug (10-13). Conversely, underexpression of the TOP2 $\alpha$  protein is considered to be a good prognosis factor (14,15).

Despite its potential usefulness through its utilization as a predictive and prognostic factor for p53, and TOP2 $\alpha$  is

*Correspondence to:* Dr Marco Antonio Terán-Porcayo, State Cancer Institute 'Dr. Arturo Beltrán Ortega', Acapulco, Guerrero 39670, México

E-mail: teranporcayo@yahoo.com.mx

M.Sc. Alfredo Lagunas-Martínez, National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos 62100, México

E-mail: alagunas@insp.mx

\*Contributed equally

**Key words:** breast cancer, p53, TOP2 $\alpha$ , TNBC, amplification, deletion, point mutation



inconsistent in several studies. Unfortunately, in Mexican women with BC, these markers not have been studied. In the present study population, we found that p53 protein overexpression could be considered a factor for poor prognosis in Mexican women with BC.

## Materials and methods

**Patients.** A total of 102 biopsies were collected *de novo* (adjacent and tumour tissues) from patients with BC between September 2011 and December 2012 at the Instituto Estatal de Cancerología (IECan) Dr. Arturo Beltrán Ortega, a Tertiary-Level Hospital (Acapulco, Guerrero, Mexico). Inclusion criteria were the following: patients who voluntarily accepted to be part of the study and who signed an informed consent letter; patients residing in the state of Guerrero; patients of any age at the time of diagnosis of invasive ductal carcinoma (range 31-85 years); clinical stage I, II and III, patients not currently under neoadjuvant treatment, and diagnosis of BC confirmed by the hospital's pathology department. Medical records were checked thoroughly to obtain the patients' clinicopathological and gynaecological characteristics. The exclusion criteria were as follows: presence of cancer antecedents, recurrence of cancer and/or pregnancy. The elimination criteria were as follows: insufficient biopsy material and incomplete clinical history. The project was evaluated and approved by the IECan Ethics and Research Committee.

**Classification of genetic alterations.** We investigated the genetic alterations of *p53* and *TOP2a*, which were classified as: small-scale mutations (point mutations and deletions) for *p53* gene and large-scale mutations (amplifications or deletions) for *TOP2a* gene.

**Genomic DNA extraction.** Genomic DNA was extracted from breast tissue biopsies (adjacent and tumour tissues) using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The genomic DNA obtained was quantified, and its integrity was verified by GAPDH end-point PCR.

**Protein extraction.** Total protein was extracted from breast tissue biopsies (adjacent and tumour tissues) using an Ambion PARIS kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The proteins were quantified using a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA), and their integrity was verified by resolving the proteins in 8% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie staining.

**End-point PCR and sequencing.** To amplify the DNA binding domain of p53 (exons 5-8), two sets of primers were designed using Primer Express ver. 3.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). One set of primers amplifies a 459 bp fragment from exons 5-6 (F, 5'-TTCCCTCTCCTACAGTAC-3' and R, 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCA-3'); the second set amplifies a 510-bp fragment from exons 7-8 (F, 5'-GTGTTATCTCCTAGGTTG-3' and R, 5'-TCCTCCACCGCTTCTTGT-3'). PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's

instructions. The amplicons obtained were quantified and sequenced in a Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). The sequences were analysed using MEGA6 software.

**TOP2a copy number evaluation (amplification and deletion) through qPCR.** Copy number of the *TOP2a* gene were analysed by performing duplex reactions in triplicate using 20 ng of genomic DNA (obtained from adjacent or tumour tissues), a *TOP2a* TaqMan Copy Number Assay probe labelled with FAM, a *RNase P* TaqMan Copy Number Reference probe labelled with VIC, and TaqMan Genotyping Master Mix (all from Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The Ct values obtained were analysed using CopyCaller ver. 2.0 software (Applied Biosystems). The method was validated by performing standard curves generated by serial dilutions of the genomic DNA (1,000-0.1 ng) in triplicate. As a diploid copy number control, genomic DNA was extracted from pooled peripheral-blood samples of healthy women (n=5). As a positive amplification control, genomic DNA from the breast-cancer cell line SKBR3 was utilized.

**Proximity ligation assay and qPCR (PLA-qPCR).** To perform the proximity ligation assay (PLA), 200 nM aliquots of the probes 3' Prox-Oligo and 5' Prox-Oligo (Applied Biosystems) were separately incubated with 200 nM biotinylated polyclonal p53 antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for 60 min at room temperature. Afterward, Assay Probe Storage Buffer was added and incubated for 30 min at room temperature. One microgram of total protein extract (from adjacent or tumour tissue) was incubated overnight with 250 pmol of the probes 3' and 5' Prox-Oligo antibody conjugated at 4°C. Next, the ligation mix was added to each tissue lysate containing total protein. The ligation reaction was incubated for 10 min at 37°C and after this, at 4°C for an additional 10 min. Finally, the reaction mix was supplemented with protease, incubated for 10 min at 37°C, inactivated at 95°C for 5 min and maintained overnight at 4°C (Applied Biosystems). The qPCR assay was performed using the TaqMan® Protein Assays Fast Master Mix (Applied Biosystems) and 9 µl of the protein lysate obtained from the PLA assay. PCR conditions were as follows: 2 min at 95°C and 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. Ct values were imported into ProteinAssist™ software v1.0 (Applied Biosystems), in which the relative quantification analysis was performed. Prior to analysis of the protein lysates, a dynamic range was elaborated, and the reaction efficiency was verified with a serial dilution standard curve in triplicate. The cut-off limit for the relative expression of the p53 protein was <1.0 for underexpression and >1.0 for overexpression.

**Western blotting.** Thirty micrograms of total protein (from adjacent and tumour tissues) were resolved in a 10% SDS-PAGE gel. The proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and blocked with 5% non-fat milk for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated overnight with polyclonal rabbit anti-human TOP2a antibody (Abcam, Cambridge, UK) or monoclonal mouse anti-human p53-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) at 4°C. The membranes were washed three times with TBS/Tween-20 0.1%. Additionally, the membrane employed for TOP2a detec-



tion was incubated for an additional 1 h with a secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Protein detection was performed using the reagent SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), and the chemiluminescent signal was detected using a VersaDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The monoclonal mouse anti-human  $\beta$ -tubulin antibody (Sigma Chemical Co.) was employed as a loading control. The densitometric analysis was performed using ImageJ software. TOP2 $\alpha$  protein expression was normalized against the loading control ( $\beta$ -tubulin); then, TOP2 $\alpha$  expression in the tumour tissue was normalized against the adjacent tissue. P53 protein expression was analysed in all samples (adjacent and tumour tissues), but detection was only identified in the tumour samples. In this case, the p53 protein was normalized only against the loading control ( $\beta$ -tubulin), since the half-life of the p53 protein is short, and it was not possible to detect its expression in the adjacent tissue.

**Immunohistochemistry.** To determine the presence of the estrogen, progesterone and HER2 receptors, 5- $\mu$ m-thick sections were obtained from paraffin-embedded tissue. The primary antibodies used were the monoclonal mouse anti-human estrogen receptor clone 1D5 (Biocare Medical, Concord, CA, USA), the monoclonal mouse anti-human progesterone receptor clone PgR 636, and the polyclonal rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein (both from Dako, Carpinteria, CA, USA). The detection system utilized was the mouse/rabbit UnoVue HRP/DAB detection system (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA). For each biopsy, a previously selected positive control was also analysed by the pathologist as an internal quality control. Data interpretation was performed using the Allred system, and for HER2, cells were defined as 3+ positive, 2+ intermediate and 0-1+ negative. HER2 biopsies with intermediate values (2+) were outsourced to an immunohistochemistry and molecular pathology laboratory (INMUNO Q, México, D.F) for validation by means of a Silver *In Situ* Hybridization (SISH) assay.

**Statistical analysis.** Patients were subdivided into two groups: non-TNBC patients, expressing at least one of the receptors (RE, RP or HER2) and TNBC, lacking all of these receptors. To compare clinical and pathological variables, point mutation or deletion in *p53* gene, amplification or deletion in *TOP2a* gene, and SNPs in *p53* gene by groups, we used an  $\chi^2$  test. Age at the time of diagnosis was compared with a non-linear Gaussian adjustment for accumulated relative frequencies. The relative expression of the TOP2 $\alpha$  and p53 proteins determined through western blotting and/or PLA-qPCR, were analysed by the multiple Student's t-test. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the relative expression of the p53 and TOP2 $\alpha$  proteins vs. genetic alterations of these genes. In all cases,  $p < 0.05$  was considered to be significant.

In addition, a multiple correspondence analysis (MCA) was used (16), which is a descriptive method to determine the relationship between specific groups. MCA uses an  $\chi^2$ -calculated distance to assess the association between clinicopathological variables (clinical groups, SBR histological grade), large-scale mutations in the *TOP2a* (amplification or deletion) and small-

scale mutations in the *p53* (point mutation or deletion) genes, and the relative expression of the TOP2 $\alpha$  and p53 proteins. Based on these distances, the correspondence analysis registers two sets of combinations, generating a score calculated for each group. The first combination (dimension 1) defined a scale of variation that allowed the highest discrimination between groups. The second combination (dimension 2) defined the maximum dispersion between uncorrelated groups and the relative expression of the TOP2 $\alpha$  and p53 proteins. To compare relative expression values of the TOP2 $\alpha$  and p53 proteins, the results were divided in percentiles starting from 33 and 66%. Three sets of each variable were generated: underexpression <33% (<0.9), basal expression (normal) 33-66% (0.9-1.1) and overexpression >66% (>1.1) (16).

Finally, survival curves were determined using the Kaplan-Meier method and verified by a log-rank test (Mantel-Cox) with a follow-up period of 26 months, as patients continue in follow-up on the present study.

## Results

**Clinicopathological features of patients with BC.** The analysed population consisted of 102 patients with BC, of whom 71.5% were diagnosed as non-TNBC and 28.5% were diagnosed as TNBC (Fig. 1A). The age of TNBC patients at time of diagnosis was estimated as 50.2 ( $\pm 11.3$ ) years of age on average, whereas the age of non-TNBC patients was estimated as 55.01 ( $\pm 10.3$ ) years of age on average. The accumulated relative frequencies of both groups were significant ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 1B). TNBC patients exhibited 82.7% of SBR histological grade III ( $p = 0.0089$ ) (Fig. 1C) and 37.9% recurrence ( $p = 0.017$ ) (Fig. 1D) when compared with non-TNBC patients (50.6 and 15.1%, respectively).

Furthermore, TNBC patients presented only stages II and III ( $p = 0.539$ ) (Fig. 1E), larger tumour size ( $p = 0.393$ ) (Fig. 1F), and a higher frequency of positive lymph nodes in N2 status ( $p = 0.935$ ) (Fig. 1G); we did not observe significant differences between non-TNBC and TNBC patients.

**Genetic alterations of the *p53* gene and *p53* protein expression.** Since the tumour suppressor gene *p53* is mutated in ~50% of all types of cancer, we evaluated small-scale mutations (point mutations, deletions) in this gene through DNA sequencing of exons 5-8, which are frequently mutated. We found genetic alterations in the *p53* gene in 27.5% of patients with BC, of which 9.8% were point mutations (missense) and 17.7% were specific deletions in exons 5-6 (Table I).

The majority of PCR amplicons spanning exons 5-6 exhibited a similar migration pattern by electrophoresis (459 bp, expected molecular weight); however, in some cases, we observed an amplicon of ~395 bp, suggesting that the latter represents an allele carrying a deletion (Fig. 2A). We were able to identify an ~64 bp deletion corresponding to codons 191-216 (exon 6) (Fig. 2B).

In addition, it was through DNA sequencing that we identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs1294778 and rs12951053 localized inside intron 7 of *p53*, both of which had a frequency of 25.5% in the study population (Table I). Both SNPs (homozygotes or heterozygotes, according to the case) were identified in the same patients. No significant differences

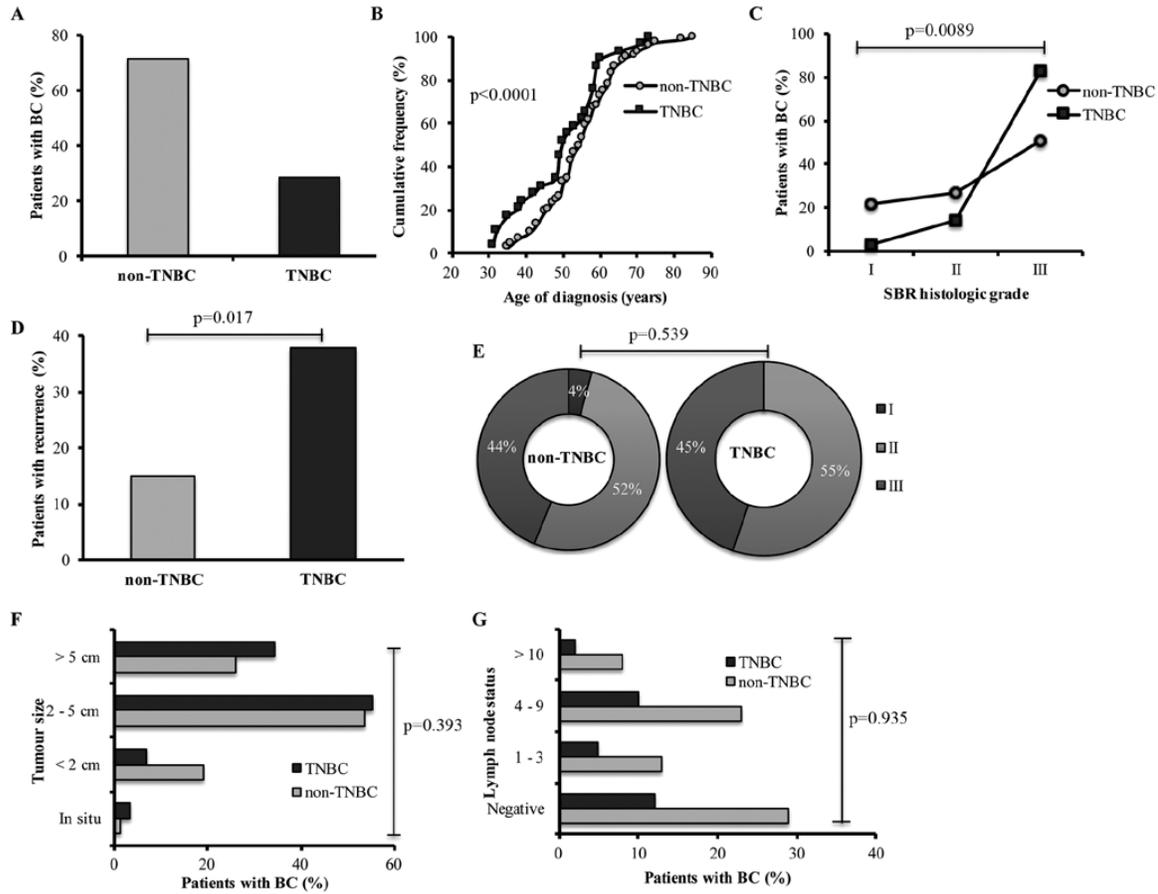


Figure 1. Clinical and pathological characteristics of the patients with breast cancer. (A) Clinical groups of non-TNBC and TNBC patients. (B) Accumulated frequency of age at time of diagnosis per group. (C) Scarff-Bloom-Richardson (SBR) histological grade. (D) Recurrence. (E) Clinical stage. (F) Tumour size and (G) lymph node status.  $p \leq 0.05$  was considered significant. TNBC, triple-negative breast cancer.

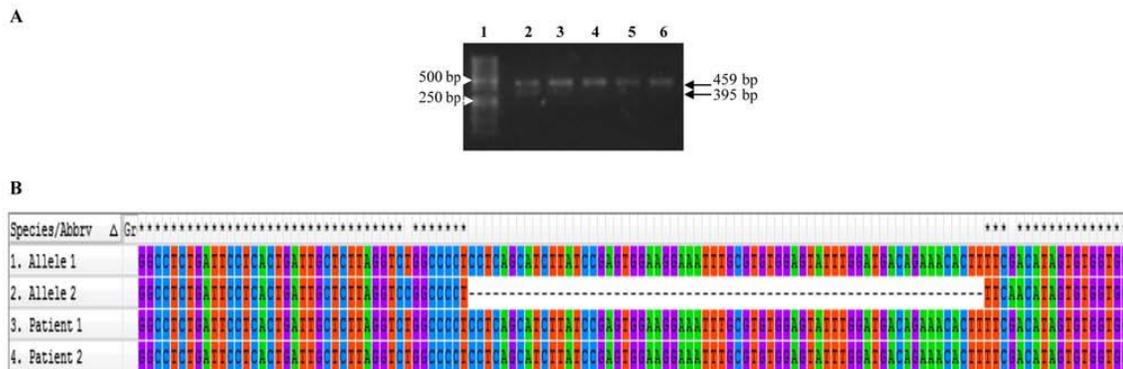


Figure 2. Polymerase chain reaction (PCR) and sequence of exons 5-6 of the *p53* gene. (A) PCR products of exons 5-6: lane 1, DNA molecular weight marker (DMWM); lane 2-3, patients with deletion in one allele; and lanes 4-6, patients without point mutation or deletion. (B) Alignment of the sequences of exons 5-6 of two patients without deletion and alleles with or without deletion of one patient.

were found between TNBC and non-TNBC patients regarding either deletions or mutations ( $p=0.0655$ ) (Fig. 3A), and SNPs (rs1294778 and rs12951053) (data not shown) identified for *p53*.

To determine whether point mutations or deletions found in the *p53* gene compromise its protein expression, all of the BC samples were analysed by western blotting. A representative



Table I. *TP53* and *TOP2a* status in patients with BC.

Gene status	Position	Characteristics	Frequency (n=102)
Wild-type <i>TP53</i> gene			72.5%
Alteration of the <i>TP53</i> gene			27.5%
Subcategorization of the alteration of the <i>TP53</i> gene			
Missense mutation	Exons 5-8 <sup>a</sup>	Protein change by one amino acid or truncated	9.8%
Deletion	Exons 5-6 <sup>a</sup>	Truncating mutation	17.7%
SNPs in the <i>TP53</i> gene			
SNP rs12947788	Intron 7	No change in expression of the protein	25.5%
SNP rs12951053	Intron 7	No change in expression of the protein	25.5%
Wild-type <i>TOP2a</i> gene			67.6%
Alteration of the <i>TOP2a</i> gene			32.4%
Subcategorization of the alteration of the <i>TOP2a</i> gene			
Deletion	Gene	No protein expression	20.6%
Amplification	Gene	Modified protein expression (underexpression, overexpression)	11.8%

<sup>a</sup>Only exons 5-8 of the *TP53* gene were sequenced. *TOP2a*, topoisomerase 2 $\alpha$ ; BC, breast cancer.

image of western blotting of the p53 protein is shown in Fig. 3B. When comparing p53 protein expression levels, we observed a statistically significant average of 0.78 ( $\pm 1.63$ ) in the TNBC group ( $p=0.005$ ) compared with the non-TNBC group (mean,  $0.10 \pm 0.43$ ) (Fig. 3C). We normalized the relative expression of the p53 protein using the loading control  $\beta$ -tubulin since normal adjacent tissue lack or present low levels of p53 protein. In contrast, p53 mutant proteins have a characteristically long half-life (4,17).

Next, we validated the results of p53 protein expression using PLA-qPCR, a technique more sensitive than western blotting. We found an average p53 protein expression of 1.83 ( $\pm 1.75$ ) and 0.62 ( $\pm 0.65$ ) in the TNBC and non-TNBC groups, respectively. The difference among these results was statistically significant ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 3C).

Furthermore, we analysed an association among *p53* gene alterations with p53 protein expression. We observed that patients carrying deletions in the *p53* gene present underexpression or null expression of the p53 protein, as shown by PLA-qPCR or western blotting analysis, respectively (Fig. 3D). Patients with different mutations in the *p53* gene present either underexpression or overexpression of the p53 protein, with both situations observed through western blotting and PLA-qPCR (Fig. 3D). In some cases, patients showing no alterations (point mutations or deletions) in exons 5-8 also showed expression of the p53 protein. This may be due to mutations localized in the unexamined regions of the *p53* gene (Fig. 3D).

*Genetic alterations of the TOP2a gene and protein expression.* Similar to p53, *TOP2a* is altered in cancer. Thus, we evaluated large-scale mutations (amplifications or deletions)

for the *TOP2a* gene by qPCR. We found that 32.4% of all patients analysed showed genetic alterations in this gene, among whom 20.6% presented deletions and 11.8% showed amplifications of the *TOP2a* gene (Table I). However, there were no significant differences in either *TOP2a* gene deletions or amplifications between the TNBC and non-TNBC patient groups ( $p=0.4508$ ) (Fig. 4A). To determine whether such amplifications or deletions exert any effect on *TOP2a* protein expression, the BC samples were evaluated by western blot analysis (adjacent and tumour tissues). We observed that the average *TOP2a* protein expression was 1.36 ( $\pm 2.95$ ) in TNBC and 1.40 ( $\pm 3.79$ ) in the non-TNBC group. The patients showed similar expression levels of *TOP2a* protein between the groups without a significant difference ( $p=0.960$ ) (Fig. 4B). We show a representative image of the western blotting of proteins obtained of two patients with BC for *TOP2a* protein.  $\beta$ -tubulin was used as the loading control (Fig. 4C). When comparing the amplifications or deletions and protein expression of *TOP2a*, we observed a higher expression of the *TOP2a* protein in patients lacking any *TOP2a* genetic alterations and decreased *TOP2a* protein levels in patients carrying *TOP2a* deletions. Individual group evaluations revealed higher *TOP2a* protein expression in TNBC patients carrying gene amplifications when compared with non-TNBC patients ( $p=0.023$ ) (Fig. 4D).

*Associated characteristics in patients with BC.* To determine the association between the clinical and pathological characteristics (clinical group, histological grade) of patients with genetic alterations (previously described) in the *TOP2a* and *p53* genes and the expression level of proteins, we carried out an MCA. We identified three groups by means of an MCA as follows: the first group of TNBC patients was associated

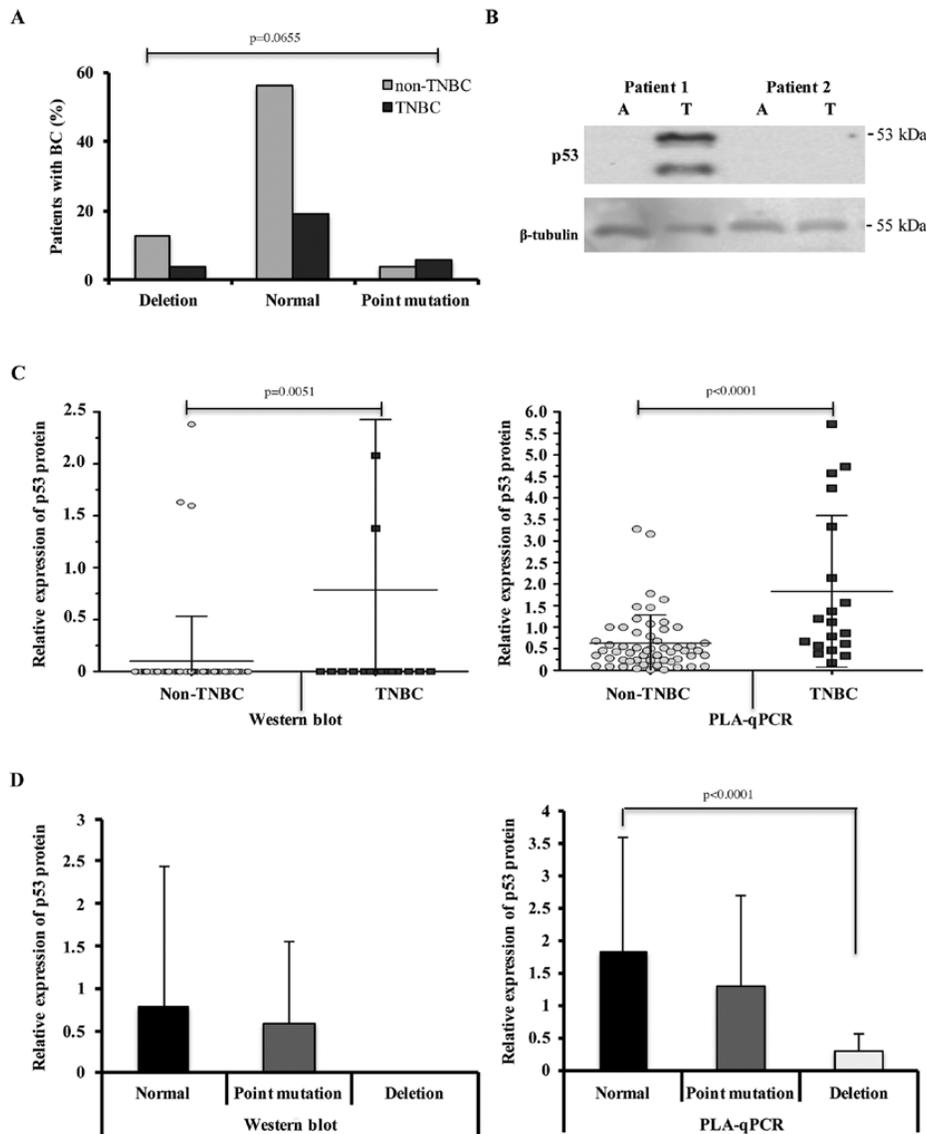


Figure 3. Genetic alterations of the *p53* gene and p53 protein expression in patients with breast cancer (BC). (A) Genetic alterations (deletion or point mutation) of the *p53* gene. (B) Representative ligation image of the western blotting of p53 and β-tubulin. A (adjacent tissue); T (tumour tissue). (C) Relative expression of the p53 protein as measured by proximity ligation assay-quantitative polymerase chain reaction (PLA-qPCR) and western blotting. (D) Comparison between genetic alterations of the *p53* gene (x-axis) and protein expression (y-axis) through western blotting (on the left) and PLA-qPCR (on the right).  $p \leq 0.05$  was considered significant;  $\pm$  standard deviation (SD).

with a point mutation in the *p53* gene and p53 protein over-expression, due to a increase in the p53 protein's half-life. Additionally, we detected the amplification of the *TOP2a* gene in this group despite the fact that *TOP2a* protein expression was not associated with any clinical group. The second group of non-TNBC patients was associated with a *p53* gene deletion, underexpression of the p53 protein, a non-altered *TOP2a* gene (although overexpressed protein), and SBR histological grade II. The third group represented by patients of any group (TNBC or non-TNBC) presented with a *TOP2a* gene deletion and a baseline expression level of both the p53 and *TOP2a* proteins (Fig. 5).

**Survival analysis of patients with BC.** The follow-up period for patients studied with BC was set at 26 months, and the patients are undergoing continued follow-up. We observed a general survival of 91.2% in the study population. In the groups, we observed a 79.3% survival for the TNBC group and 95.8% for the non-TNBC group ( $p=0.015$ ). In relation to time of survival for the study population, the mean was 25.36 months, with 24.1 months for the TNBC group and 25.8 months for the non-TNBC group ( $p=0.002$ ) (data not shown).

After that, we analysed the prognostic factor of point mutations or deletions in the *p53* gene. In patients with BC that presented a deletion in the *p53* gene, the survival was

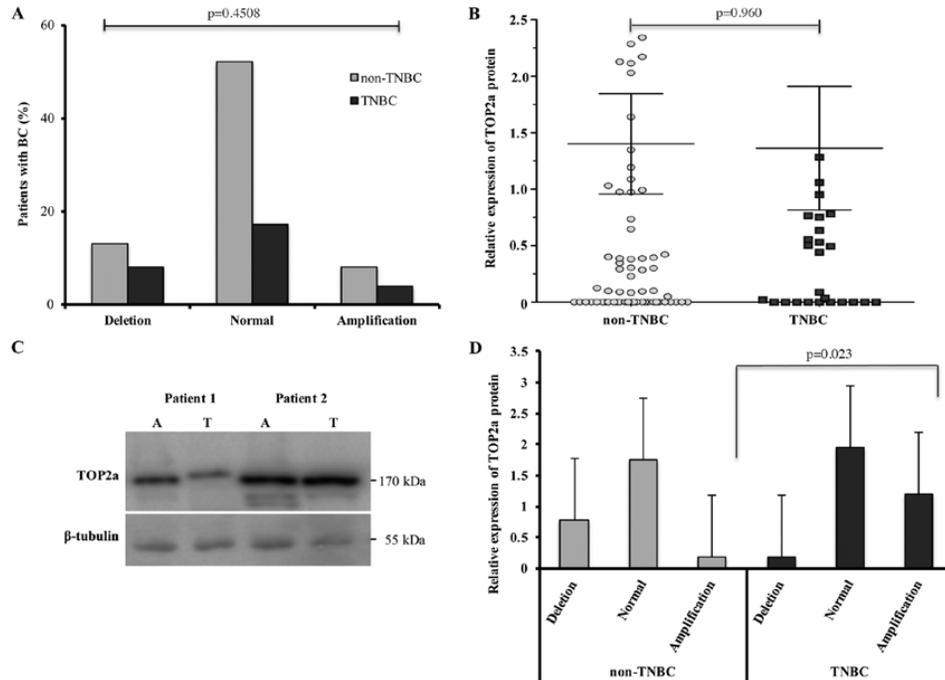


Figure 4. Genetic alterations of the *TOP2a* gene and *TOP2a* protein expression in patients with breast cancer (BC). (A) Genetic alterations (deletion or amplification) of the *TOP2a* gene. (B) Relative expression of the *TOP2a* protein by clinical groups. (C) Representative image of the western blotting of *TOP2a* proteins obtained from two patients with BC.  $\beta$ -tubulin was used as the loading control. A (adjacent tissue); T (tumour tissue). (D) Comparison between genetic alterations of the *TOP2a* gene (x-axis) and its protein expression (y-axis) through western blotting.  $p \leq 0.05$  was considered significant;  $\pm$  standard deviation (SD).

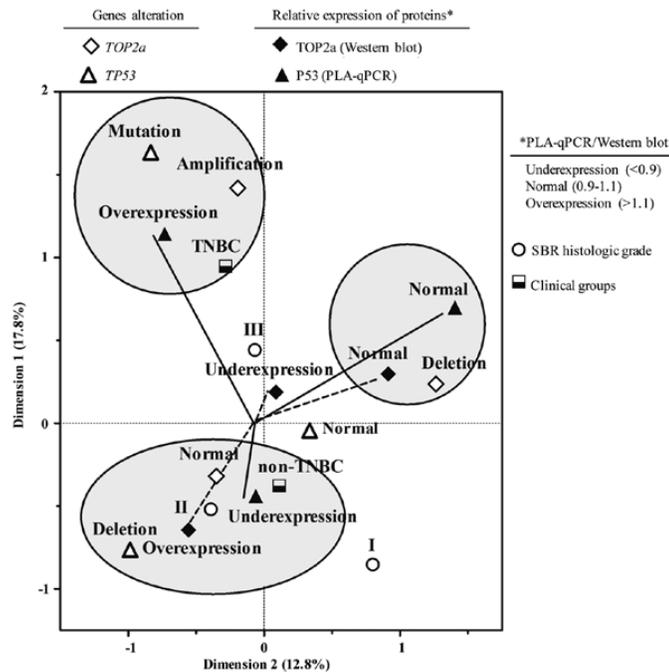


Figure 5. Multiple correspondence analysis (MCA) in patients with breast cancer (BC). In this analysis we observed three groups: in the first group TNBC patients were associated with point mutations in the *p53* gene and protein overexpression, as well as gene amplification of *TOP2a*. The second group was formed with the non-TNBC patients, deletion of the *p53* gene and protein underexpression, and overexpression of the *TOP2a* protein. The third group was formed with patients of both clinical groups, a basal expression of *p53* and *TOP2a* proteins and *TOP2a* gene deletion. The sum of dimension 1 and 2 accounted for 30% of the total variation exhibited by the data. TNBC, triple-negative breast cancer.

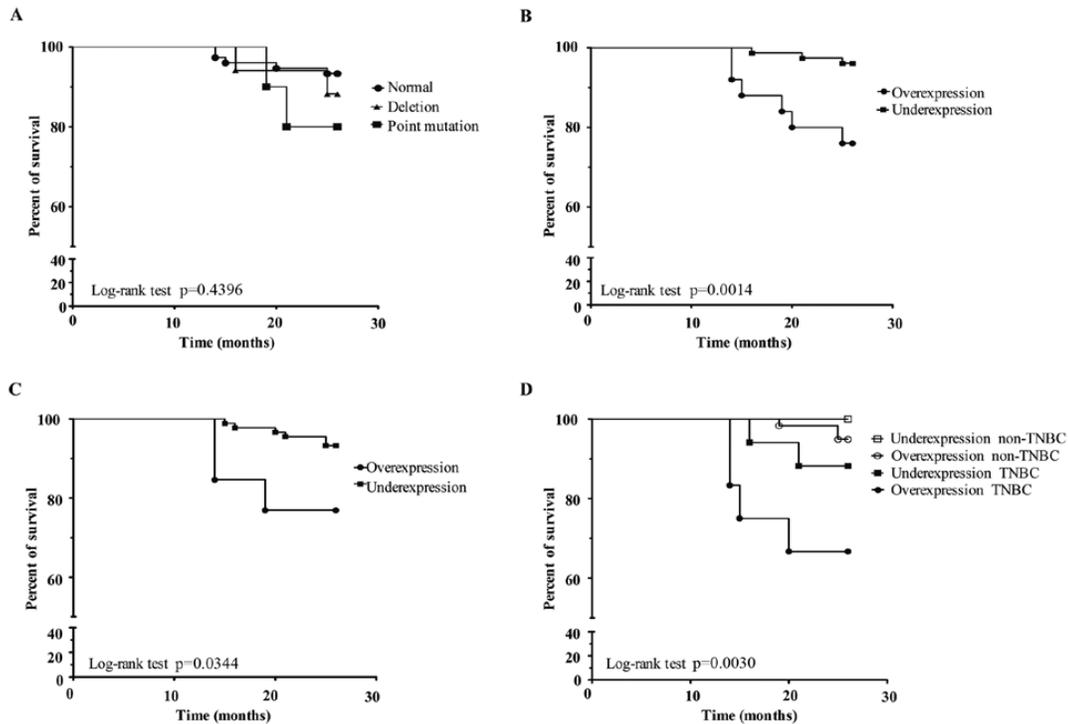


Figure 6. Prognostic value of p53 status. (A) Genetic alterations of the *p53* gene (point mutation or deletion). (B) Underexpression and overexpression of the p53 protein by proximity ligation assay-quantitative polymerase chain reaction (PLA-qPCR). (C) Underexpression and overexpression of the p53 protein by western blotting. (D) Underexpression and overexpression of the p53 protein by clinical group.  $p \leq 0.05$  was considered significant.

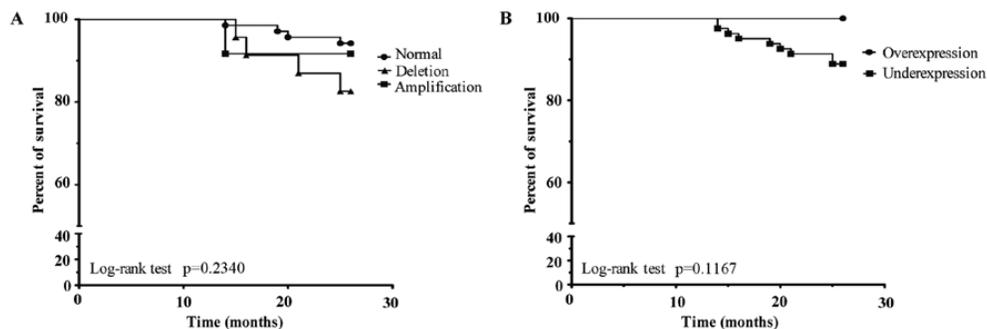


Figure 7. Prognostic value of TOP2a status. (A) Genetic alterations of the *TOP2a* gene (deletion or amplification). (B) Underexpression and overexpression of the TOP2a protein.  $p \leq 0.05$  was considered significant.

88.2%; in patients who had a point mutation, the survival was 80%. In neither case was the survival statistically significant ( $p=0.4396$ ) (Fig. 6A). In contrast, when we analysed p53 protein expression through PLA-qPCR (Fig. 6B) in the same group of patients, we found that p53 overexpression was associated with a lower survival (76%) compared with p53 underexpression (96%), suggesting a poor prognosis factor ( $p=0.0014$ ). Similarly, using western blotting we found an association between p53 overexpression and a lower survival (76.9%,  $p=0.0344$ ) (Fig. 6C). In addition, when we analysed p53 protein expression and its association with a clinical

group, we observed that TNBC patients with p53 overexpression presented a lower survival ( $p=0.0030$ ) (Fig. 6D).

Finally, we analysed whether amplifications or deletions in the *TOP2a* gene are a prognostic factor. To perform this analysis, two groups were generated as follows: i) a group without genetic alterations of the *TOP2a* gene (normal) presented with a survival of 94.2%; ii) a group with amplification presented with a survival of 91.6%; and iii) a group with deletion presented with a survival of 82.6% ( $p=0.2340$ ) (Fig. 7A). Although patients with TOP2a underexpression had a survival of 88.8%, this result was not



statistically significant ( $p=0.1167$ ) (Fig. 7B). However, neither TOP2a amplifications or deletions nor protein expression was a factor for poor prognosis in patients with BC.

## Discussion

We found that overexpression of the p53 protein was associated with lower survival and could be considered to be a factor for poor prognosis in Mexican women with BC.

In the present study, TNBC patients were characterized as being younger at the time of diagnosis, with SBR histological grade III, and presented recurrence, which have been previously reported (18,19). Our findings agree with past studies performed on Mexican TNBC patients or Hispanic women residing in the US (18-20).

We did not find any correlation between amplifications or deletions and protein expression of TOP2a, as has been previously reported (11). Brase *et al* solely identified an association in the borderline limit between TOP2a mRNA and protein levels (11). Similarly, TOP2a amplifications or deletions and protein expression are not considered to be factors for poor prognosis in the present study population. Our results are in agreement with studies in which these variables were also analysed without finding a difference in prognosis (15,21). Nevertheless, there are other studies where TOP2a overexpression is considered to be a factor for poor prognosis (11,14,22).

Point mutations (missense) in the p53 gene, localized mainly in the DNA binding domain (exons 5-8), are associated with worse prognosis and are considered to be predictive factors of anthracycline treatment unresponsiveness (1,7). We found genetic alterations (point mutations or deletions) for the p53 gene similar to previously reported frequencies (3,4,23). The alterations most frequently found in the present study were deletions (17%), despite the fact that point mutations are reported as the most common. Similar to the present study, several studies (in different tumours) also have found p53 gene deletions ranging from 8 to 25% (24-26). We observed deletions in only one allele, localized in exons 5-6 of p53 gene. One sample was characterized by the deletion of 65 bp in codons 191-216 (exon 6), which to date has not been reported in the tumour mutation database for p53 gene [<http://wwwp53.iarc.fr/>]. Unfortunately, it was not possible to characterize the deletions detected in all samples due to insufficient sample material. Similar to what has been reported, we found that point mutations were more frequent in TNBC patients (4,17,27). It is known that some p53 point mutations can increase the half-life of the protein, thus favouring its overexpression (4,17). In agreement with these studies, we observed p53 overexpression in TNBC patients. However, we did not find that point mutations or deletions of the p53 gene were associated with survival. We observed that patients with point mutations in the p53 gene have a survival of <80%, which was not statistically significant ( $p=0.4396$ ). It is possible that with a larger sample size, point mutations in the p53 gene may be shown to be a poor prognostic factor. Nevertheless, overexpression of the p53 protein was significantly associated with a lower survival ( $p=0.0014$ ), and we suggest in the present study that it could be a factor for poor prognosis in Mexican patients with BC. This result was observed using both analysis techniques, PLA-qPCR and western blotting. In addition,

overexpression of the p53 protein was a worse prognostic indicator for patients with TNBC. Our results coincide with others studies that report the overexpression of p53 protein is a factor of poor prognosis in BC, and particularly in the TNBC subtype (28-30). Additionally, we identified a high frequency of Mexican patients with TNBC. Other studies, have also reported a high frequency of the TNBC subtype in Mexican patients with BC (18,20). Therefore, in the future the identification of TNBC patients (which on its own is a poor prognosis) who present overexpression of the p53 protein (as a prognostic biomarker) should be carried out to establish health policies and suggest a treatment more personalized for this group.

In addition, p53 mutations are considered to be predictive factors for unresponsiveness to anthracycline treatment schemes (7,25,31). The overexpression of the TOP2a protein is also considered to be a predictive factor for anthracycline sensitivity, whereas deletion status is associated with increased resistance to the same drug (10-13). We cannot determine the predictive value of these molecules with the anthracycline scheme since they were not administered with neoadjuvant chemotherapy in the study population. However, it is possible that at the end of five years of follow-up of the patients, we may be able to establish an association between recurrence and genetic alterations, and p53 and TOP2a protein expression. We suggest that recurrence is the result of a negative response to the anthracycline scheme since 94.1% received adjuvant chemotherapy containing anthracycline, adriamycin and cyclophosphamide (A/C), and 5-fluorouracil, adriamycin and cyclophosphamide (FAC). At this time, only 21.5% of the patients have presented with recurrence, and 18.1% present with deletion of the TOP2a gene, which has been reported to be associated with resistance to anthracyclines (10-13). Furthermore, 18.1% of patients had TOP2a overexpression, which is considered to be a predictive factor for drug sensitivity (10-13), and 27.2% had mutations in the p53 gene, which are associated with poor response to anthracycline treatment (7,23,31).

Finally, using MCA, we identified three groups that defined the present study population. The first group comprised TNBC patients presenting with p53 mutations, p53 protein overexpression, and TOP2a amplification. This group meets the characteristics from previous studies describing genetic alterations of the p53 gene, or its protein overexpression, in TNBC patients. The second group comprised non-TNBC patients demonstrating p53 gene deletions, underexpression of the p53 protein, and an unaltered TOP2a gene, but overexpression of the TOP2a protein and SBR histological grade II. This group is composed of patients with BC presenting a 65-bp deletion in the p53 gene, thus explaining its protein underexpression. Conversely, p53 mutants could induce TOP2a expression; however, we did not observe any correlation between p53 point mutations (overexpression of p53) and TOP2a protein overexpression (data not shown), suggesting that mechanisms other than p53 mutations are able to induce or regulate TOP2a expression (32,33). The third group included both non-TNBC and TNBC patients carrying a deletion in the TOP2a gene and with baseline expression of the TOP2a and p53 proteins. This analysis allowed us to identify well-defined groups of patients associated with the characteristics analysed who exhibited tumour heterogeneity. Furthermore, through this analysis, we



identified a specific group containing TNBC patients and p53 overexpression, both characteristics that are associated with poor prognosis. Similarly, MAC has been used to associate clinicopathological features of patients with cancer (34). The limitations of the present study included a short follow-up time period for the patients, insufficient DNA material for identifying deletions in all samples with genetic alterations of the p53 gene, and only two schemes of available adjuvant chemotherapy (with or without anthracyclines) for comparison. It is necessary to carry out studies with a larger sample size to validate our results.

The present study population, is characterized by a high frequency of TNBC cases found mainly among the younger patients exhibiting SBR grade III, p53 gene mutations, and protein overexpression. P53 overexpression was associated with a lower survival in patients with BC, suggesting that it is a factor for poor prognosis in our population.

### Acknowledgements

Este estudio representa parte de los requisitos para obtener el grado a Doctor de Jisela Dimas González estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). JDG agradece el apoyo de CONACYT (no. Becario 175068). The authors wish to thank Enrique Garcia Villa (CINVESTAV-IPN) and Rubén Arturo Cortés González (INSP) for their technical assistance, and the Red Temática Farmoquímicos (CONACYT, #271520) for help in to carry out the English language editing of the present study. This study was supported by grants from CONACYT (#168896) and (#261875) to J. Díaz-Chávez.

### References

1. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, *et al.*: The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 12: 1157-1167, 2006.
2. Olivier M, Hollstein M and Hainaut P: TP53 mutations in human cancers: Origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001008, 2010.
3. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, Lawrence MS, Sivachenko AY, Sougnez C, Zou L, *et al.*: Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 486: 405-409, 2012.
4. Fountzilias G, Giannoulatou E, Alexopoulou Z, Zagouri F, Timotheadou E, Papadopoulou K, Lakis S, Bobos M, Poullos C, Sotiropoulou M, *et al.*: TP53 mutations and protein immunopositivity may predict for poor outcome but also for trastuzumab benefit in patients with early breast cancer treated in the adjuvant setting. *Oncotarget* 7: 32731-32753, 2016.
5. Biegging KT, Mello SS and Attardi LD: Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 14: 359-370, 2014.
6. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP: Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355, 1994.
7. Fernández-Cuesta L, Oakman C, Falagan-Lotsch P, Smoth KS, Quinaux E, Buyse M, Dolci MS, Azambuja ED, Hainaut P, Dell'orto P, *et al.*: Prognostic and predictive value of TP53 mutations in node-positive breast cancer patients treated with anthracycline- or anthracycline/taxane-based adjuvant therapy: Results from the BIG 02-98 phase III trial. *Breast Cancer* 14: R70, 2012.
8. Wang Q, Zambetti GP and Suttle DP: Inhibition of DNA topoisomerase II $\alpha$  gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17: 389-397, 1997.
9. Joshi AA, Wu Z, Reed RF and Suttle DP: Nuclear factor-Y binding to the topoisomerase II $\alpha$  promoter is inhibited by both the p53 tumor suppressor and anticancer drugs. *Mol Pharmacol* 63: 359-367, 2003.
10. Bartlett JM, Munro AF, Dunn JA, McConkey C, Jordan S, Twelves CJ, Cameron DA, Thomas J, Campbell FM, Rea DW, *et al.*: Predictive markers of anthracycline benefit: A prospectively planned analysis of the UK National Epirubicin Adjuvant Trial (NEAT/BR9601). *Lancet Oncol* 11: 266-274, 2010.
11. Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, Sültmann H, Bojar H, Koelbl H, Hellwig B, Rahnenführer J, Hengstler JG and Gehrman MC: ERBB2 and TOP2A in breast cancer: A comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction. *Clin Cancer Res* 16: 2391-2401, 2010.
12. Di Leo A, Desmedt C, Bartlett JM, Piette F, Ejlertsen B, Pritchard KL, Larsimont D, Poole C, Isola J, Earl H, *et al.*: HER2/TOP2A Meta-analysis Study Group: HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: A meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 12: 1134-1142, 2011.
13. Won HS, Lee KE, Sung SH, Choi MY, Jo JY, Nam EM, Mun YC, Seong CM and Lee SN: Topoisomerase II alpha and microtubule-associated protein-tau as a predictive marker in axillary lymph node positive breast cancer. *Tumori* 100: 80-86, 2014.
14. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q and Szallasi Z: An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 123: 725-731, 2010.
15. Qiao JH, Jiao DC, Lu ZD, Yang S and Liu ZZ: Clinical significance of topoisomerase 2A expression and gene change in operable invasive breast cancer. *Tumour Biol* 36: 6833-6838, 2015.
16. Hill MO: Correspondence analysis: A neglected multivariate method. *Appl Stat* 3: 340-354, 1974.
17. Kim JY, Park K, Jung HH, Lee E, Cho EY, Lee KH, Bae SY, Lee SK, Kim SW, Lee JE, *et al.*: Association between mutation and expression of TP53 as a potential prognostic marker of triple-negative breast cancer. *Cancer Res Treat* 48: 1338-1350, 2016.
18. Lara-Medina F, Pérez-Sánchez V, Saavedra-Pérez D, Blake-Cerda M, Arce C, Motola-Kuba D, Villarreal-Garza C, González-Angulo AM, Bargalló E, Aguilar JL, *et al.*: Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: High prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer* 117: 3658-3669, 2011.
19. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, *et al.*: Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26: 1275-1281, 2008.
20. Banegas MP, Tao L, Altekruze S, Anderson WF, John EM, Clarke CA and Gomez SL: Heterogeneity of breast cancer subtypes and survival among Hispanic women with invasive breast cancer in California. *Breast Cancer Res Treat* 144: 625-634, 2014.
21. Fountzilias G, Christodoulou C, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Xanthakis I, Batistatou A, Pentheroudakis G, Xiros N, Papaspirou I, *et al.*: Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *J Transl Med* 10: 212, 2012.
22. Hua W, Sa KD, Zhang X, Jia LT, Zhao J, Yang AG, Zhang R, Fan J and Bian K: MicroRNA-139 suppresses proliferation in luminal type breast cancer cells by targeting Topoisomerase II alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 463: 1077-1083, 2015.
23. Dobes P, Podhorec J, Coufal O, Jureckova A, Petrakova K, Vojtesek B and Hrstka R: Influence of mutation type on prognostic and predictive values of TP53 status in primary breast cancer patients. *Oncol Rep* 32: 1695-1702, 2014.
24. Bazrafshani MR, Nowshadi PA, Shirian S, Daneshbod Y, Nabipour F, Mokhtari M, Hosseini F, Dehghan S, Saeezadeh A and Mosayebi Z: Deletion/duplication mutation screening of TP53 gene in patients with transitional cell carcinoma of urinary bladder using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cancer Med* 5: 145-152, 2016.
25. Delfau-Larue MH, Klapper W, Berger F, Jardin F, Briere J, Salles G, Casasnovas O, Feugier P, Haioun C, Ribrag V, *et al.*: European Mantle Cell Lymphoma Network: High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood* 126: 604-611, 2015.
26. Dufour A, Palermo G, Zellmeier E, Mellert G, Duchateau-Nguyen G, Schneider S, Benthaus T, Kakadia PM, Spiekermann K, Hiddemann W, *et al.*: Inactivation of TP53 correlates with disease progression and low miR-34a expression in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 121: 3650-3657, 2013.



27. Millis SZ, Gatalica Z, Winkler J, Vranic S, Kimbrough J, Reddy S and O'Shaughnessy JA: Predictive biomarker profiling of > 6000 breast cancer patients shows heterogeneity in TNBC, with treatment implications. *Clin Breast Cancer* 15: 473-481.e3, 2015.
28. Yang P, Du CW, Kwan M, Liang SX and Zhang GJ: The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. *Sci Rep* 3: 2246, 2013.
29. Ren J, Chen QC, Jin F, Wu HZ, He M, Zhao L, Yu ZJ, Yao WF, Mi XY, Wang EH, *et al*: Overexpression of Rsf-1 correlates with pathological type, p53 status and survival in primary breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 7: 5595-5608, 2014.
30. Maeda T, Nakanishi Y, Hirota Y, Fuchinoue F, Enomoto K, Sakurai K, Amano S and Nemoto N: Immunohistochemical co-expression status of cytokeratin 5/6, androgen receptor, and p53 as prognostic factors of adjuvant chemotherapy for triple negative breast cancer. *Med Mol Morphol* 49: 11-21, 2016.
31. Lehmann BD, Ding Y, Viox DJ, Jiang M, Zheng Y, Liao W, Chen X, Xiang W and Yi Y: Evaluation of public cancer datasets and signatures identifies TP53 mutant signatures with robust prognostic and predictive value. *BMC Cancer* 15: 179, 2015.
32. Srikantan S, Abdelmohsen K, Lee EK, Tominaga K, Subaran SS, Kuwano Y, Kulshrestha R, Panchakshari R, Kim HH, Yang X, *et al*: Translational control of TOP2A influences doxorubicin efficacy. *Mol Cell Biol* 31: 3790-3801, 2011.
33. Tamaichi H, Sato M, Porter AC, Shimizu T, Mizutani S and Takagi M: Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and sensitivity to topoisomerase II inhibitor. *Cancer Sci* 104: 178-184, 2013.
34. Rodríguez-Lara V, Peña-Mirabal E, Baez-Saldaña R, Esparza-Silva AL, García-Zepeda E, Cerbon Cervantes MA, Díaz D and Fortoul TI: Estrogen receptor beta and CXCR4/CXCL12 expression: Differences by sex and hormonal status in lung adenocarcinoma. *Arch Med Res* 45: 158-169, 2014.