



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

PCR EN TIEMPO REAL DEL POLIMORFISMO ILE655VAL DEL GEN
HER2 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y SU POSIBLE
VALOR PREDICTIVO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

CASSANDRA KAREWIT MARQUEZ MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS: **DRA. MARTHA OROZCO QUIYONO**

CIUDAD DE MEXICO, 2020





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.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi querida escuela que desde nivel preparatoria me abrió las puertas y me permitió tener una educación, conocer todo tipo de personas y muchas experiencias que se quedaron en mi mente y en mi corazón.

Gracias a la doctora Martha Orozco por permitirme aprender más sobre genética y dedicarme su tiempo y experiencia.

DEDICATORIA

A mi madre, la persona más importante en mi vida. Por ser madre, mujer y profesionalista en toda la extensión de la palabra, no tengo palabras para agradecerte, simplemente, por ser como eres y has sido conmigo y mis hermanos.
Te amo incondicionalmente.

A mi abuela, por soportar todos mis cambios, por escuchar todo lo que he tenido que decir, por siempre procurarnos a mis hermanos y a mí. Eres increíble.

A mis hermanos, Enrique, Anaid y César, son demasiado jóvenes para entender tantas cosas, pero siempre tienen algo nuevo que enseñarme. Han sido la aventura más hermosa que he vivido cada día.

A mi tía Rebeca y sus hijos Aarón y Diego, porque siempre han formado parte de mí y espero que la vida les brille mucho más.

A Alejandro, sin ti definitivamente sería una persona completamente distinta, gracias por enseñarme lo positivo en cada situación, por jamás rendirte y por ser incondicional. Te amo infinito.

A Patricia, por abrirme las puertas de tu casa y ser un ejemplo de vida.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco teórico.....	5
• Ciclo celular.....	5
• Protooncogenes.....	6
• <i>HER2</i>	7
• Mecanismo de acción de <i>HER2</i>	10
• PI3K (Fosfatidilinositol-3-cinasa).....	11
• AKT/Proteína cinasa B (PKB).....	11
• Mecanismo de amplificación de <i>HER2</i>	12
• Polimorfismo Ile655Val.....	14
• PCR (Polimerase Chain Reaction o Reacción en cadena de la polimerasa).....	17
• PCR en tiempo real.....	20
Planteamiento del problema.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivo general.....	24
• Objetivos particulares.....	24
Material.....	25
Método.....	26
Resultados.....	29
Discusión.....	34
Conclusión.....	37
Perspectiva.....	37
Referencias	38
Anexo 1.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular.....	6
Figura 2. Localización del gen HER2 en el cromosoma 17.....	8
Figura 3. Receptores de la familia HER y sus respectivos ligandos.....	8
Figura 4. Esquema de la proteína HER2.....	9
Figura 5. Vías de señalización de la familia EGFR.....	10
Figura 6. Comparación de la expresión de HER2 en una célula normal y en una célula tumoral.....	13
Figura 7. Dominio de la proteína HER2 afectado por el polimorfismo Ile655Val....	15
Figura 8. Reacción en cadena de la polimerasa.....	18
Figura 9. Genotipo Isoleucina/Isoleucina.....	30
Figura 10. Genotipo Isoleucina/Valina.....	31
Figura 11. Genotipo Valina/Valina.....	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Genotipificación del polimorfismo Ile655Val y porcentaje de cada alelo para casos y controles.....	31
Cuadro 2. Pruebas estadísticas.....	33

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Edades de diagnóstico de pacientes con cáncer de mama.....	29
Gráfica 2. Estadio clínico de pacientes con cáncer de mama.....	29
Gráfica 3. Antecedentes en pacientes con cáncer de mama.....	30
Gráfica 4. Porcentajes de genotipos en casos.....	32
Gráfica 5. Porcentajes de genotipos en controles.....	32

RESUMEN

El cáncer de mama es la tercera causa de muerte en mujeres de 30 a 59 años de edad, siendo un problema de salud pública importante en México. En este trabajo se estudia la posible utilidad del polimorfismo Ile655Val del gen *HER2* como valor predictivo del cáncer de mama, ya que en algunas poblaciones y estudios publicados se encontró una relación entre las personas que lo presentan con una mayor probabilidad de presentar la enfermedad. Por medio de la técnica de PCR se pueden conocer los porcentajes de la presencia de este polimorfismo en pacientes ya diagnosticados con cáncer de mama y en un grupo de controles. En este caso, los resultados obtenidos no respaldan la hipótesis de que la presencia de este polimorfismo representa un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad. Se recomienda seguir estudiando las alteraciones genéticas que presentan estos pacientes para encontrar similitudes entre ellos y poder encontrar un estudio diagnóstico eficaz.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es la tercera causa de muerte en mujeres de 30 a 59 años de edad, siendo un problema de salud pública importante en México. En el año 2016 se reportaron 100,000 defunciones por cáncer de mama en mujeres mayores de 20 años (INEGI 2018)¹. Es una enfermedad multifactorial porque se asocian factores ambientales, genéticos y epigenéticos, los cuales tienen que ver con el crecimiento descontrolado de las células que destruyen los conductos y lóbulos de la mama y en algunos casos llega a diseminarse a otros órganos o tejidos, por lo cual sería conveniente diferenciar aquellas personas que presentan un riesgo elevado de padecerla².

En países en vías de desarrollo de América Latina y el Caribe, según Globocan³, se espera que para el año 2030 se tengan 572,000 casos nuevos de cáncer de mama y 130,000 morirán a causa de este cáncer; motivo por el cual su estudio ayuda a entender su mecanismo de acción y todos los genes implicados en el comportamiento clínico.

El diagnóstico del CM en países de tercer mundo se realiza en etapas más tardías de la enfermedad ya que no se tienen suficientes programas de detección temprana accesibles para toda la población. El estadio clínico al momento del diagnóstico es imprescindible para determinar un pronóstico de supervivencia. En México se han realizado campañas de detección para poblaciones rurales o de escasos recursos disminuyendo el número de casos en estadios tardíos y detectándolos en pacientes más jóvenes, que es en las que suele presentarse el cáncer cuando se tiene una susceptibilidad genética; sin embargo, los estudios moleculares que ayudan a dirigir el tratamiento adecuado siguen siendo inaccesibles para gran parte de la población y no son indicados o interpretados adecuadamente (Ej. Variantes de significado incierto, VSI) lo que deriva en un asesoramiento

genético inexistente o pobre⁴. El asesoramiento genético es una parte fundamental para el seguimiento de enfermedades genéticas, dentro de sus funciones se encuentra informar al paciente sobre su enfermedad para que tenga un mejor entendimiento de la misma y se pueda conocer el origen, evolución y pronóstico del padecimiento genético. También es importante informar el alcance de estas enfermedades a la familia, a través de la orientación sobre las pruebas genéticas que podrían realizarse y aquellas decisiones médicas que los ayudaran a prevenir y tener una mejor calidad de vida^{5, 6}.

Según la Sociedad Americana de Cáncer la supervivencia a 5 años del CM es del 100% en pacientes con estadio clínico 0 y I, 93% para estadio clínico II, 72% para estadio clínico III y 22% para estadio clínico IV⁴.

Marcador tumoral/biomarcador

Se ha descrito la asociación del gen *HER2* con el CM y su utilidad como marcador tumoral o biomarcador, lo que nos lleva a cuestionarnos su valor predictivo sobre la enfermedad

Un biomarcador o marcador biológico se utiliza para conocer la susceptibilidad que se tiene para desarrollar cualquier enfermedad, dar seguimiento al tratamiento y/o personalizarlo, y así predecir la evolución de la enfermedad. Puede ser una sustancia bioquímica, alteración genética/molecular o imagen médica que evalúa el estado de salud del paciente y detecta enfermedades en etapas tempranas, apoyando su prevención en familiares^{7, 8}.

Se entiende como marcador tumoral a la proteína producida por las células cuando algo no está en condiciones normales de acuerdo a cada persona. Cuando hay presencia de células cancerosas hay mayor expresión del marcador, pero se deben realizar más estudios para dar un diagnóstico definitivo ya que no es una herramienta única de diagnóstico. Los niveles

de los marcadores pueden ser diferentes dependiendo desde qué tejido se tomen y podrían estar alterados en diferentes tipos de cáncer, es decir no son específicos. Es importante tomarlos en cuenta ya que nos dan indicios sobre el pronóstico de la enfermedad para poder evaluar su evolución y saber en qué fase clínica se encuentra el paciente, lo que a su vez ayuda a dirigir mejor el tratamiento. Cualquier sustancia endógena puede ser un marcador tumoral si se demuestra que es altamente sensible y específica⁹.

MARCO TEÓRICO

Ciclo celular

En el desarrollo celular el ser humano llega a tener 10^{15} células aproximadamente. Cuando somos jóvenes hay más proliferación que muerte celular, lo que nos ayuda a crecer. Cuando llegamos a la adultez hay un equilibrio entre proliferación y muerte celular, lo que se conoce como estado estacionario, teniendo así un número relativamente constante de células, de las cuáles algunas no continúan con el ciclo celular para dar paso a su diferenciación lo que las hace difícilmente renovables, por ejemplo las células de la piel tardan aproximadamente 28 días en sustituir a las células muertas, en comparación de las neuronas que sólo se regeneran en bajo porcentaje en una zona específica del cerebro. Hay células que permanecen en el periodo G_0 , de forma quiescente o senescente (Figura 1). Las células quiescentes se mantienen en la fase G_0 sin realizar la mitosis, es hasta recibir un estímulo externo que pasan a la fase S (Síntesis) hasta recibir nuevamente un estímulo externo que les indique detenerse y volver a la fase G_0 , por ejemplo, las células hematopoyéticas permanecen en este período para dar lugar a las células que encontramos en la sangre. Las células senescentes se encuentran inicialmente de la misma forma que las células quiescentes, solo que estas no pueden reincorporarse al ciclo de forma natural. En todo el proceso del ciclo celular hay estrictos controles que evitan que la célula se vuelva maligna, pero se sabe que cierto porcentaje de las células no logra ser regulada provocando una proliferación descontrolada, formando clones de células malignas y así los tumores pueden ser benignos o malignos dependiendo de su capacidad de invadir diferentes tejidos (metástasis)^{10, 11}.



Figura 1. Ciclo celular
 Tomada de: <https://es.khanacademy.org>

El ADN está constantemente expuesto a diferentes agentes dañinos de los cuáles se conocen más de 300 que al interactuar con el material genético provocan mutaciones, por ejemplo, el benzo- α -pireno al activarse interactúa con las bases nitrogenadas y modifica su estructura. La radiación es un agente físico que produce rupturas en las cadenas de ADN. Para evitar el daño provocado por estos agentes la célula cuenta con proteínas supresoras de tumores (Ej. P53, BRCA1/2) o protooncogenes (Ej. KRAS, MIC)^{10, 11}.

Protooncogenes

Los protooncogenes se encargan de controlar la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, éstos pueden ser susceptibles a mutaciones y pasar a ser oncogenes estimulantes de la proliferación celular^{10, 11}.

Todos los tipos de cáncer se deben a problemas con la regulación del ciclo celular, aunque también se puede ver afectada la transmisión de señales que estimulan procesos celulares;

éstos problemas son debidos a alteraciones en los genes produciendo proteínas mutadas no funcionales o con una función diferente a la normal, como puede ser el aumento de su actividad, dimerización y autofosforilación^{12, 13}.

Las proteínas producidas por estos genes pueden ser factores de crecimiento (EGF) o receptores de membrana (EGFR). Estas interpretan y envían señales que pueden alterar la transcripción del genoma permitiendo la expresión de genes que no deberían expresarse o la modifican en los genes que ya se expresan. Si los niveles de estas proteínas se encuentran elevados o la proteína esta alterada ya no se cumple rigurosamente con los controles del ciclo celular¹⁰.

Las mutaciones puntuales en los protooncogenes cambian su expresión y no su secuencia codificante. Pueden presentarse translocaciones que dan origen a un gen híbrido. La amplificación del gen *HER2* es utilizado como factor pronóstico del cáncer de mama porque en algunos casos se ve amplificado y a su vez sobreexpresado en el tejido mamario¹⁰.

HER2

En 1986 Yamamoto et al¹⁴ aíslan una proteína a la que llaman c-erb-b-2, la cual es similar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y al oncogén *HER2/Neu* aislado de células de neuroblastoma de rata. Posteriormente se supo que la sobreexpresión de este gen se asociaba con una delección del dominio extracelular, sitio de unión del ligando, con lo que se estimula la proliferación celular aun cuando las hormonas y el factor de crecimiento epidérmico se encuentren en cantidades séricas disminuidas¹⁵.

HER2 es un protooncogen localizado en el cromosoma 17q12 (Figura 2), consta de 27 exones y su longitud es de 38kb. Cuando se presenta una amplificación de éste, suele haber

una sobreexpresión de la proteína (receptor) la cual estimula la proliferación celular, y se relaciona con cáncer de muy mal pronóstico¹⁵.

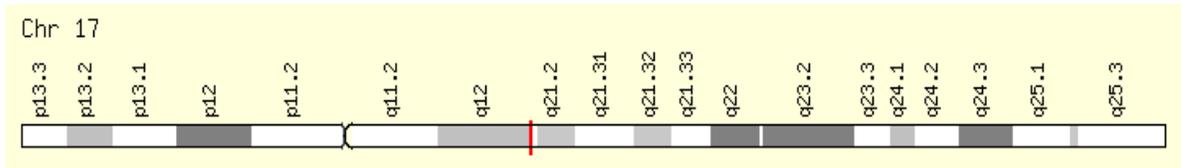


Figura 2. Localización del gen HER2 en el cromosoma 17
Tomada de: <https://www.genecards.org>

El grupo de Receptores de Factores de Crecimiento Epidérmico (EGFR) está compuesto por cuatro tipos que son *HER1/EGFR/ErbB1*, ***HER2/ErbB2/Neu***, *HER3/ErbB3* y *HER4/ErbB4*, que cuentan con 4 dominios extracelulares, I y II son responsables de la unión con el ligando de cada receptor, III y IV se encargan de la dimerización. Además, cuenta con una región transmembrana y una región citoplasmática donde encontramos un bucle de activación. La familia EGFR son activadores de la fosforil-cinasa (FC), siendo su ligando EGF (Factor de crecimiento epidérmico) y TGF α (Factor de crecimiento transformante α)^{16, 17}.

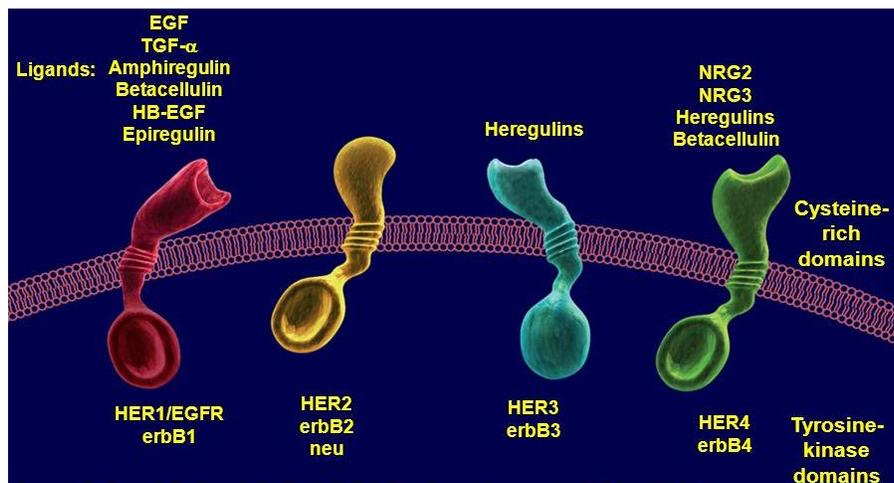


Figura 3. Receptores de la familia HER y sus respectivos ligandos
Tomada de: <https://slideplayer.cz>

HER2 es una glicoproteína transmembranal (Figura 4) de 185 kDa que se activa por hetero u homodimerización con otros receptores de su familia, la activación dependiente de ligandos

ocurre bajo condiciones fisiológicas normales con ligandos disponibles en forma soluble o puede inducir su actividad por la sobreexpresión de la proteína. HER2 es el encargado del desarrollo epitelial, proliferación, organogénesis (diferenciación) y supervivencia celular, se cree que está relacionado con la transformación y progresión tumoral. HER3 es el único de la familia que no tiene actividad de tirosina cinasa debido a que no cuenta con residuos de tirosina^{16, 17}.

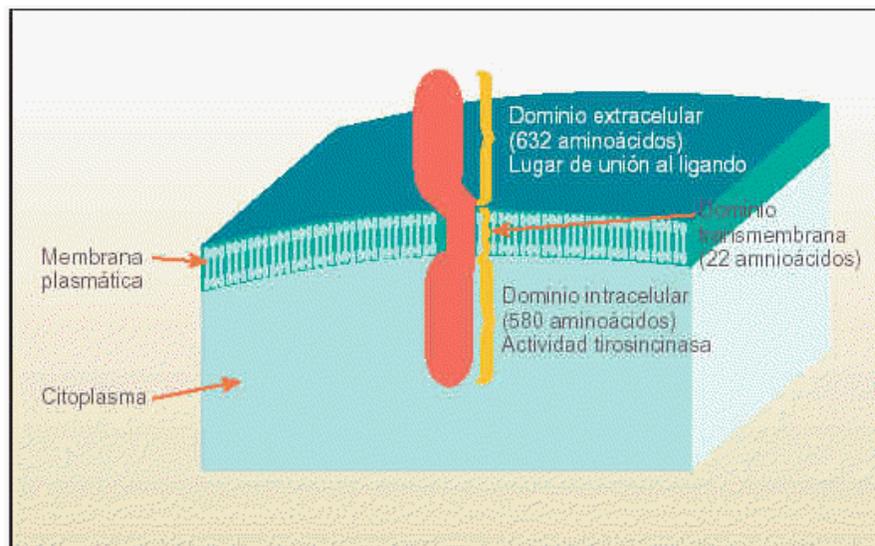


Figura 4. Esquema de la proteína HER2
Tomada de: <https://www.elsevier.es>

HER1 participa en la formación de estructuras epiteliales del sistema respiratorio, gastrointestinal, epidérmico, glándula mamaria y folículos pilosos. HER2 y HER4 participan en la formación de estructuras del corazón y neuronales. HER3 participa en la formación de las células de Schwann, esenciales para la formación de la cresta neuronal¹⁸.

HER2 es fundamental en diferentes vías de señalización en las que se lleva a cabo una dimerización homo o hetero, por lo que su alteración se ha asociado a crecimiento de tumores, supervivencia de cáncer y metástasis. Se sabe que los pacientes que sobre

expresan esta proteína tienen una dimerización excesiva que conlleva a la proliferación y desarrollo tumoral¹³.

Mecanismo de acción de HER2

Todos los receptores de la familia EGFR tienen tres estructuras: la extracelular que interviene en la dimerización, la transmembranal y la intracelular, encargados de la activación y señalización intracelular. Todos tienen una conformación inicial cerrada, es decir no son capaces de formar dímeros por lo que la unión de su respectivo ligando promueve la exposición del subdominio oculto en su forma inicial. HER2 es el único que tiene una conformación inicial abierta. Después de dimerizarse, los residuos de tirosina que se encuentran en el dominio intracelular se fosforilan y activan las vías mitogénicas por Ras/Raf/MEK/MAPK o PI3K/AKT (Figura 5) que desencadenan procesos celulares para la supervivencia de las células tumorales¹⁹.

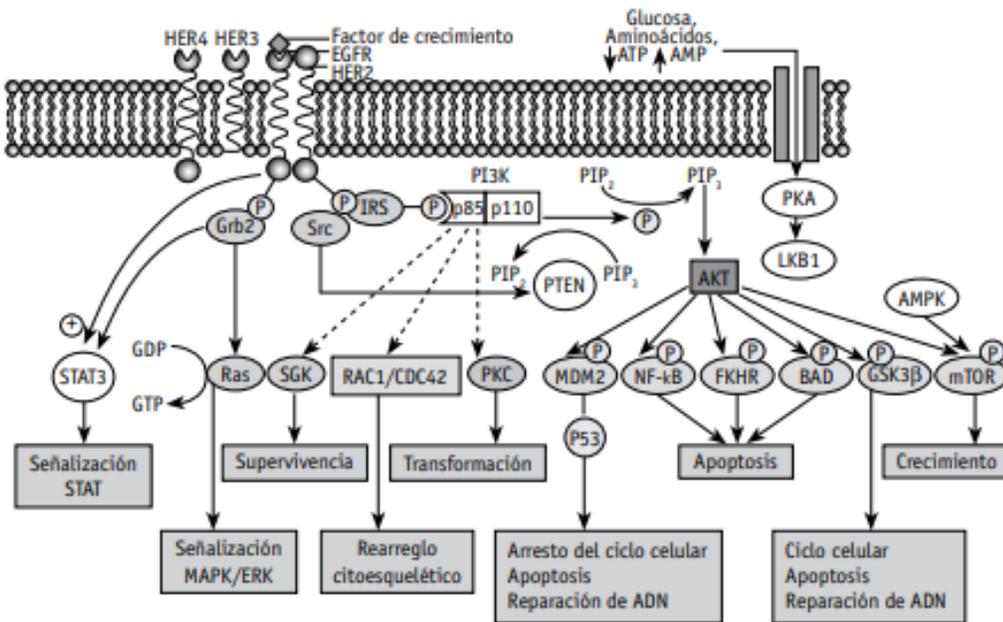


Figura 5. Vías de señalización de la familia EGFR
Tomada de:
<http://www.scielo.org.co>

Al formarse el heterodímero HER1-HER2 se aumenta la afinidad por los ligandos EGF y TGF α y aumenta la actividad catalítica, en comparación con los homodímeros EGFR. Al formarse los heterodímeros HER2-HER3 y HER2-HER4 aumenta la afinidad por los ligandos heregulina y neuregulina permitiendo así la señalización¹³.

PI3K (Fosfatidilinositol-3-cinasa)

Esta vía de señalización juega un papel importante en el desarrollo de cualquier tipo de cáncer porque está implicada en el crecimiento y progresión celular, apoptosis y reordenamiento del citoesqueleto. El aumento de su actividad se ha asociado a la pérdida de algún componente de la vía, así como amplificaciones o mutaciones activadoras en células somáticas, en este mecanismo se lleva a cabo una señalización constitutiva sin la necesidad de factores de crecimiento¹³.

Posterior a la activación de los receptores de membrana tirosina cinasa, por la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS), se fosforila p85 provocando un cambio conformacional de esta subunidad de la proteína y después se une a p110 (subunidad catalítica), una vez activa esta vía, se fosforila el PIP₂ (fosfatidil inositol 3, 4 difosfato) a PIP₃ (fosfatidil inositol 3, 4, 5 trifosfato) y esto activa la proteína AKT²⁰.

AKT/Proteína cinasa B (PKB)

Es una subfamilia de proteínas serina/treonina cinasa conformada por tres isoformas: AKT1 (AKT α), AKT2 (AKT β) y AKT3 (AKT γ). Los estímulos provenientes de la vía PI3K requieren a esta familia de proteínas que después de ser fosforilada y activada puede migrar a diferentes sitios celulares para fosforilar sustancias de distintas vías de señalización. Esta proteína puede interactuar negativamente con proteínas promotoras de apoptosis,

encargadas de proliferación, crecimiento y movilidad celular e invasión (AKT2), promoviendo procesos de carcinogénesis y metástasis¹³.

AKT2 se ve amplificado en tumores pancreáticos, de mama y ovario. AKT3 está aumentada en cáncer de próstata y mama no sensibles a hormonas, ya que esta isoforma le da al cáncer la independencia hormonal. Cuando la función de AKT1 esta alterada AKT2 y AKT3 deben cumplir con su función²⁰.

AKT favorece la supervivencia celular inactivando el gen supresor de tumor p53, esta fosforila y activa directamente a MDM2, una proteína que regula negativamente a p53. MDM2 se encuentra usualmente en el citoplasma y tiene dominios NSL (señalización de localización nuclear) y de unión a p53. Cuando MDM2 es activado por Akt se une a p53 e impide su actividad como factor de transcripción de genes proapoptóticos, posteriormente, sale nuevamente al citoplasma donde media los procesos de ubiquitilación y degradación proteosómica de p53, disminuyendo sus niveles. Cuando la vía PI3K/Akt se encuentra en un estado de activación permanente, el mecanismo anterior permite que una célula, aún en malas condiciones, resista a la apoptosis, sobreviva y prolifere, contribuyendo, de esta manera, a la inestabilidad cromosómica²⁰.

Mecanismo de amplificación de *HER2*

En el tejido tumoral el aumento del número de copias del gen *HER2* se lleva a cabo por dos mecanismos, el primero es la amplificación donde se replica un segmento específico del cromosoma 17q21, todo esto ocurre debido a un acortamiento de telómeros, ciclos repetidos de fusión y rompimiento de puentes e incorporación de secuencias del mismo u otros cromosomas. El otro mecanismo es la aneuploidía o inestabilidad cromosómica en donde

hay un cambio en el número total de cromosomas debido a una segregación anómala en la mitosis. La polisomía del cromosoma 17 que está presente en una tercera parte de los casos de cáncer de mama provoca el aumento del número de copias sin ser necesariamente una amplificación, es decir sobreexpresión de la proteína (Figura 6)¹⁹.

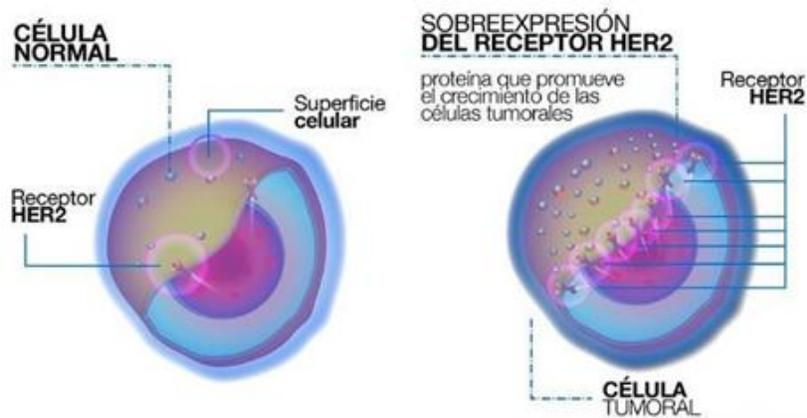


Figura 6. Comparación de la expresión de HER2 en una célula normal y en una célula tumoral
Tomada de: <https://www.amgen.es>

Se han descrito alteraciones en el gen *HER2* en casos de cáncer de mama, endometrio, ovario, próstata, vejiga, páncreas, estómago y pulmón, probablemente debido a su función de regular el ciclo celular.

La proteína HER2 se sobreexpresa al menos en el 20% de pacientes con cáncer de mama, afectando el fenotipo, su transformación y dando un mal pronóstico de la enfermedad. Esto se debe en algunos casos a la amplificación del gen o la sobreexpresión sin amplificación debido a problemas a nivel transcripcional y postranscripcional del ARN mensajero^{21, 22, 23, 24}.

Cuando la proteína HER2 se encuentra sobre expresada, los ligandos se activan de forma autónoma, iniciando el crecimiento maligno celular sin buenos resultados con los tratamientos adyuvantes o terapias antiestrogénicas. Normalmente se tienen dos copias del

gen y 50,000 copias de la proteína, pero en un proceso canceroso con *HER2* amplificado hay más de dos copias del gen y aproximadamente 1'000,000 de copias de la proteína¹⁹.

Polimorfismo Ile655Val

Un polimorfismo es una mutación producida por factores ambientales o errores en la replicación y reparación del ADN, incluyen las inserciones, deleciones y SNP's (Single Nucleotide Polymorphism o Polimorfismo de un único nucleótido), estos últimos nos aportan variabilidad alélica, presentándose en al menos 1% de la población, es decir, son individuos de una misma especie con fenotipos diferentes por lo que, en ocasiones, confieren cierta susceptibilidad a desarrollar enfermedades cuando se encuentran en secuencias codificantes o reguladoras, por ejemplo, en una proteína transportadora afecta su expresión, disminuyendo o aumentando su efecto^{25, 26}.

Se han reportado aproximadamente 10 millones de polimorfismos en el genoma humano. Estos se presentan cada 1,200 pares de bases, a nivel clínico los más importantes son los SNP's no sinónimos ya que el cambio del aminoácido se lleva a cabo en una región codificante y alteran la función de la proteína. Hay otros SNP's que alteran la función de la proteína y se localizan en una región promotora afectando su transcripción, o en sitios de splicing o regiones intragénicas afectando su estabilidad. Los SNP's sinónimos o silenciosos no alteran la funcionalidad de la proteína²⁷.

El estudio del gen *HER2* ha determinado con mayor frecuencia dos mutaciones, la primera es el polimorfismo Ile655Val y la segunda es Ala1170Pro, en este estudio se analizó Ile655Val para determinar su probable valor predictivo y la relación con algunos datos epidemiológicos de los pacientes con CM.

El polimorfismo Ile655Val (rs1136201) es el cambio de una Adenina por una Guanina (ATC – GTC), resultando en la sustitución del aminoácido Isoleucina (silvestre) por una Valina (mutado), que se traduce en una mutación sin sentido o una variante en el transcrito no codificante, reportado como mutación benigna (Figura 7)²⁸.

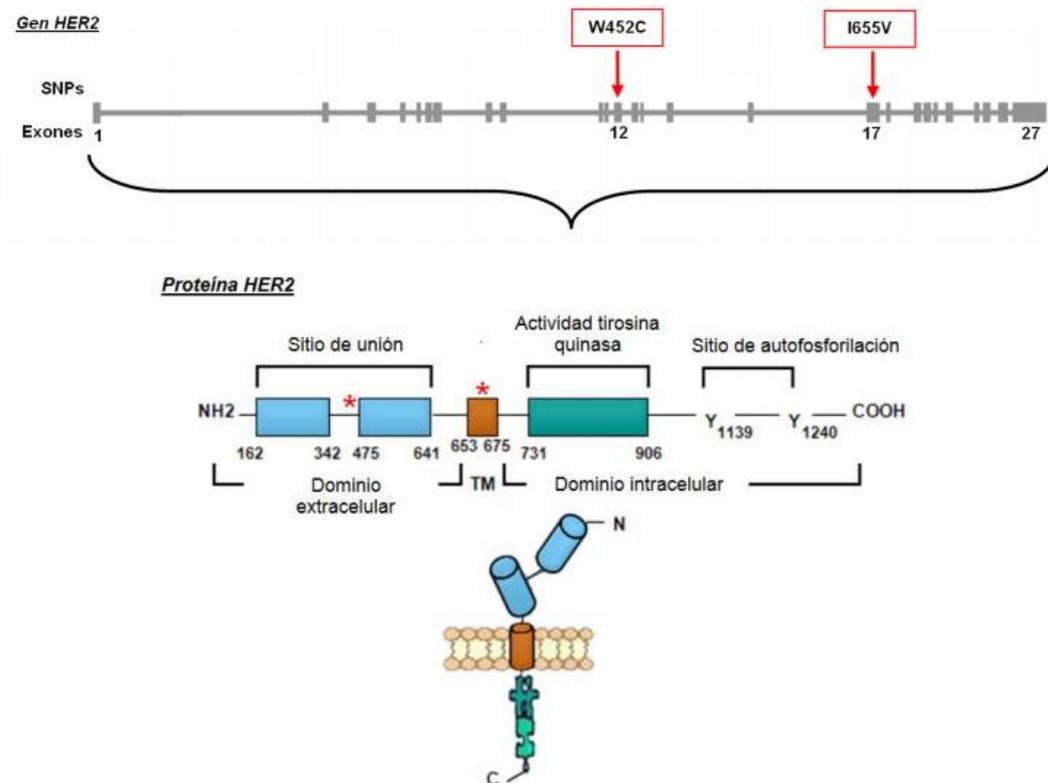


Figura 7. Dominio de la proteína *HER2* afectado por el polimorfismo Ile655Val
Tomada de: <http://sedici.unlp.edu.ar/>

Carrillo-Moreno et al² (2016) observó que las personas portadoras de Valina presentan cantidades séricas mayores de la proteína *HER2* y menor expectativa de vida, por lo que en las personas que tienen el genotipo homocigoto Guanina/Guanina (Valina/Valina) la proliferación de las células cancerígenas es mayor. Es así, que la presencia de un genotipo que tenga Valina en su forma hetero u homocigota, se relaciona con casos de cáncer de mama en un estadio clínico más avanzado y en personas más jóvenes a la edad de

diagnóstico. Se cree que estos polimorfismos en el gen *HER2* activan la carcinogénesis al perderse el alelo silvestre y dejando actuar solamente al alelo mutado²⁹.

Milikan et al concluyeron que el gen *HER2* podría ser uno de los muchos genes de baja penetrancia en algunos subgrupos de mujeres con CM y que se necesita estudiar más sobre estos para conocer su alcance.

Xie et al³⁰ mencionaron que el polimorfismo podría ser de utilidad como biomarcador en mujeres jóvenes, menores de 45 años. Ma et al³¹ descubrieron que hay asociación entre el polimorfismo y el CM en un estudio de casos y controles. En general en las poblaciones en las que se ha encontrado asociación entre este polimorfismo y un alto riesgo de padecer cáncer de mama son las poblaciones asiáticas y africanas.

En cuanto a la población mexicana, Astorga et al³² hicieron un estudio para ver la respuesta terapéutica a trastuzumab en pacientes portadores del polimorfismo y concluyeron que este grupo no tiene una buena respuesta terapéutica y por lo tanto no tienen un buen pronóstico. Carrillo-Moreno et al² realizaron un estudio para conocer la asociación del polimorfismo con el cáncer de mama y concluyeron que hay asociación entre pacientes portadores de valina y nulaparidad con la mala respuesta a trastuzumab lo que indicaría una susceptibilidad significativa al cáncer de mama, sin embargo, proponen realizar más estudios para asegurar o negar sus resultados.

Cabe resaltar que entre los estudios publicados no se ha llegado a una conclusión unánime sobre sí el polimorfismo puede ser utilizado como factor predictivo o no, tal vez faltaría formar diferentes subgrupos de acuerdo a datos epidemiológicos o a la edad y probablemente veamos que es útil en cierto tipo de pacientes, para fines de este estudio y de la problemática

mundial no sería muy conveniente que solo sea útil en un grupo pequeño de la población, recordemos que el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial por lo que las diferentes conclusiones a las que se ha llegado podrían deberse al estilo de vida de cada persona, lo cual hace más complicado su estudio^{33, 34, 35}.

PCR (Polimerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR es una técnica enzimática *in vitro* creada por el Dr. Kary Mullis en 1986. Gracias a la invención de enzimas de restricción por Smith y Wilcox en 1970 y a los conocimientos sobre ADN recombinante se había logrado únicamente obtener fragmentos de ácidos nucleicos, pero gracias a la PCR se pudieron obtener grandes cantidades de ADN sin la necesidad de clonar fragmentos en organismos vivos. Requiere de una cadena molde que sería el ADN a estudiar, dos oligonucleótidos, cebadores o primers que sean complementarios a una parte de la región que vamos a estudiar, una enzima ADN polimerasa, en este caso, y dos deoxinucleótidos (dNTPs) que se unirán a las copias creadas. A continuación, se esquematiza lo que ocurre en un proceso de PCR³⁶.

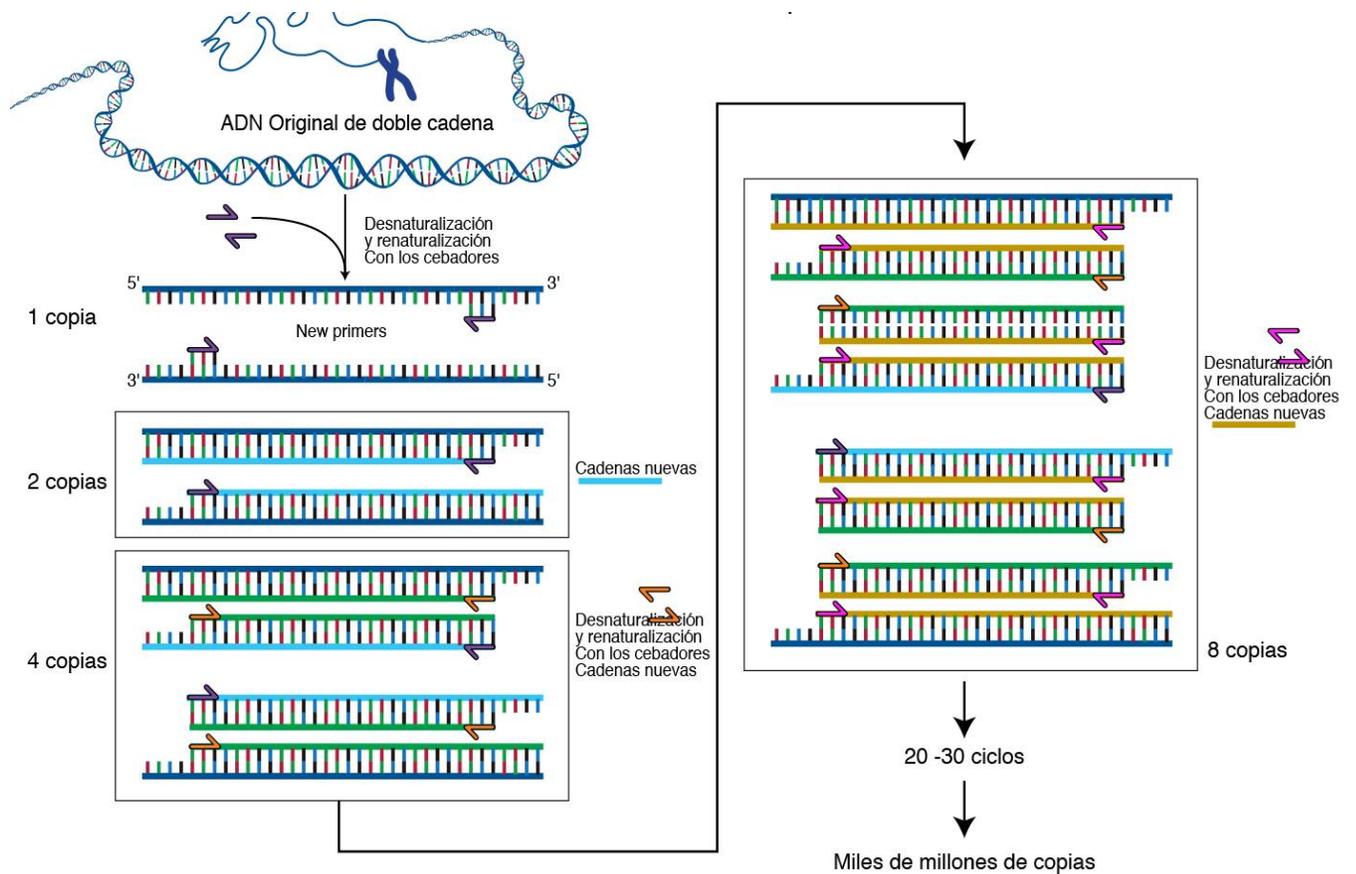


Figura 8. Reacción en Cadena de la Polimerasa
<https://www.genome.gov>

Los ciclos pueden clasificarse en tres fases, la primera es la fase lag que abarca hasta 10 ciclos en donde todavía no se sintetiza ningún fragmento, la segunda es la fase exponencial en donde se inicia la amplificación produciendo dos copias de ADN en cada ciclo por lo que se tendría aproximadamente 1 billón de copias del fragmento estudiado, y la tercera es la fase plateau donde se finaliza la producción de copias³⁶.

En cada ciclo se llevan a cabo tres procesos:

- A. Desnaturalización del ADN de doble cadena a una temperatura que por lo regular es de 94 °C o 95 °C

- B. Anillado de los cebadores con la región blanco de la cadena sencilla de ADN, generalmente se logra disminuyendo la temperatura de acuerdo a la temperatura de desnaturalización o fusión de los cebadores utilizados. La temperatura de desnaturalización de un cebador es la temperatura en la que el 50% de sus moléculas se desnaturalizan, regularmente se encuentra entre 45 °C y 65 °C
- C. Extensión de una nueva hebra de ADN a partir de la unión del primer con la secuencia blanco iniciada por la ADN polimerasa, se lleva a cabo regularmente a 72 °C

La técnica de PCR es ampliamente utilizada para investigación científica y forense, diagnóstico, bioseguridad y para identificar mutaciones o polimorfismos genéticos³⁷.

Dentro de las ventajas de la PCR podemos decir que no es necesario dedicar tanto tiempo a la realización, el equipo necesario no es costoso, y las empresas se han dedicado a diseñar los oligonucleótidos más comúnmente utilizados y si no cuentan con ellos existen softwares que facilitan su diseño. Se puede utilizar una cantidad mínima de ADN, degradado o no, por lo que la hace una técnica muy útil en diferentes disciplinas³⁷.

Dentro de las desventajas podemos decir que se debe tener conocimiento sobre la secuencia a estudiar para estar seguros del oligonucleótido que se va a ocupar. El proceso de clonación se hace menos efectivo si la secuencia a estudiar es grande (más de 5kb), aunque se han amplificado secuencias de 20 a 40 kb. Las muestras pueden contaminarse fácilmente con todo lo que hay en un ambiente de laboratorio³⁷.

PCR en tiempo real

La PCR copia y amplifica una región del ADN conocida, si está presente en el genoma estudiado se observará por electroforesis en gel de agarosa; la variante de PCR en tiempo real cuantifica las copias amplificadas de ADN complementario cuando finaliza cada ciclo mediante el uso de un fluoróforo, espectrofotómetro y software estadístico, todo incluido en un mismo equipo. Es una técnica cualitativa porque mediante los geles de agarosa y el fluoróforo podemos saber si existe o no la secuencia que queremos identificar, y cuantitativa porque el número de copias se representa en una gráfica dónde se pueden identificar genotipos homocigotos silvestres, heterocigotos y homocigotos mutados³⁸.

La PCR en tiempo real fue utilizada y reportada por primera vez en 1993 por Higuchi y sus colaboradores ya que monitoreaban las reacciones de PCR y se dieron cuenta que el ADN de doble cadena se iba acumulando gracias a la fluorescencia que emitía cada copia del ADN, estas características la hacen una técnica muy sensible y específica³⁶.

Tiene como ventaja producir amplicones de 60 pb con los que se pueden detectar cambios cuantitativos en alteraciones celulares, lo que es bueno cuando se tienen muestras de ARN levemente degradadas. Si se quiere amplificar a partir de ARN mensajero se debe utilizar una enzima transcriptasa inversa porque la ADN polimerasa no amplifica adecuadamente a partir de ARNm³⁹.

La técnica de PCR es sencilla de realizar, pero para evitar que las muestras se contaminen con ácidos nucleicos que puedan estar en el ambiente de laboratorio se debe realizar únicamente en una cámara exclusiva para PCR³⁸.

En este caso se utilizan sondas HybProbe que hibridan con las copias del fragmento de ADN amplificado, son dos secuencias específicas llamadas donante y receptor, el donante tiene un fluoróforo en el extremo 3' de la sonda y la sonda receptora tiene un fluoróforo en el extremo 5', ambas sondas deben hibridar en sitios cercanos en el fragmento de ADN, la longitud de onda de emisión de la sonda donante es igual a la longitud de onda de excitación de la sonda receptora, entonces cuando la sonda donante recibe las ondas de luz del equipo excita a la secuencia receptora y esta fluoresce, el número de copias de ADN es directamente proporcional a la cantidad de fluorescencia captada por el equipo. El uso de dos sondas hace que el estudio sea más específico y al basarse en el mecanismo FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer o Transferencia de energía de resonancia fluorescente) hace que este sea más sensible. Cuando se presenta un polimorfismo la sonda es inestable ya que no hibrida correctamente y se puede diseñar una sonda en la que la mutación coincida con el punto de interacción de ambas sondas presentando diferencia en las temperaturas de desnaturalización de los alelos, permitiéndonos distinguir homocigosis, heterocigosis o ausencia de mutación mediante curvas de desnaturalización³⁶.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es un problema de salud pública de gran importancia en México, actualmente es la tercera causa de muerte entre mujeres de 30 a 54 años de edad. En México se detecta el cáncer de mama a una edad y estadio clínico avanzado debido a que no se realizan los estudios apropiados para diagnosticarlo en sus inicios o para identificar un alto riesgo de desarrollarlo. En algunos casos las enfermedades genéticas, como el cáncer, pueden ser causadas por polimorfismos, los cuales pueden ser heredados. Se sabe que, en ocasiones, estos tienen mecanismos de susceptibilidad que aumentan el riesgo de tener una enfermedad. El polimorfismo Ile655Val afecta directamente a la proteína de HER2 y se quiere saber en qué nivel y si su estudio por PCR tiempo real puede ser una herramienta para detectar posibles casos de cáncer de mama.

HIPÓTESIS

Por la asociación del gen *HER2* con el cáncer de mama se estudiará la presencia del polimorfismo Ile655Val, en este gen, como factor predictivo para desarrollar la enfermedad. Se espera que pueda ser utilizado para identificar cáncer de mama en estadios clínicos tempranos o en familiares de pacientes afectados.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el polimorfismo Ile655Val del gen *HER2* a través de PCR (Polimerase Chain Reaction) en tiempo real en pacientes con cáncer de mama y definir su posible valor predictivo como biomarcador.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la proporción de homocigotos silvestres A/A, heterocigotos A/G y homocigotos mutados G/G del polimorfismo Ile655Val en el gen *HER2* en pacientes con cáncer de mama y en controles.
- Comparar las frecuencias alélicas del polimorfismo Ile655Val en pacientes con cáncer de mama y en controles.
- Analizar asociaciones del polimorfismo Ile655Val con algunos datos epidemiológicos.

MATERIAL

Reactivos

Alcohol etílico
Cloroformo
Alcohol isoamílico
Solución saturada de NaCl
Solución de NaCl 5 mM
Solución SDS al 40%
Solución de lisis
Agua destilada
Agua grado biología molecular
Cloruro de magnesio
Master sonda
Master DNA
Alcohol etílico

Equipo

Centrífuga
Termociclador
Computadora
Vortex
Cuantificador de ADN
Refrigerador

Biológicos

Sangre venosa de pacientes con cáncer de mama y controles

Material

Sistema Vacutainer® con EDTA
Ligadura
Torundas
Capilares de vidrio de 20 µL
Probeta 50 mL
Micropipetas
Tubos Eppendorf® de 1.5 mL

MÉTODO

Diseño. Es un estudio experimental analítico transversal

Universo. Se estudiaron 65 muestras de pacientes con cáncer de mama y 65 controles, los pacientes fueron referidos a la Consulta de Cáncer Hereditario del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE.

Variable dependiente. Porcentaje de homocigotos silvestres, heterocigotos y homocigotos mutados en pacientes con cáncer de mama y controles.

Variable independiente. Número de pacientes con cáncer de mama y controles.

Técnicas. Previa firma de carta de consentimiento (Anexo 1) se les tomó muestra de sangre periférica por venopunción con tubos Vacutainer® con EDTA de 4 mL.

Extracción de ADN. El ADN se aisló con el siguiente método casero: en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL se colocaron 500 µL de sangre y 500 µL de solución de lisis (10:1, NH₄Cl 0.144 M + NH₄HCO₃ 0.01 M), se agitó vigorosamente y se incubó por media hora a 4 °C, después se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 mL de solución de lisis, se agitó vigorosamente y se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas, después de decantar de nuevo el sobrenadante se realizó otro lavado de la misma manera, posteriormente se resuspendió el botón obtenido en 570 µL de NaCl 5 mM, se agitó vigorosamente y se adicionaron 40 µL de SDS al 40%, se agitó vigorosamente por 5 minutos, se adicionaron 200 µL de solución saturada de NaCl, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se observaron dos fases de la cual se recuperó solo la fase líquida con ayuda de una micropipeta y se colocó en otro tubo

Eppendorf® de 1.5 mL, al cual se le adicionaron 600 µL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico 49:1, se agitó vigorosamente por 2 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 6 minutos, se observaron 2 fases divididas por una delgada capa de restos celulares, se tomó únicamente la fase superior (acuosa) y se colocó en un frasco de vidrio que ya contenía 5 mL de alcohol etílico absoluto frío, se dejó almacenar toda la noche a -20°C y al día siguiente se observó el ADN (viscoso) en el alcohol etílico el cual se transfirió a otro tubo Eppendorf® de 1.5 mL que contenía 400 µL de alcohol etílico, se centrifugó a 14000 rpm por 6 minutos, se decantó el alcohol etílico y se utilizó una bomba de vacío para secar completamente el ADN, posteriormente se resuspendió el botón en 80 µL de agua inyectable y se cuantificó por medio del método espectrofotométrico en un equipo Nanodrop®. Posterior a esto la técnica de PCR requiere que el ADN se encuentre a una concentración de 50 nanogramos en 5 µL por lo que se hace una regla de tres para saber cuánto ADN y cuánta agua grado biología molecular se requieren de cada muestra para obtener la concentración requerida que después se verifica en el Nanodrop®.

PCR en tiempo real. Para la reacción de PCR se utilizaron únicamente 19 µL de una mezcla de reactivos que incluyen 13 µL de agua, 2 µL de cloruro de magnesio, 2 µL de Master DNA (mezcla de agua, cebadores y polimerasa) y 2 µL de Master sonda (polimorfismo), y 1 µL de ADN previamente diluido. Los oligonucleótidos comprados con Roche en el kit High Probe fueron: (Forward) 5'- TTT AGA GTA GGA GAG GGT CCA AGC -3' y (Reverse) 5'- GGG CTG GCA GGA CTT CAG -3', y el polimorfismo (sonda) se obtuvo de Amplibio® con número rs113620. La mezcla de reactivos y ADN se lleva a cabo en capilares de 20 µL, para asegurar que no quede pegado

ningún reactivo se dio spin a cada capilar por aproximadamente un minuto y se verificó que todos los capilares tengan el mismo volumen comparando uno con otro. Después se introdujeron en un termociclador LightCycler Roche® que emite luz proveniente de un diodo iniciando así el siguiente proceso de PCR:

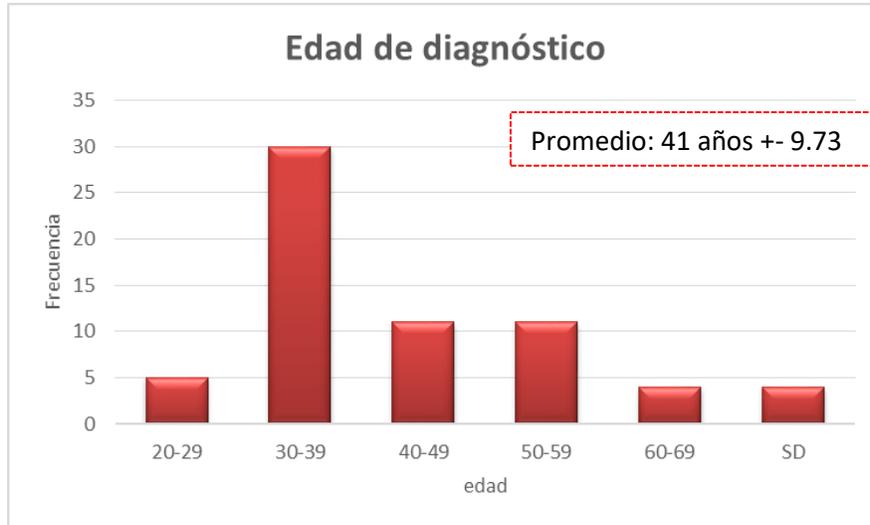
Programa	Desnaturalización	Ciclado			Fusión			Enfriamiento
Parámetro								
Modo de análisis	Ninguno	Cuantificación			Curvas de fusión			Ninguno
Ciclos	1	45			1			1
Segmento	1	1	2	3	1	2	3	1
Temperatura (°C)	95	95	60	72	95	40	85	40
Detener (hh:mm:ss)	00:01:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30

Finalmente se obtienen gráficas de temperatura contra fluorescencia en donde es fácil saber si se trata de un homocigoto silvestre (I/I) porque se observa un solo pico entre las temperaturas 60 °C – 65 °C, en el heterocigoto (I/V) se observan 2 picos de una altura muy similar entre las temperaturas intermedias entre 50 °C – 55 °C y 60 °C – 65 °C, y en el homocigoto mutado (V/V) se observa un solo pico entre 50 °C – 55 °C.

Análisis estadístico. Los resultados se analizaron por pruebas de tendencia central, prueba paramétrica de Chi cuadrada, Odd Ratio y frecuencias alélicas por medio de Hardy Weinberg. Se obtendrán valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

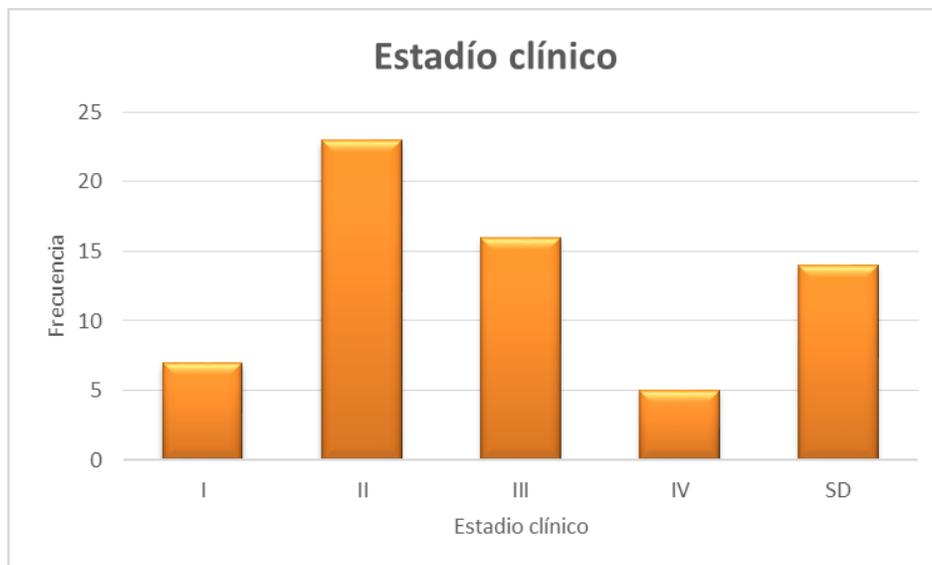
RESULTADOS

Datos epidemiológicos



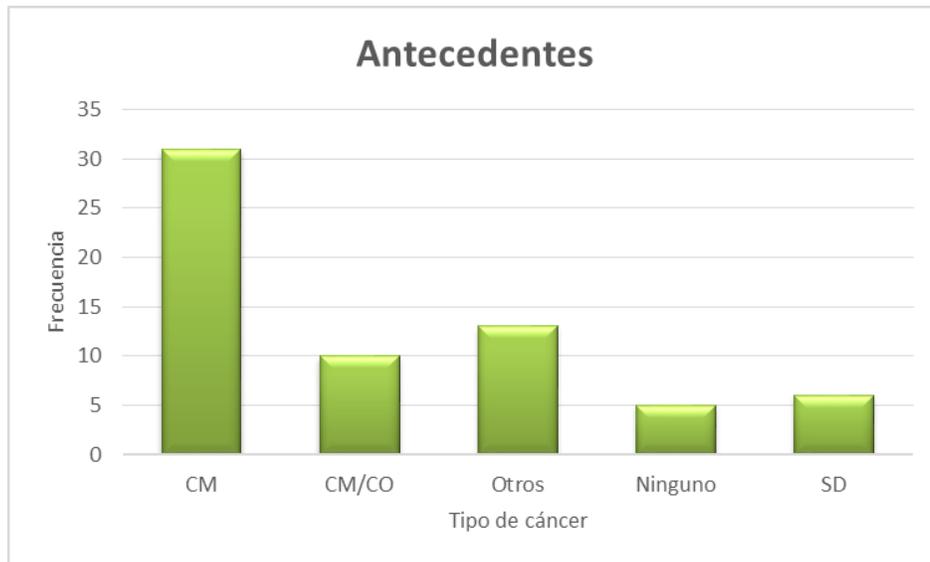
Gráfica 1. Edades de diagnóstico de pacientes con cáncer de mama.
*SD=Sin datos

La mayoría de casos estudiados se encuentra entre 30 a 39 años. Esto es un indicio de la presencia de cáncer de mama hereditario porque suele presentarse en personas jóvenes.



Gráfica 2. Estadio clínico de pacientes con cáncer de mama.
*SD=Sin datos

La mayoría de los casos estudiados se encuentran en la fase clínica II, seguido de la fase clínica III, I y IV. Esto nos habla de una mejora en la detección temprana de cáncer de mama en México.



Gráfica 3. Antecedentes en pacientes con cáncer de mama.

La mayoría de los casos estudiados presenta antecedentes familiares de cáncer de mama, esto deja claro la presencia de cáncer de mama hereditario.

PCR en tiempo real

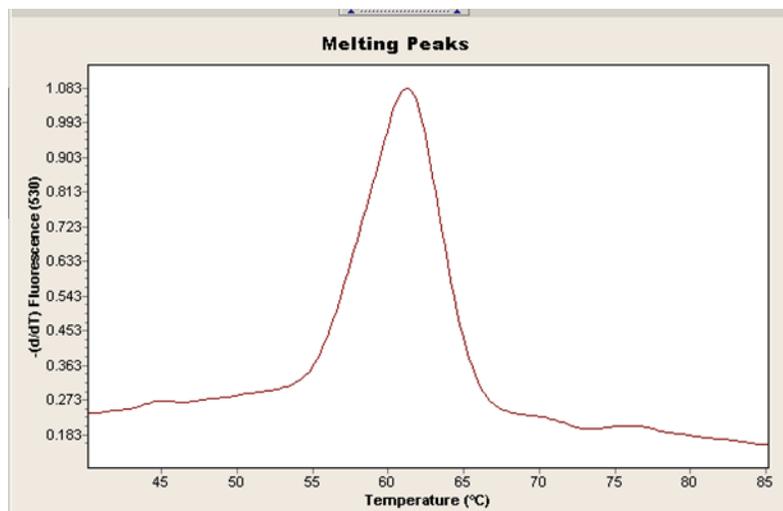


Figura 9. Genotipo Isoleucina/Isoleucina (I/I) en paciente con cáncer de mama

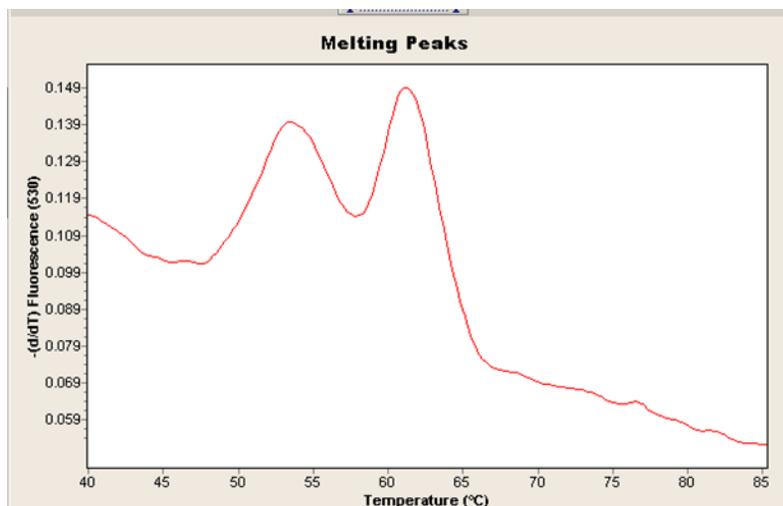


Figura 10. Genotipo Isoleucina/Valina (I/V) en paciente con cáncer de mama

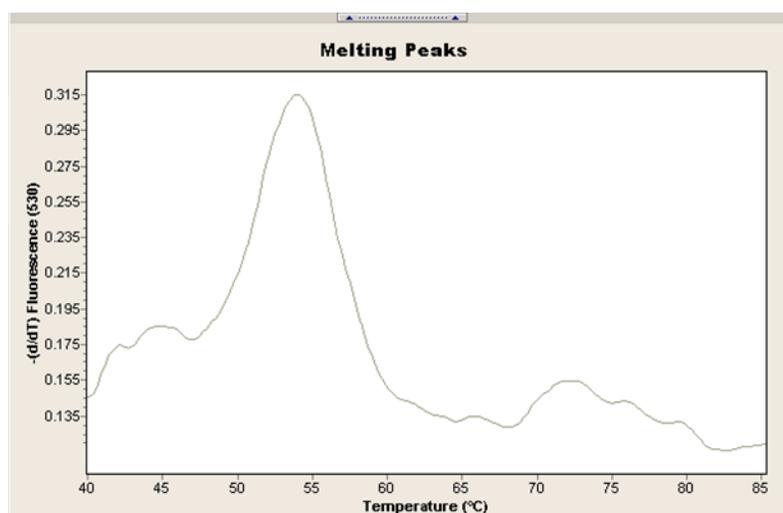
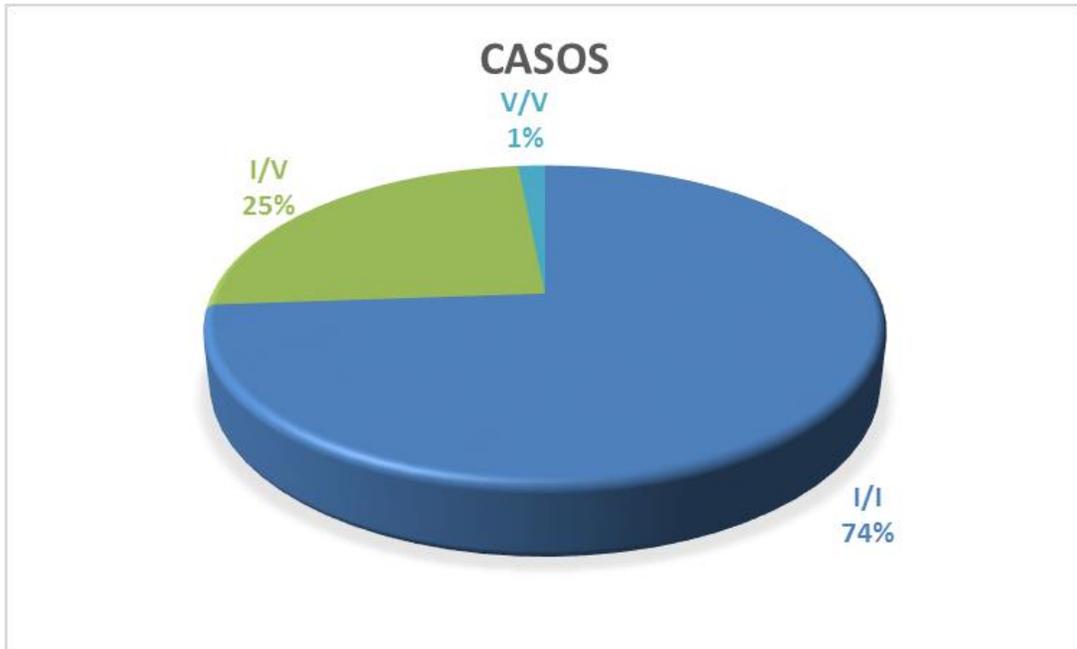


Figura 11. Genotipo Valina/Valina (V/V) en paciente con cáncer de mama

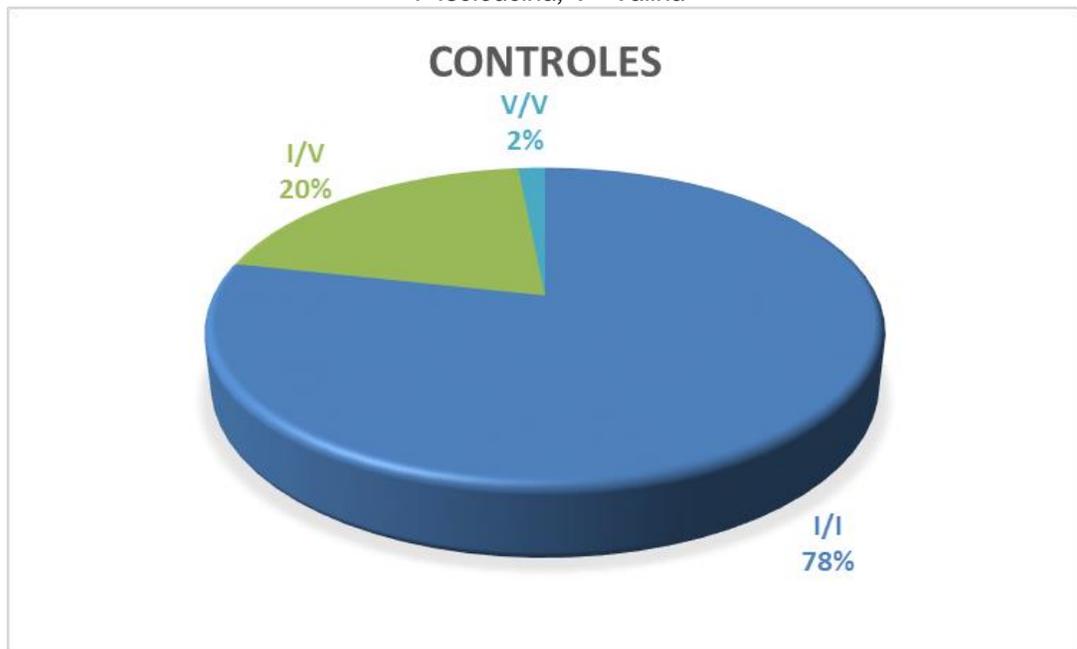
Cuadro 1. Genotipificación del polimorfismo Ile655Val y frecuencia alélica para casos y controles

La cantidad de genotipos homocigotos y heterocigotos son muy parecidas entre casos y controles, así como la cantidad y porcentaje de cada alelo

Genotipo	I/I	I/V	V/V	Total	Adenina	Guanina
Casos	48	16	1	65	112	18
Controles	51	13	1	65	115	15
Total	99	29	2	130	227 (87.3%)	33 (11.5%)



Gráfica 4. Porcentajes de genotipos en casos
*I=Isoleucina, V= Valina



Gráfica 5. Porcentajes de genotipos en controles
*I=Isoleucina, V=Valina

Cuadro 2. Pruebas estadísticas

Prueba estadística	Resultado experimental	Resultado teórico o definición
Equilibrio de Hardy Weinberg	F (I/I) = 0.77 = 77% F (I/V) = 0.22 = 22% F (V/V) = 0.01 = 1%	F (I/I) = 0.782 = 78.2% F (I/V) = 0.206 = 20.6% F(V/V) = 0.012 = 1.2%
Frecuencias alélicas	Isoleucina = 87.3% Valina = 11.5%	Isoleucina = 87.9% Valina 12.1%
Chi cuadrada (V = 2, p = 0.05)	$X^2 = 0.401$	$X^2 = 5.991$
Odd Ratio con IC 95%	OR = 1.29 Límite superior = 1.741 Límite inferior = 0.19	OR < 1 Hay poca asociación entre las variables OR = 1 No hay asociación entre las variables OR > 1 Si hay asociación entre las variables y es más fuerte mientras más alejado se encuentre de la unidad (1)
Valor predictivo positivo	0.55	
Valor predictivo negativo	0.51	
Sensibilidad	26.15%	Cercano a 100%
Especificidad	21.53%	Cercano a 100%

DISCUSIÓN

Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas de casos y controles son similares a las obtenidas de Ensembl⁴¹, una base de datos sobre el genoma de diferentes vertebrados, en este caso se buscaron en el ser humano, y ambas poblaciones están en equilibrio, se esperaba que los pacientes con cáncer de mama fueran portadores del genotipo I/V o V/V para el polimorfismo Ile655Val pero la mayoría presentó genotipo I/I, y para los controles si se obtuvo lo esperado, esto nos da un primer indicio de que el polimorfismo no está relacionado con la presencia de cáncer de mama.

El valor de chi cuadrada obtenido es mucho menor al valor reportado en tablas para datos con 2 grados de libertad por lo que se rechaza la hipótesis nula que dice que el polimorfismo está directamente relacionado con la posibilidad de desarrollar cáncer de mama, y se acepta la hipótesis alterna que nos dice lo contrario, teniendo así un segundo indicio de que los portadores de este polimorfismo no necesariamente presentarán la enfermedad.

El valor de Odd ratio nos ayuda a conocer la fuerza de asociación entre el resultado de la prueba y la enfermedad, es decir nos indica la posibilidad que existe de que una persona tenga la enfermedad si presenta un resultado positivo o bien la probabilidad de que una persona no presente la enfermedad si obtiene un resultado negativo. Cuando el valor es 1 se dice que la prueba no es útil ya que no puede discernir entre un verdadero positivo y un falso positivo. Si el valor es mayor a 1 quiere decir que la prueba realizada es más útil en pacientes enfermos que en sanos. Este cálculo nos dice que si se obtiene un valor menor a 1 se debe calcular

la IC al 95% para asegurar la veracidad del resultado, en la cual se obtuvieron límites superior e inferior y el rango incluye la unidad (1) lo que nos dice que efectivamente no hay asociación entre las 2 variables estudiadas.

Los valores predictivos positivo y negativo únicamente nos dicen cuántos resultados verdaderamente positivos y negativos se obtuvieron con la técnica utilizada, que en este caso son solo un 50% de los casos y controles, que no es un resultado deseado ya que se quiere utilizar la técnica y la identificación del polimorfismo como prueba predictiva del cáncer de mama. Aunque lo obtenido se justificaría ya que la presencia del polimorfismo en la población en general es mínima y el número de muestras analizadas no es muy grande, a comparación con otros estudios realizados en diferentes poblaciones, esto suele afectar los valores predictivos.

La sensibilidad es la proporción de pacientes bien diagnosticados con la enfermedad utilizando esta técnica, según un estándar de referencia, y la especificidad es la proporción de pacientes bien diagnosticados sin la enfermedad de acuerdo a un estándar de referencia. Los valores obtenidos nos indican que esta es una prueba complementaria al diagnóstico, ya que al obtener una alta especificidad es una técnica que ayuda a detectar, en este caso, mutaciones de poca prevalencia en la sociedad, pero al tener un valor bajo de sensibilidad queda descartada como prueba única diagnóstica.

Finalmente se tomaron los casos que fueron heterocigotos u homocigotos mutados y se analizaron características como la edad de diagnóstico que se encontró entre los 28 hasta los 69 años, muy similar al rango que incluye todos los casos, lo que nos indicaría que la presencia del polimorfismo no necesariamente provoca una

aparición temprana del cáncer de mama. En cuanto a los antecedentes, la mayoría contaba con familiares con cáncer de mama, excepto una paciente que no presentaba antecedentes de ningún tipo de cáncer, por lo que no es cien por ciento seguro que se herede de este polimorfismo, cabe mencionar que se contaba con muestras de padre e hija con cáncer de mama y no se obtuvieron resultados iguales, es decir uno era homocigoto silvestre y el otro heterocigoto, por lo que no se puede asegurar que este polimorfismo se herede directamente y se debe estudiar su utilidad en familiares de pacientes, con un mayor número de implicados. En cuanto al estadio clínico la mayoría se encuentra entre el I y el II, dato que no apoya la teoría de que los portadores de Valina tienen un peor pronóstico, ya que es en estos estadios en los que es más fácil tratar la enfermedad.

CONCLUSIÓN

No se encontraron diferencias en los genotipos observados para casos y controles por lo que no se recomienda que el polimorfismo Ile655Val sea usado como valor predictivo del cáncer de mama. Para asegurar estos resultados y seguir estudiando el comportamiento de la enfermedad en la población mexicana se recomendaría analizar el ADN del paciente y sus familiares más cercanos, ya que esto sería una prueba más veraz de cuál es la probabilidad de heredar el polimorfismo y de padecer cáncer de mama.

PERSPECTIVA

También sería interesante estudiar a la población con cáncer de mama esporádico que se comporta totalmente diferente al hereditario, con esto se sabría si el polimorfismo sería eficaz como valor predictivo en aquellas personas que no tengan antecedentes familiares de cáncer y no pertenezcan a ningún síndrome de cáncer hereditario.

REFERENCIAS

1. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Comunicado de prensa núm. 61/18. México: 2018. 1-13.
2. Carrillo-Moreno DI et al. Association of a *HER2* Ile655Val (Rs1136201) polymorphism in breast cancer in a Mexican population. *World Journal of Research and Review*. 2016 [Consultado el 6 de mayo de 2019]; vol. 3 (3): 15-20.
3. Global Cancer Observatory [Internet]. France: International Agency for Research of Cancer. WHO [Consultado el 1 de abril de 2019]. Disponible en: gco.iarc.fr
4. Maffuz-Aziz A et al. Supervivencia de pacientes con cáncer de mama. Análisis por factores pronóstico, clínicos y patológicos. *Ginecol. Obstet. Mex.* [Internet] 2016 [Consultado el 1 de abril de 2019]; vol. 84 (8): 498-506. Disponible en: www.medigraphic.com
5. Millán SV, Ostrosky TW, Martínez PMN. Manual de asesoramiento genético en oncología. Asesoramiento genético en oncología. Sociedad Mexicana de oncología. Ed. Permanyer México. 2017. México. Págs.: 33-40.
6. Margarit S. Cáncer hereditario de mama. *Rev. Chil. Radiol.* [Internet] 2008 [Consultado el 7 de mayo de 2019]; vol. 14 (3): 135-141. Disponible en: scielo.conicyt.cl
7. DeVita Jr. VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. Novena edición. USA: Ed Wolters Kluwer Health; 2011.
8. Rare Commons. La importancia de los biomarcadores en el desarrollo de fármacos. [Internet] Barcelona: Hospital Sant Joan de Déu. 25 de abril de 2016 [Revisado el 26 de abril de 2016; consultado el 9 de abril de 2019]. Disponible en: www.rarecommons.org
9. Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es un marcador tumoral? [Internet] USA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. [Revisado el 4 de noviembre de 2015; consultado el 9 de abril de 2019]. Disponible en: www.cancer.gov
10. Menéndez HM, Hernández RMA. Oncogenes y cáncer. *Rev. Cubana Oncol.* [Internet] 1999 [Consultado el 10 de abril de 2019]; vol. 15 (2): 131-139. Disponible en: bvs.sld.cu
11. *Biocancer Research Journal*. Proto-oncogenes y oncogenes. [Consultado el 7 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.biocancer.com>

12. Desriani, Arif HW, Yandwiputra BA. Improved PCR-RFLP Method for *Her-2* Ile655Val Breast Cancer Patients Detection *Her2* Ile655Val polymorphism and its association with breast cancer risk: an updated meta-analysis of case-control studies. International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology. 2016; vol. 6 (2): 205-209.
13. Acosta KB. Relación entre Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en genes implicados en la proliferación celular, adhesión y mecanismos de supervivencia y la susceptibilidad al desarrollo del cáncer de mama. [Internet. Tesis doctoral] Argentina 2016: Universidad Nacional de la Plata [Consultado el 4 de abril de 2019]. Disponible en: sedici.unlp.edu.ar
14. Yamamoto T Et al. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature. 1986 Jan. 16-22; vol. 319 (6050); 230-4.
15. Roa I et al. Expresión y amplificación del gen *HER2* en el cáncer gástrico avanzado. Rev. Méd Chile. [Internet] 2013 [Consultado el 29 de marzo de 2019]; vol. 141: 1411-1419. Disponible en: scielo.conicyt.cl
16. Lahera ST, González HOJ. El receptor del factor de crecimiento epidérmico y su papel en el desarrollo tumoral. Rev. Haban. Cienc. Méd. [Internet] 2010 [Consultado el 29 de marzo de 2019]; vol. 9 (2). Disponible en: scielo.sld.cu
17. Colomer R et al. El oncogén *HER2* como ejemplo del progreso diagnóstico y terapéutico en cáncer de mama. Rev. Sen. y Pat. Mamaria [Internet] 2001 [Consultado el 29 de marzo de 2019]; vol. 14 (1): 1-46. Disponible en: www.elsevier.es
18. Flogueira JA. Nuevos mecanismos de tumorigénesis del protooncogén *HER2*. Implicaciones terapéuticas en cáncer de mama. [Tesis] 2006. Universidad de Barcelona [Consultado el 9 de abril de 2019]. Disponible en: diposit.ub.edu
19. Colonia A, Rivera J, Orozco J, Marín D. *HER-2*: Un marcador molecular usado en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. Rev. Méd. Risaralda [Internet] 2015 [Consultado el 9 de abril de 2019]; vol. 21 (1): 31-37. Disponible en: www.scielo.org.co
20. Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. Papel en la vía fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K/Akt) en humanos. Rev. Cienc. Salud. Bogotá [Internet] 2009 [Consultado el 4 de febrero de 2020]; vol. 7 (2): 47-66. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/>
21. Baselga J. Et al. Phase III study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185her2 monoclonal antibodies in patients with *HER2*/neu-

- overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1996. Vol. 14; 737-744.
22. Fleishman S.J. et al. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of *erbb2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002. Vol. 99; 15937- 15940.
 23. González ASMI et al. Factores pronósticos del cáncer de mama y oncogén *HER2/neu*. *Rev. Electron. Biomed.* [Internet] 2006 [Consultado el 7 de mayo de 2019]; vol. 2: 72-88. Disponible en: biomed.uninet.edu
 24. Frank B et al. The rare ERBB2 variant Ile654Val is associated with an increased familial breast cancer risk. *Breast Cancer Research.* [Internet] 2005 [Consultado el 7 de mayo de 2019]; vol. 7 (2): 1-18. Disponible en: breast-cancer-research.biomedcentral.com
 25. Eugenomic. Polimorfismo genético (SNP) [Internet]. Eugenomic. Publicado el 8 de noviembre de 2018 [Revisado en abril de 2019; Consultado el 29 de marzo de 2019]. Disponible en: www.eugenomic.com
 26. Belloso HW, Redal AM. La farmacogenómica y el camino hacia la medicina personalizada. *Medicina* [Internet] 2010 [Consultado el 12 de abril de 2019]; vol. 70: 265-274. Disponible en: www.medicinabuenaosaires.com
 27. Caratachea CMA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* [Internet] 2007 [Consultado el 12 de abril de 2019]; vol. 20 (3): 213-221. Disponible en: www.medigraphic.com
 28. NCBI [Internet]. Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine. Clin. Var. NM_001005862.2 (ERBB2): c.1873A>G (p. Ile625Val). [Revisado el 31 de marzo de 2018; Consultado el 29 de marzo de 2019]. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov
 29. Orozco-Quiyono M, Espinoza-Contreras F, Rodríguez-Cuevas AS, Valle-Solís AAE. Ile655Val del gen *HER2* y su posible valor predictivo en pacientes con síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. *Gaceta Mexicana de Oncología* [Internet] 2018 [Consultado el 1 de abril de 2019]; vol. 17: 108-113. Disponible en: www.gamo-smeo.com
 30. Milikan, R. et al. *HER2* codon 655 polymorphism and risk of breast cancer in African Americans and whites. *Breast cancer research and treatment.* Vol. 79, 355–364 (2003).
 31. Xie, D. et al. Population-based, case-control study of *HER2* genetic polymorphism and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* (2000) Vol. 92, 412–417.

32. Ma Y Et al. Lack of association between *HER2* codon 655 polymorphism and breast cancer susceptibility: meta-analysis of 22 studies involving 19,341 subjects. *Breast Cancer Res. Treat.* [Internet] 2011 [Consultado el 6 de mayo de 2019]; vol. 125 81): 237-241. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov
33. Astorga AM et al. Association of *HER2* 655 Ile-> Val polymorphism with pathological response to neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* [Internet] [Consultado el 6 de mayo de 2019]; vol. 28. Disponible en: ascopubs.org
34. Madhu KB, Chaudhary S, Panda AK, Ranjan MD, Mishra SK. *Her2* Ile655Val polymorphism and its association with breast cancer risk: an updated meta-analysis of case-control studies. *Scientific Reports.* 2018; 8 (7427).
35. Wang-Gohrke S, Chan-Claude J. Re: Population-Based, Case-Control study of *HER2* genetic polymorphism and breast cancer risk. *JNCI* [Internet] 2001 [Consultado el 7 de mayo de 2019]; vol. 93 (21): 1657. Disponible en: academic.oup.com
36. Hishida A Et al. Re: Population-Based, Case-Control study of *HER2* genetic polymorphism and breast cancer risk. *JNCI* [Internet] 2001 [Consultado el 7 de mayo de 2019]; vol. 94 (23): 1807-1808. Disponible en: academic.oup.com
37. Greif G. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Instituto Pasteur Montevideo [Internet] [Consultado el 10 de abril de 2019]. Disponible en: www.chlaep.org.uy
38. Programa de formación del profesorado UNED. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [Internet] 2000 [Consultado el 7 de mayo de 2019]. Disponible en: cosmolinux.no-ip.org
39. UNAM. PCR en tiempo real. [Internet]. México: Facultad de Química [Consultado el 1 de abril de 2019]. Disponible en: quimica.unam.mx
40. Vinueza-Burgos C. PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular. *Rev. Electrónica Vet.* [Internet] 2009 [Consultado el 1 de abril de 2019]; vol. 10 (2): 1-13. Disponible en: www.redalyc.org
41. Ensembl. Rs1136201 SNP [Internet] UK: The European Bioinformatics Institute. [Consultado el 6 de mayo de 2019]. Disponible en: www.ensembl.org

ANEXO 1

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO ILE655VAL DEL GEN HER2 POR PCR EN TIEMPO REAL Y SU PROBABLE VALOR PREDICTIVO DE METÁSTASIS A ÓRGANOS VITALES, EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO (CMOH).

INSTITUCIÓN: Centro Médico Nacional “20 de noviembre”, I.S.S.S.T.E.

RESPONSABLE: Dra. Martha Orozco Quiyono.

Adscrita a la División de Investigación Biomédica

CARTA DE CONSENTIMIENTO

(Con copia para participante)

OBJETIVO GENERAL:

Se me invita a participar, libre y voluntariamente, en un proyecto de investigación que incluye pacientes con cáncer de mama que cumplan con criterios de Síndrome de Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (SCMOH), se me explica cuáles son, de los que cumpla cuando menos uno de ellos, por lo que se me incluirá en un estudio molecular a través de la toma de muestra de sangre periférica para el análisis de una variante genética (Ile65Val), de un gen (*HER2*) que se ha asociado con peor pronóstico en este tipo de cáncer reportado en la literatura internacional y en otras poblaciones. En esta variante genética se investigará la posible asociación a órganos vitales en el caso de metástasis, que en un futuro sea de utilidad este conocimiento para el tratamiento especializado en pacientes con estadios clínicos sin metástasis; además de la posibilidad de detectar la alteración genética en descendientes de pacientes con SCMOH.

Consideraciones generales:

- El grupo de investigación consultará su historia médica para obtener información pertinente al proyecto de Investigación
- Nosotros protegeremos la confidencialidad de las muestras llevándolas al anonimato; en otras palabras, después de que la muestra sea tomada, todos los identificadores que permitirían dar con usted, serán borrados. El investigador podrá decidir si incluye información específica con la muestra (como su edad, su sexo, o ciertos datos clínicos, patológicos o demográficos, etc.); esta información, sin embargo, no permitirá que usted sea identificado o localizado.
- El DNA obtenido de la muestra sanguínea se guardará bajo la responsabilidad de los investigadores relacionados al proyecto de investigación y será por 10 años.
- Usted no recibirá beneficio personal de ninguna clase por su participación en este proyecto de investigación. Sin embargo, nosotros esperamos que los resultados obtenidos nos permitirán ampliar el conocimiento que se tiene sobre el cáncer en estudio.
- Aun cuando la toma de la muestra de sangre no cause problemas serios para la mayoría de la gente, esta puede ocasionar un poco de sangrado, magulladura, desvanecimiento, vértigo, infección y/o molestia en el sitio de la punción.
- Toda la información obtenida acerca de usted y de los resultados de la investigación será tratada confidencialmente. Esta información será inmediatamente llevada al anonimato.
- Sus resultados personales no aparecerán en su historia médica, de tal manera que es imposible asociarlos con usted.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados o comunicados por otros medios, pero no serán relacionados con usted.

- Puesto que toda la información en este proyecto de investigación es llevada al anonimato, sus resultados personales no pueden estar disponibles para terceras personas como empleadores, organizaciones gubernamentales, compañías de seguros o instituciones educativas. Esto también se aplica a su cónyuge, a otros miembros de su familia y a su médico.
- Sin embargo, con la finalidad de asegurar el manejo apropiado de los datos de la investigación, es posible que un miembro de un Comité de Ética pueda consultar los datos de su investigación, así como su historia clínica.
- Ya que sus datos han sido llevados al anonimato, se hace por lo tanto imposible comunicarle los resultados. A pesar de esto, usted se puede comunicar con el grupo de investigación para obtener información sobre el estado del trabajo o sobre los resultados generales del proyecto de investigación.
- Usted podrá reunirse con el Consejero Genetista en cualquier momento.
- El que usted no desee participar en el proyecto, no modificará absolutamente su atención Institucional.
- Si habiendo aceptado participar en el proyecto, en el transcurso del mismo es su deseo abandonarlo, se eliminará su información y se desechará su muestra biológica.
- Si desea información adicional de los miembros del grupo de investigación, en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar con la Dra. Martha Orozco Quiyono en el siguiente número telefónico: (55) 52-00-50-03, extensión 14582.
- Si usted quisiera discutir su participación con una persona que no esté directamente en el proyecto (delegado, comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar al Presidente del Comité de Ética del CMN "20 de noviembre", ISSSTE, Dra. Zoé Sondón al teléfono: (55)52-00-50-03, extensión 14296.

Yo _____, he sido informado/a verbalmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético del polimorfismo del Gen HER2 y Cáncer de Mama y Ovario Hereditario (CMOH).

El/La Dr./Dra. _____ me explicó la naturaleza y el progreso del proyecto de investigación. Yo me he familiarizado con el Formato de Consentimiento y he tenido la oportunidad de hacer preguntas que me han sido respondidas. Después de reflexionar, yo estoy de acuerdo en participar en este proyecto de _____ Investigación sobre el cáncer de _____

¿Podrá su muestra, una vez llevada al anonimato, ser usada en otra investigación genética? En dichas investigaciones se podría requerir de la entrega de muestras a otros investigadores incluyendo a aquellos de fuera de la Institución.

Sí acepto (firma) _____ **No acepto** () marcar con "X"

Tanto el proyecto de investigación, como las condiciones de participación, se describieron al participante. Un miembro del grupo de investigación respondió las preguntas y explicó que la participación es voluntaria.

Nombre y Firma participante:

Domicilio _____ Tel. _____

Nombre y Firma testigo1:

Parentesco _____ Domicilio _____ Tel. _____

Nombre y Firma Testigo2:

Parentesco _____ Domicilio _____ Tel. _____

Nombre y Firma Tutor (en caso de menor de edad o incapacitado legalmente):

Parentesco _____ Domicilio _____ Tel. _____

Nombre y Firma Investigado: _____