



**FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RELACIÓN DEL POLIMORFISMO PHE31ILE Y NIVELES DE EXPRESIÓN
DEL GEN *STK15* EN CÁNCER DE MAMA FEMENINO**

**Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología**

**Profesor Guía
María José Muñoz Guijarro, M.Sc.**

**Autor
Fabián David Oña Cisneros**

**Año
2014**

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María José Muñoz Guijarro, MSc

Master en Genética

1716764277

DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Fabián David Oña Cisneros
171783774-2

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los Hospitales Solón Ayala Espinosa “SOLCA” y Eugenio Espejo por proporcionar las muestras biológicas utilizadas en el presente trabajo

Quiero agradecer a la Dra. Gabriela Jaramillo Koupermann por ser mi guía en el inicio de este proyecto de investigación y a la Master Ma. José Muñoz por trabajar y pulir este trabajo en su parte final. De manera especial agradezco al Biolg. Andrés López-Cortes por todas sus enseñanzas y tiempo invertido en este trabajo. Agradezco a la Dra. Malena Ortiz, por su ayuda en el análisis de las muestras de patología

De manera general agradezco al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Universidad de las Américas por financiar mi trabajo de titulación y por brindar un continuo soporte a mi trabajo

DEDICATORIA

A Matías, mi hijo, por ser lo más hermoso que la vida me ha dado y mi eterna inspiración

A Gabriela, mi esposa, por todo el tiempo que le he quitado para hacer este proyecto y porque siempre sentí su apoyo y su amor en todo momento

A Nelly, mi madre, por mostrarme el camino y por pulir mi carácter

A Blanquita, mi abuelita y madre, por ser la única persona que jamás dejó de creer en mi

A César, mi abuelito, por ser conmigo como un padre y por darme tanto amor en silencio

A César, mi tío, por sus cuidados, su cariño y por su calidad como ser humano

A Alfonso, mi padre, por cuidar bien de mi madre, por hacer de casa un hogar y por querer tanto a mi hijo

A Israel y Gerson, mi hermanos, por hacerme sentir cada día mas orgulloso de ellos.

Y finalmente a todos aquellos que de una u otra manera han aportado en mi vida.

RESUMEN

El gen *STK15*, que codifica para la proteína Aurora-A, ha llamado la atención debido a su relación directa con el ciclo celular por actuar tanto en la maduración del centrosoma como en el correcto ensamblaje del huso en la mitosis celular. El polimorfismo Phe31Ile (1712T>A) del gen se ha identificado como alterador funcional de esta quinasa, la variante Ile31 se asocia con la ocurrencia de segregaciones cromosómicas erradas y progresión tumoral. El objetivo de esta investigación fue asociar el polimorfismo Phe31Ile y la expresión del gen *STK15* con el riesgo a desarrollar cáncer de mama y establecer relaciones con factores hormonales, características tumorales y estadio de la enfermedad en población femenina ecuatoriana. Se trata de un estudio caso-control en el que se examinó la contribución del polimorfismo a la susceptibilidad para el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Los genotipos fueron obtenidos de 122 pacientes con cáncer de mama y 148 individuos sanos como controles. Se encontró que el genotipo Ile/Ile se asoció significativamente incrementado el riesgo de ocurrencia de cáncer de mama (OR=2.46; 95%IC: 1.18-5.14; P=0.034). El riesgo de ocurrencia de cáncer de mama fue mayor en mujeres menores de 50 años (OR=3.39; 95%IC: 1.28-8.96; P=0.001), en tumores SBRIII (OR=6.4; 95%IC: 1.34-30.14; P=0.0019) y con la sobreexpresión de Her2/neu (OR: 3.8; 95%IC: 1.11-12.64; P=0.032). El gen *STK15* se encontró expresado 3.6 veces más en los tumores tipo Basal-Like comparado con el tejido no tumoral y no se evidenció sobreexpresión en los tumores tipo Luminal A. Además, la sobreexpresión del gen *STK15* se asoció con la presencia del alelo Ile en los tumores analizados. En conclusión, este estudio proporciona la primera evidencia de que el genotipo Ile/Ile del gen *STK15* y su sobreexpresión en tumores Basal-Like está asociado con un mayor riesgo de ocurrencia de carcinoma mamario en población ecuatoriana y un mal pronóstico, respectivamente. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que *STK15* es un gen candidato de susceptibilidad para el desarrollo tumoral en humanos y su utilidad como posible biomarcador de susceptibilidad en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con cáncer de mama.

ABSTRACT

The *STK15* gene, which encodes for the Aurora-A protein, has attracted attention due its' direct relationship with cell cycle by acting both centrosome maturation and proper spindle assembly in cell mitosis. The Phe31Ile (1712T>A) polymorphism of *STK15* gene has been identified as an altering functional kinase, Ile31 variant is associated with the occurrence of erroneous chromosomal segregation and tumor progression. The aim of this study was to associate Phe31Ile polymorphism and the expression of *STK15* gene with the risk of developing breast cancer and establish relationships with hormonal factors, tumor characteristics and stage of disease in Ecuadorian mestizo female population. This case-control study examined the contribution of this polymorphism to susceptibility to the development and progression of breast cancer. The genotypes were obtained from 122 patients with breast cancer and 148 healthy controls. We found that genotype Ile/Ile associated significantly rising the risk of occurrence of breast cancer (OR= 2.46; 95%IC: 1.18-5.14; P= 0.034). The risk of occurrence of breast cancer was higher in women under 50 years (OR= 3.39; 95%IC: 1.28-8.96; P= 0.001), in tumors SBRIII (OR= 6.4; 95%IC: 1.34-30.14; P= 0.0019) and with Her2/neu overexpression (OR= 3.8; 95%IC: 1.11-12.64; P= 0.032). The *STK15* gene showed 3.6-fold increased expression level in Basal-Like tumors in comparison to non-tumor tissue and no overexpression was evident in tumors Luminal type A. In addition, overexpression of the *STK15* gene was associated with the presence of the Ile allele in the tumors analyzed. In conclusion, our study provides the first evidence that the genotype Ile/Ile of *STK15* gene and its overexpression in tumors Basal-Like is associated with increased risk of occurrence of breast carcinoma in Ecuadorian population and a poor prognosis, respectively. These findings support the hypothesis that *STK15* is a susceptibility candidate gene for tumor development in humans and its use as a potential biomarker of susceptibility in the diagnosis and prognosis of patients

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes.....	1
Justificación	2
Alcance del Trabajo de Titulación	5
Objetivos.....	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos.....	6
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	7
1.1. Aspectos generales del cáncer	7
1.1.1. Biología del cáncer: Carcinogénesis y Metástasis	7
1.1.2. Etiología y epidemiología del cáncer.....	11
1.2. Cáncer de mama femenino	15
1.2.1. Epidemiología del cáncer de mama femenino	15
1.2.2. Etiología y Patología del cáncer de mama.....	18
1.2.3. Cáncer de mama hereditario.....	20
1.2.4. Cáncer de mama esporádico	21
1.2.5. Clasificación del cáncer de mama femenino.....	23
1.2.6. Clasificación molecular del cáncer de mama	28
1.2.7. Genes involucrados en el desarrollo de cáncer de mama	29
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1. Diseño de investigación	37
2.2. Análisis de historias clínicas.....	37
2.3. Obtención de muestras tumorales fijadas y embebidas en parafina.....	37
2.4. Marcaje de zona tumoral en placas y en parafinas.....	39
2.5. Procedimientos.....	39
2.5.1. Extracción de Ácidos Nucleico	39
2.5.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de ADN y ARN.....	43
2.5.3. Obtención de cDNA a partir de ARN total	44
2.5.4. Determinación de Genotipos.....	44
2.6. Análisis Estadístico	47

CAPÍTULO III RESULTADOS	50
3.1. Compilación de datos de Historias Clínicas	50
3.2. Clasificación de muestras tumorales.....	50
3.2.1. Tipos de Carcinoma de mama	50
3.2.2. Receptores Hormonales.....	51
3.2.3. Factor de Crecimiento Ki-67.....	52
3.2.4. Invasión a Ganglios Linfáticos (Metástasis Ganglionar)	53
3.2.5. Lateralidad.....	54
3.2.6. Grado Tumoral/Histológico.....	55
3.2.7. Estadío de la Enfermedad (Estadío Tumoral).....	56
3.2.8. Edad	56
3.3. Determinación de Genotipos	57
3.3.1. ADN extraído de sangre periférica y de tejido tumoral fijado y embebido en parafina	57
3.3.2. Amplificación del fragmento de interés del gen <i>STK15</i>	59
3.3.3. Secuenciación Capilar.....	59
3.4. Frecuencia Genotípica y Alélica.....	60
3.5. Fijación del polimorfismo Phe31Ile con las distintas características tumorales y estadío de la enfermedad	61
3.6. Niveles de Expresión.....	63
3.6.1. Expresión gen <i>STK15</i>	63
3.7. Análisis Estadístico	65
3.7.1. Pruebas Chi-Cuadrado y Odds Ratio.....	65
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN	71
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
REFERENCIAS	77
ANEXOS	86

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

En cáncer de mama o neoplasia maligna de mama es el crecimiento descontrolado del células malignas de tejido mamario (Winchester & Winchester, 2006, p.31). Este crecimiento celular forma tejidos denominados tumores que en el transcurso del tiempo interfieren con el funcionamiento normal del órgano o zona corporal donde se ubican. Una de las características del cáncer es la metástasis, que se traduce en la capacidad de las células malignas de llegar al torrente sanguíneo o al sistema linfático e invadir a otros órganos (Mansel, Fodstad y Jiang, 2007, p.3) La metástasis se presenta por lo regular en estadíos tardíos de la enfermedad, sin embargo, existen tipos de cáncer de mama altamente agresivos que disparan su metástasis en etapas tempranas y que determinan un mal pronóstico, que se define como un tiempo corto de vida a partir del diagnóstico, mala respuesta a tratamientos y alta posibilidad de recaídas (Mansel et al., 2007, p.5).

En la mayoría de casos el cáncer de mama se presenta de manera subclínica en etapas iniciales, siendo detectable sólo por estudios de imagen como mastografía, ultrasonido y resonancia magnética (Arce et al., 2011), lo cual desencadena un problema de salud común en el Ecuador, referido específicamente a la medicina preventiva escasamente empleada por individuos adultos y que determina que estos acudan al especialista en etapas tardías. Como consecuencia, la probabilidad de asertividad de los tratamientos es baja y la tasa de mortalidad continúa en ascenso.

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte en los países en vías de desarrollo debido en gran parte a un cambio en el estilo de vida que provoca un aumento en la incidencia y porque los avances clínicos para combatir la enfermedad no están llegando a las mujeres que viven en estas regiones (Ferlay et al., 2013). De manera general, las tendencias mundiales muestran que en las regiones que pasan por cambios socio-económicos

rápidos, que llevan a un estilo de vida similar al de regiones industrializadas, están provocando una casuística creciente de cánceres asociados con factores de riesgo que incluyen: edad avanzada, antecedentes familiares, comportamiento reproductivo, el uso de hormonas exógenas, tiempo de lactancia, número de períodos de gestación a término, diferencias en la masa corporal, ejercicio, dieta y consumo de alcohol (Beral, 2003; Reeves et al., 2007; Monninkhof et al., 2007; Allen et al., 2009).

La Organización Mundial de la Salud (2012), a través de su Agencia para la Investigación en Cáncer, ha estimado que las tasas de mortalidad por cáncer de mama se podrían reducir aumentando el acceso a la medicina preventiva y generando nuevas terapias que reduzcan efectos colaterales tales como disfunción renal, colostomía, neutropenia, urostomía, ente otros e incrementando el nivel de efectividad de los tratamientos afectando en primera instancia al crecimiento de tumor para finalmente optar por cirugía o terapias de destrucción final de tejido maligno.

Justificación

Resultan interesantes, tanto en investigación y farmacológica, los genes que están relacionados con puntos de control en el ciclo celular, los cuales están controlando el proceso de mitosis, ya que un proceso de división alterado y descontrolado provocaría el desarrollo del cáncer. El potencial uso de los polimorfismos y su evaluación en cuanto a los niveles de expresión así como marcadores de susceptibilidad todavía no se han explorado en su totalidad. La mayoría de este tipo de investigaciones se ha realizado en poblaciones asiáticas, europeas y norteamericanas, por lo que requieren de confirmación epidemiológica y experimental en poblaciones que incluyan países en vías de desarrollo donde las frecuencias polimórficas varían en base a la población de estudio y etnia.

La búsqueda, evaluación y descubrimiento de marcadores de riesgo de cáncer de mama podría en el futuro facilitar el tamizaje de individuos con cáncer en el

Ecuador, produciendo un ahorro en el Sistema Nacional de Salud Pública al usar el tratamiento más asertivo para cada individuo y, sobre todo, evitar estragos innecesarios en pacientes y el impacto social que esto conlleva. Además, este estudio generará conocimientos que servirán como punto de partida para investigaciones que a futuro, en base a herramientas Biotecnológicas, puedan probar nuevas moléculas terapéuticas de mejor prognosis, reducción de eventos adversos y mejora en la calidad de vida de pacientes con cáncer.

Se conoce hoy en día que aproximadamente del 15 al 25% de individuos con cáncer de mama presentan una sobreexpresión del gen HER2/neu por lo que es usual el tratamiento de ciertos tipos de cáncer Her2+ con anticuerpos monoclonales humanizados contra la proteína HER2. Otros genes como el *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *AANAT* y *CRY1*, asociados con ciclos biológicos son estudiados actualmente pues se cree que cambios en los ciclos de descanso y actividad pueden determinar el desarrollo de neoplasias malignas de mama. Genes involucrados en la angiogénesis como el *VEGF* han sido importantes en la manufactura de nuevos fármacos como el Trastuzumab que presenta resultados positivos en ciertos casos.

Sin embargo, existe particular interés hoy en día por investigar oncogenes relacionados con el ciclo celular, desde la secuencia de nucleótidos hasta la estructura de proteínas traducidas a partir de estos. El objetivo de estas investigaciones radica en relacionar, los cambios en la secuencia de nucleótidos (polimorfismos), los niveles de expresión del mensajero y la afectación en la función de las proteínas con los distintos estadíos y tipos de cáncer; es por esto que varios oncogenes ciclo celular reguladores han sido considerados en el marco de investigaciones biomédicas por su potencial como futuros targets terapéuticos al tener un rol clave en la división celular que, al ser inhibido, activaría vías de muerte celular tanto intrínsecos como extrínsecos. Entre estos, el gen denominado *STK15* que codifica para la proteína Aurora Quinasa A ha llamado la atención debido a su relación directa con el ciclo

celular (punto de control) y por estar inmerso tanto en la maduración del centrosoma como en el ensamblaje del huso en la mitosis celular (Khan et al., 2011; Kiat & Gopalan, 2007). Este gen junto con otros, de la misma familia de Quinasas, como el *STK12* y *STK13* son quienes regulan y controlan la correcta segregación de los cromosomas y la división celular (Jingyan, 2007), un proceso que está dañado y descontrolado, en varios tipos de cáncer, y que guardan relación directa con aneuploidías como en el caso del cáncer de mama (Sun et al., 2004).

Un polimorfismo en la zona codificante del ARNm del gen *STK15* se ha identificado como alterador funcional de esta Quinasa. El polimorfismo Phe31Ile (1712T>A) cambia la secuencia de los aminoácidos de la proteína traducida; la variante 31Ile se asocia con la ocurrencia de segregaciones cromosómicas erradas y con la tumorigénesis en el cáncer, y por potenciar y promover los eventos metastásicos en fases tardías de la enfermedad (Sun et al., 2004; Xu et al., 2013).

Estudios recientes han propuesto a la Aurora Quinasa A como una promesa en el tratamiento de varios tipos de Cáncer, incluyendo al de Mama. Estudios oncológicos en fase II, han tenido resultados prometedores al probar nuevas moléculas sintéticas mediante técnicas biotecnológicas e incluso la aplicación de ARNi (ARN de Interferencia) para bloquear a esta proteína (Xu et al., 2013; Wenging et al., 2011; Ursula et al., 2012).

Las investigaciones no solo se han centrado en las pruebas de estas moléculas, también se incluye la posibilidad de utilizar a la Aurora Quinasa A como un Biomarcador para individuos afectados con cáncer en estadios tempranos, otra vía en la que la Biotecnología cumplirá un rol importante (Mendiola M et al., 2009).

Los resultados obtenidos hasta el momento no reportan datos sobre la relación, incidencia y comportamiento del gen *STK15* en población sudamericana con

cáncer, además se ha establecido que este gen se comporta de manera distinta según la etnia (Abba et al., 2010) pues hasta el momento se ha estudiado a grupos étnicos caucásicos del centro y norte de Europa, norafricanos, población Han Asiática y norteamericanos (Xu et al., 2013; Wenging et al., 2011; Ursula et al., 2012; Sun et al., 2004; Xu et al., 2013), con reportes de resultados distintos según la zona del estudio.

En el Ecuador y a nivel latinoamericano, hasta la fecha de elaboración del presente trabajo, no se han reportado datos sobre un estudio que incluya al gen *STK15*, su comportamiento en población latina mestiza y sus niveles de expresión en relación a el desarrollo del cáncer de mama femenino lo que justifica la incursión en la investigación y el reporte de los datos obtenidos en esta investigación.

Alcance del Trabajo de Titulación

El alcance del presente trabajo radica en establecer la relación entre el polimorfismo Phe31Ile y los niveles de expresión del gen *STK15* con el desarrollo y progresión del cáncer de mama en mujeres ecuatorianas mestizas afectas y compararlas con mujeres sanas con similar rango de edad y localidad. Además, se relacionó los resultados con el estadío de la enfermedad, receptores hormonales, marcadores de crecimiento tumoral, edad del paciente y tipo de cáncer; se buscó relaciones significativas del polimorfismo y de los niveles de expresión con estos parámetros.

El estudio genómico y de expresión se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas (IIB-UDLA), el estudio Inmunohistoquímico y patológico tisular se realizó en los Hospitales Eugenio Espejo y SOLCA de la ciudad de Quito. Los resultados obtenidos y las conclusiones a partir de estos serán considerados como punto de partida para proyectos futuros de investigación.

Objetivos

Objetivo General

Relacionar el polimorfismo Phe31Ile y la expresión del gen *STK15* con el estadio y el tipo de tumor en una muestra de población ecuatoriana femenina afectada con cáncer de mama.

Objetivos Específicos

- Comparar las frecuencias alélicas obtenidas entre individuos afectados y controles.
- Asociar los resultados con el potencial riesgo de desarrollar cáncer de mama y como un factor de pronóstico en pacientes.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Aspectos generales del cáncer

1.1.1. Biología del cáncer: Carcinogénesis y Metástasis

Una célula normal crece y se divide a un ritmo controlado y permanece en el área donde se ha originado. El ciclo celular conlleva a la formación de nuevas células y es un proceso vital dentro de un tejido, así se sustituyen las células que han entrado en un proceso de muerte celular para que la función de dicho tejido, que forma un órgano, se mantenga saludable y funcional. La división celular está rigurosamente regulada por una serie de mecanismos de control, los cuales disparan o detienen el proceso cuando sea requerido.

Cuando una célula envejece, una serie de mecanismos se activan para llevarla a una muerte programada a través de una vía activada por la mitocondria, esta es la ruta apoptótica intrínseca que se diferencia de la extrínseca por activarse a partir de daños generados en el ADN o estrés celular por envejecimiento y no por interacción con receptores de muerte, algo característico de la ruta extrínseca (Elmore, 2007). La muerte celular y la generación de nuevas células deben conservar un equilibrio para el correcto funcionamiento de tejidos, órganos y sistemas. Una célula normal se convertirá en cancerígena mediante un proceso llamado carcinogénesis, que por definición establece que es un proceso por el cual una célula adquiere la capacidad de multiplicarse incontroladamente e invadir otros tejidos y, por tanto, es promotora de la tumorogénesis (Macarulla, Ramos y Tabernero, 2011). El proceso de transformación de una célula normal en cancerígena suele durar años, en la mayoría de los casos (Figura 1), y se da mediante cambios genéticos y mutaciones consecutivas.

Se define al cáncer o neoplasia maligna, entonces, como un fenómeno que se origina cuando un conjunto de células del cuerpo humano crece sin control. Si las células tumorales se agrupan formando un tejido sin que este invada

órganos vecinos o intervenga con alguna función normal del cuerpo se trata de un tumor benigno. Por el contrario, un tumor maligno tiene la capacidad de invadir tejidos adyacentes a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático (Metástasis) y de afectar las funciones fisiológicas normales en la mayoría de casos (Macarulla, Ramos y Taberero, 2011, p.7).

Existe un amplio consenso de que el cáncer es, en esencia, una enfermedad genética y que la acumulación de alteraciones moleculares en el genoma de células somáticas es la base de la progresión del cáncer (DeVita et al., 2011, p.2). En los últimos cinco años los avances en la tecnología de secuenciación de genomas, incluido el humano, ha mejorado considerablemente el entendimiento de esta enfermedad y en especial la influencia en el éxito de fármacos manufacturados para atacar a células neoplásicas provocando la reducción del tumor y, por tanto, mejorando la sobrevivencia de los individuos.

El entendimiento y decodificación del genoma ha generado mapas genómicos que facilitan el rediseño de la taxonomía de los tumores, pasando de lo histológico a un nivel más específico basado en la genética de cada tejido. La genotipificación de los tejidos tumorales ha ayudado a los médicos clínicos tratantes a individualizar los procedimientos mediante un emparejamiento de los pacientes con el mejor tratamiento de acuerdo al perfil tumoral (Naidoo et al., 2011).

Finalmente, los modelos matemáticos y las herramientas bioinformáticas han ayudado al desciframiento del genoma a través del entendimiento de los múltiples procesos biológicos que modifican el ADN, esto ha abierto una nueva vía de estudio en la que se busca identificar alteraciones a nivel de ADN específicas de cada tumor, lo que corresponde a buscar biomarcadores altamente sensibles para la detección de enfermedades, predisposición a presentarlas, monitoreo y respuesta a tratamiento; todas estas están íntimamente ligadas con la creación de nuevos fármacos que enmarcan nuevos objetivos terapéuticos (DeVita et al., 2011, p.2).

Los genes del cáncer se agrupan de manera general en oncogenes y genes supresores de tumor. Si existe o se genera una mutación en los denominados oncogenes se produce un cambio en la función y crecimiento de cada célula provocado una neoplasia maligna. Los genes supresores de tumores actúan cuando estas mutaciones se generan en los oncogenes, frenando el crecimiento tumoral o tumorigénesis (Weinberg, 2006). Oncogenes y genes supresores de tumor pueden ser clasificados por la naturaleza de sus mutaciones somáticas (Hanahan y Weinberg, 2000). Las mutaciones en oncogenes ocurren con frecuencia en puntos específicos del genoma denominados “*hotspots*”, generalmente afectando al mismo codón o agrupándose en codones vecinos en diferentes tumores. Además, las mutaciones en oncogenes son casi siempre sin sentido o sin efecto y estas mutaciones por lo general afectan a un sólo alelo, formando heterocigotos.

Por otra parte, los genes supresores de tumor poseen una gran cantidad de mutaciones puntuales que pueden truncar la proteína codificada a partir de estos genes y que generalmente afectan a ambos alelos, causando pérdida de heterocigosidad. (DeVita et al., 2011 p.2). La mayor parte de mutaciones somáticas presentes en tumores malignos incluyen sustituciones nucleotídicas, deleciones e inserciones pequeñas (*indels*), rearrreglos cromosómicos y alteraciones de número de copias de genes (Hanahan y Weinberg, 2000). Antes del proyecto del genoma humano, donde la secuencia de la cadena de nucleótidos fue elucidada, algunos genes como el *KRAS*, *TP53* y *APC* fueron descubiertos usando técnicas que incluían oncovirus, estudios de herencia y citogenética (Weinberg, 2006).

La finalización del proyecto genoma humano en el 2004, generó un mapa de la secuencia genética humana normal que junto con la construcción del HapMap, que contiene los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), y la estructura genómica subyacente de la variación genómica humana natural, permiten un extraordinario rendimiento en la catalogación de mutaciones somáticas en el

cáncer. Ya un sinnúmero de estudios han demostrado la utilidad de estrategias enfocadas en la identificación sistemática de mutaciones somáticas asociadas con la progresión del cáncer, desde la secuenciación de primera generación hasta los arreglos de mapeo genético con el ligamiento a la expresión de los genes, claramente demuestran el desarrollo dirigido a la búsqueda de genes del cáncer, su espacio creciente, y su definitivo perfil como el camino a seguir (DeVita et al, 2011 p.2).

El cáncer es una enfermedad genética, sin embargo existen factores no genéticos que pueden desencadenar el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los agentes cancerígenos son sustancias capaces de producir una alteración celular que inicia el proceso de carcinogénesis (Macarulla et al., 2011). Existe una primera fase en la que estos agentes predicen daños en genes relacionados con el crecimiento celular o con la supresión tumoral. La mayoría de veces en la que el ADN se daña la célula muere si no puede reparar el daño. Las células cancerígenas escapan de este mecanismo, y como consecuencia se inicia la división de una célula con alteraciones a nivel del genoma. Las células hijas, por tanto, heredaran los mismos daños que su antecesora. A medida que la división celular tiene lugar en células dañadas y se generen más daños provocados por otros agentes carcinógenos, habrá más células inmaduras, las cuales tendrán una forma, tamaño y función diferente de las células del órgano del que proceden.

De forma general existe un periodo determinado entre la exposición a un agente cancerígeno y el inicio de la enfermedad, por ejemplo la incidencia del cáncer de pulmón aumenta de forma importante después de 10 a 15 años de iniciar el consumo de tabaco. Trabajadores industriales expuestos a genotóxicos que provocan daño a nivel del ADN como temperatura, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, radiaciones electromagnéticas y rayos X, no desarrollan la enfermedad hasta 10 o 20 años después de la exposición (Macarulla et al., 2011). Las células cancerígenas son capaces de propagarse hacia otros tejidos en base a dos mecanismos: invasión y metástasis. La

invasión se define como el rompimiento de la membrana basal para migrar a otros tejidos vecinos, mientras que la metástasis se define como la invasión a tejido lejanos a partir de cambios conformacionales de las células cancerígenas en su estructura, esto le servirá para no ser detectadas por el sistema inmune y así poder llegar a los tejidos distantes (Weinberg, 2006).

Existen tumores con mayor capacidad de formar metástasis que otros, por ejemplo los tumores cerebrales y los tumores de la zona otorrinolaringológica tienen muy poca tendencia a desarrollar metástasis. Por el contrario, el cáncer de pulmón y el de páncreas tienden a diseminarse con mayor frecuencia. (Macarulla, 2011). Las características metastásicas, la agresividad del tumor y su desarrollo son propios de cada tipo de neoplasia. Este comportamiento está ligado a su carga genética y a los factores de riesgo que cada individuo se ve expuesto durante su vida. En la genética clásica se establece que el fenotipo es la suma del genotipo más el ambiente, es decir la carga genética de un individuo más el efecto de factores externos que pueden ser medio ambientales, comportamentales o étnicos. A estos factores externos, en conjunto, se denomina etiología del cáncer (Oliva et al., 2008, p. 32)

1.1.2. Etiología y epidemiología del cáncer

Un factor de riesgo es toda circunstancia o situación que aumenta las probabilidades de una persona de contraer una enfermedad como el cáncer. En el caso de los diferentes tumores, cada uno tiene sus factores de riesgo (Macarulla et al., 2011). Las personas expuestas a un determinado factor de riesgo tienen más probabilidades de desarrollar un determinado tipo de tumor. Además, para el desarrollo de un tipo de cáncer se necesita la actuación conjunta de diversos factores. No todos los fumadores desarrollarán cáncer de pulmón por ejemplo, se necesitan otras circunstancias como la predisposición genética, un genotóxico en particular, la edad del individuo, entre otros, que se sumen al hecho de que un individuo fume para que se desarrolle el cáncer de pulmón (Pass et al., 2012, p.23). Del mismo modo, no todos los individuos que desarrollen un determinado tipo de tumor habrán estado expuestos al factor de

riesgo. Un ejemplo claro de esto es que un 10% de los individuos que presentan cáncer de pulmón no han fumado nunca ni han sido fumadores pasivos, lo que claramente establece que el desarrollo de un tipo de tumor (cáncer) es el resultado de una convergencia de varios factores por lo que el cáncer es una consecuencia multifactorial (Pass et al., 2012, p.23). A continuación se detallarán los factores de riesgo asociados frecuentemente al desarrollo de distintas neoplasias malignas en base a varios estudios llevados a cabo en individuos alrededor del mundo.

El consumo de tabaco causa más de 1 millón de muertes por cáncer cada año a nivel mundial. (WHO, 2008). Cerca del 21% de todas las muertes por cáncer en regiones desarrolladas son producto del consumo de tabaco (Edwards et al, 2010). Hoy en día hay 19 tipos de cáncer para los cuales la evidencia es considerada suficiente para determinar que son causadas por el consumo de tabaco, entre estos están tipos como: pulmón, hígado, estómago, colon, páncreas, riñón, uretra, vejiga, cérvix, ovario, médula ósea, cavidad oral, laringe, faringe, esófago y tumores renales (Macarulla et al., 2011; Ryerson et al, 2007).

A más de esto, existen otros tumores a los cuales el consumo de tabaco influye negativamente, entre estos tenemos al de colon, útero y estómago. Se ha establecido que el consumo de tabaco está relacionado con el desarrollo del cáncer de hígado independientemente de si existe infección viral por hepatitis B o C y consumo de alcohol. Además causa carcinoma cervical de células escamosas donde actúa de forma directa o potenciando el efecto carcinogénico provocado por la infección de papiloma virus humano (Pass et al, 2012).

La inflamación es una de las manifestaciones predominantes de la resistencia innata a patógenos, que a su vez modula y direcciona, la calidad y fuerza de la respuesta inmune adaptativa. Diferentes mecanismos inflamatorios son activados dependiendo del patógeno o el causante del daño al tejido, tipo de tejido y el genotipo del hospedero (DeVita et al., 2008). Además, como en toda

acción que induce una reacción, toda respuesta proinflamatoria está acompañada por una respuesta antiinflamatoria. El balance óptimo entre estas dos respuestas o mecanismos determina la correcta eliminación de la infección o reparación del daño con la recuperación de la homeostasis del tejido, sin embargo, a veces estos mecanismos entran en un estado de equilibrio acompañado de una inflamación crónica que puede persistir por largos períodos de tiempo y que puede inducir daños importantes en el tejido. El cáncer es obviamente una de las consecuencias extremas de las alteraciones en la homeostasis del tejido. No debe sorprender que eventos infecciosos desencadenen un daño a nivel celular y en consecuencia el desarrollo del cáncer (Kumar et al., 2010, cap.6; DeVita et al., 2008)

El consumo de calorías se ha visto asociado con la predisposición a desarrollar una neoplasia maligna. Entre la etiología del cáncer los factores dietéticos son un punto a ser abordado e investigado. El consumo alto en grasas se relacionó con el crecimiento tumoral en modelos animales y se encontró que eleva el riesgo de desarrollo de cáncer mamario y además esta neoplasia se oculta en etapas tempranas, debido al camuflaje del tumor en la masa mamaria aumentada por el sobrepeso (Devita et al., 2012, p. 219).

Realizar ejercicio físico de manera continua disminuye el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer como por ejemplo el de colon (Macarulla et al., 2011). Se estableció que la actividad física en pacientes post quirúrgicos disminuía significativamente la reaparición de actividad tumoral, el riesgo de recaída y el tiempo de sobrevida. La actividad física se asocia con la reducción de masa corporal, uno de los factores de riesgo para el desarrollo de tipos de cáncer como el de mama (DeVita et al., 2012, p. 219).

En lo referente a factores físicos, la radiación ionizante (RI) y los rayos ultravioletas (UV) han afectado la integridad genética de todos los organismos a través del tiempo. Mediante la inducción de daño al ADN y las mutaciones subsecuentes, estos agentes físicos han promovido la diversidad a través de la selección natural y, como resultado, organismos de todos los reinos llevan

genes que codifican proteínas que reparan los daños a nivel del material genético. A pesar de la existencia de muchos mecanismos que resguardan al genoma humano de las acciones mutagénicas provocadas por agentes causantes de daño al ADN, no todas las células expuestas al daño, pueden restaurar la integridad de su material genético y algunas podrían consecuentemente progresar o transformarse en células cancerígenas malignas. Además, por medio de actividades de origen humano la población en general hoy en día está expuesta a nuevos agentes físicos, como radiofrecuencias y radiación de microondas, campos electromagnéticos, asbestos y nanopartículas, para los que la evolución no ha tenido todavía tiempo de diseñar o crear mecanismos de respuesta para la preservación del genoma (DeVita et al., 2012, p.212).

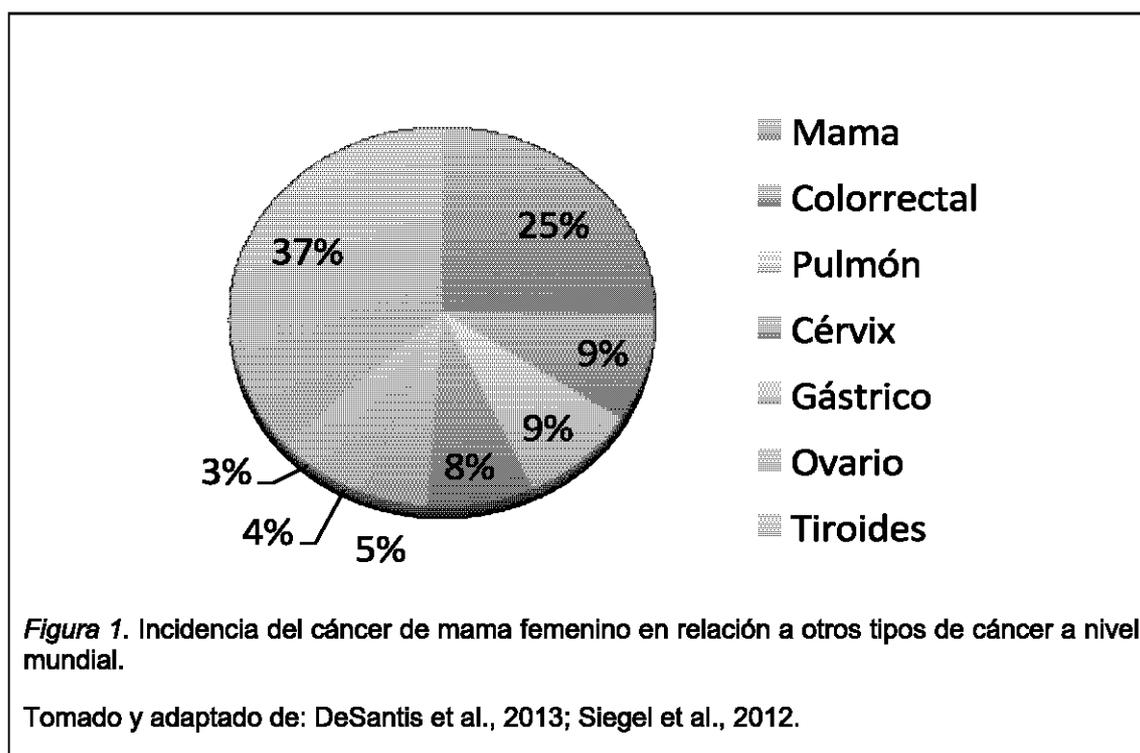
Los rayos UV son los factores físicos más representativos que predisponen al desarrollo del cáncer. Dependiendo de la longitud de onda, la luz UV es categorizada en radiación UVA (320 a 400 nm), UVB (290 a 320 nm) y UVC (240 a 290 nm). La mayor parte de luz UVC emitida por el sol es absorbida a nivel de la atmósfera, por tanto, los organismos vivos están expuestos a la luz UVA y UVB. La luz UVC es la que causa un daño mayor al ADN que la UVA y UVB, esto se debe a que el máximo de absorción de ADN es de alrededor de 260nm. UVB y UVC inducen predominantemente dímeros pirimidínicos. La formación de este tipo de lesiones resulta en la flexión de la cadena de ADN, ocasionando la interferencia tanto de la replicación como de la transcripción del material genético.

La luz UVA por otra parte, no induce la formación de dímeros pirimidínicos pero puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS *por reactive oxygen species*), que a su vez promoverían la formación de proteínas ligantes de ADN monocatenario (SSBs) y lesiones en el ADN de células expuestas.

1.2. Cáncer de mama femenino

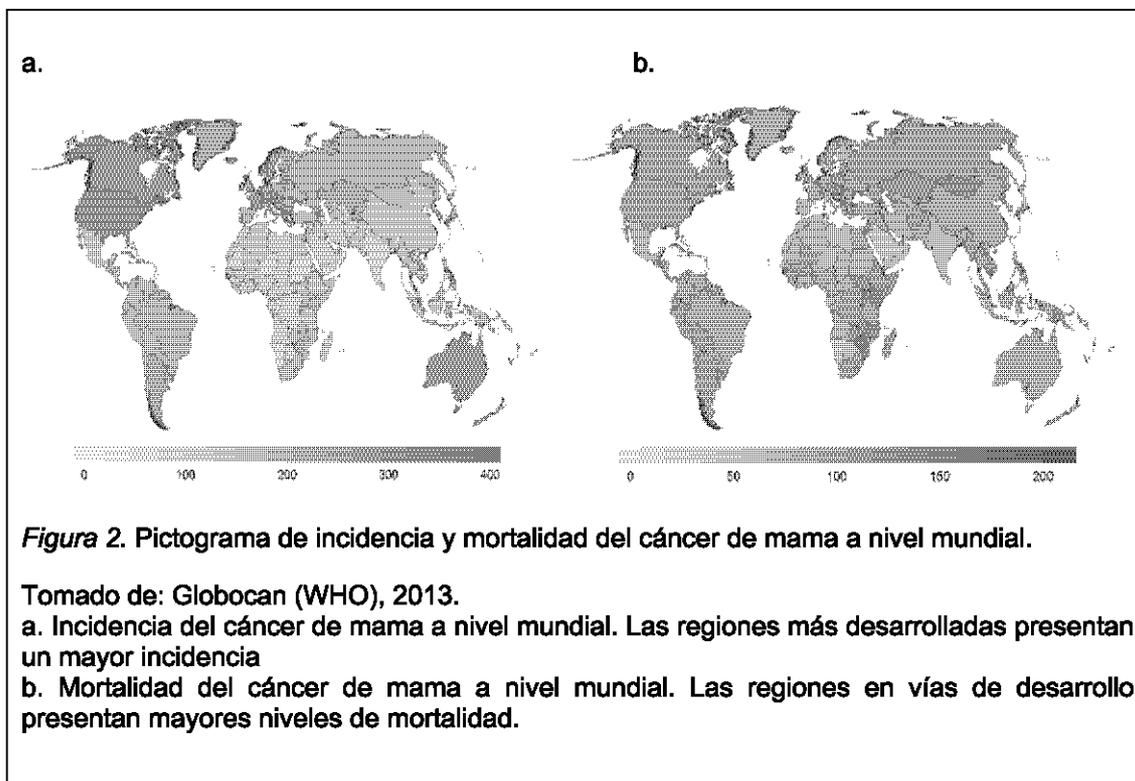
1.2.1. Epidemiología del cáncer de mama femenino

En el año 2012, 1,7 millones de mujeres en todo el mundo fueron diagnosticadas con cáncer de mama. Desde las estimaciones del 2008, la incidencia del cáncer de mama ha aumentado en más del 20%, mientras que la mortalidad aumentó en un 14%. El cáncer de mama es la causa mundial más común de muerte por cáncer entre las mujeres (522,000 muertes en el 2012) y es el tipo de cáncer diagnosticado con mayor frecuencia, entre las mujeres, en 140 de 184 países en todo el mundo. (Ferlay et al., 2013). En la Figura 1, se puede observar la incidencia del cáncer de mama a nivel mundial en datos porcentuales.



La incidencia se ha visto incrementada en la mayor parte de regiones del mundo pero existe una notable inequidad entre regiones desarrolladas y regiones en vías de desarrollo. Según la IARC en el 2012, la incidencia se mantiene más alta en regiones desarrolladas pero, a pesar de tener una incidencia menor, la mortalidad es mayor en regiones en vías de desarrollo

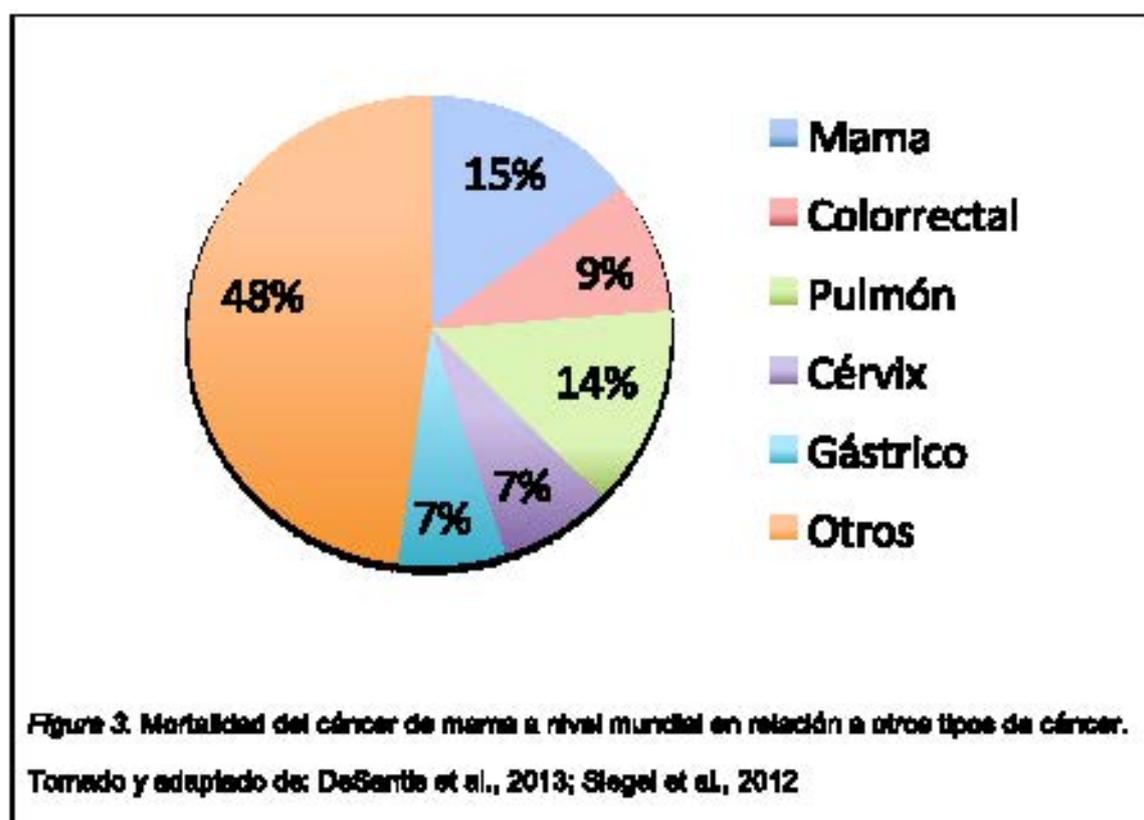
debido a la falta de detección temprana de la enfermedad y el acceso a tratamientos efectivos (Figura 2).



Se ha visto que el aumento de la incidencia en regiones en vías de desarrollo está íntimamente ligado al cambio cultural de estas regiones. La industrialización y el aumento de calidad de vida en función de la economía propia de cada país ha provocado que el perfil conductual de las mujeres, en estas regiones, se haya vuelto similar al de las mujeres de regiones desarrolladas; se ha asociado a este cambio conductual con el aumento de esta incidencia (Globocan, 2012).

En Europa occidental, la incidencia de cáncer de mama ha llegado a más de 90 nuevos casos por cada 100,000 mujeres al año, en comparación con el 30 por 100,000 en África oriental. En cambio, las tasas de mortalidad por este tipo de cáncer en estas dos regiones son casi idénticas, en torno al 15 por 100,000 mujeres al año, lo que sugiere un diagnóstico más tardío y baja supervivencia en África oriental. En la figura 3 se detalla las tasas porcentuales de muertes

provocadas por cáncer de mama y otros tipos de cáncer a nivel mundial. El cáncer de mama, con el 15%, es el de mayor mortalidad.



En el Ecuador, se presentan alrededor de 10.200 nuevos casos de cáncer por año, siendo la segunda causa de muerte en población ecuatoriana después de las enfermedades cardiovasculares (INEC, 2009).

En el año 2009, 14 de cada 100 ecuatorianos murieron de cáncer, para el año 2010 una población estimada de 1978 mujeres presentaron cáncer de mama; de estas mujeres, 470 fallecieron debido a esta enfermedad, es decir, alrededor del 23,7% (INEC, 2010).

En el Distrito Metropolitano de Quito, en el año 2013, 8 de cada 100 mujeres de entre 25 y 64 años fallecieron por este tipo de cáncer que es el de más alta incidencia en esta localidad (La Hora, 2013).

1.2.2. Etiología y Patología del cáncer de mama

Las mamas varían en tamaño y forma, su apariencia externa no puede ser usada para predecir su anatomía interna o su potencial de lactancia. La forma de la mama depende en gran medida de su soporte, el cual proviene principalmente de los ligamentos de Cooper y del tejido torácico subyacente sobre el cual descansa (Ramsay et al., 2005). Cada mama se adhiere en su base a la pared torácica por una fascia profunda que recubre los músculos pectorales. En la parte superior del pecho recibe cierto soporte de la piel que los recubre, esta combinación de soportes anatómicos es lo que determina la forma de las mamas.

La glándula mamaria consta de dos elementos fundamentales: los ácinos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche y los ductos, un conjunto de estructuras tubulares y huecas, ramificadas en disposición de copa de árbol, que confluyen progresivamente en canalículos más y más gruesos hasta terminar en uno de los doce a dieciocho vértices llamados galactóforos. Los galactóforos son dilataciones ductales a modo de reservorios situados inmediatamente por detrás del pezón, formados por un epitelio escamoso no queratinizado (Kumar et al., 2010). El resto de las mamas está compuesto por tejido conjuntivo (colágeno y elastina), tejido adiposo (grasa) y el ligamento de Cooper. La proporción de glándula y tejido adiposo parte de 1:1 en mujeres que no están lactando, hasta 2:1 en mujeres lactantes (Kirby et al., 2007).

El tipo de cáncer mas común es el desarrollado en los ductos, seguido de aquel que inicia en los lobulillos. Los tipos de cáncer mucinoso y papilar son menos frecuentes. Esta información se aborda en el apartado 1.2.5. con mayor detalle. Un esquema de la anatomía de la mama se presenta en la figura 4, donde se puede observar la distribución de los ductos internos y de los ácinos que forman los lobulillos a mas del tejido adiposo que recubre a estas dos estructuras.

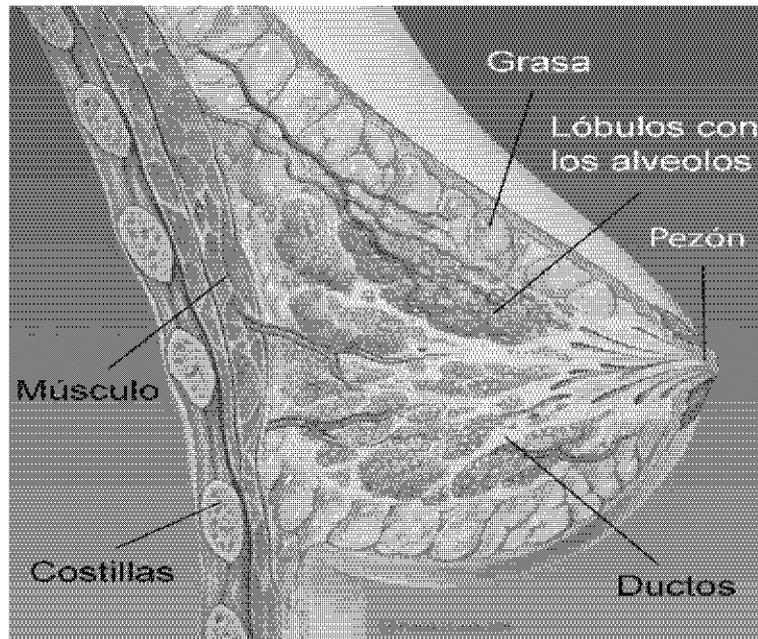


Figura 4. Anatomía de la mama femenina humana.

Tomado de: Hormonas, recuperado el 30 de julio de 2014. Publicado en línea <http://las-hormonas.blogspot.com>

a. Se detallan todas las estructuras que componen la mama femenina.

En cuanto a la etiología del cáncer de mama, los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia maligna son hormonales y genéticos. Los carcinomas de mama se pueden dividir en esporádicos (probablemente relacionados con la exposición a hormonas o factores físico-químicos causantes de daño a nivel del genoma) y hereditarios, asociados a mutaciones de la línea germinal (Kumar et al., 2010, p. 1077).

El carcinoma asociado a mutaciones en línea germinal ha sido objeto de varias investigaciones con la esperanza de identificar las mutaciones genéticas específicas, y que aquellas alteraciones que han sido identificadas en estos tipos de cáncer también puedan brindar una idea de las causas que llevan al desarrollo de los del tipo esporádico (también llamados no familiares) pues estos últimos son los más comunes y son los que mayor mortalidad causan a nivel mundial (Kumar et al., 2010; DeVita et al, 2012).

1.2.3. Cáncer de mama hereditario

La herencia de uno o varios genes de susceptibilidad es la causa principal de aproximadamente el 12% de los cánceres de mama (Bradbury y Olopade, 2007; García-Closas et al., 2008). La probabilidad de una etiología hereditaria aumenta cuando los individuos se afectan antes de la menopausia y/o tienen múltiples cánceres, o cuando existen miembros de la familia con otros cánceres específicos. En algunas familias el aumento del riesgo es resultado de una sola mutación en un gen de cáncer de mama altamente penetrante.

Las mutaciones de los genes Breast cáncer 1 (*BRCA1*) y Breast cáncer 2 (*BRCA2*) son responsables de la mayoría de cánceres hereditarios y de alrededor del 3% de todos los cánceres de mama. La penetrancia, definida como el porcentaje de portadores que desarrollan cáncer de mama, varía entre el 30 y el 90%, dependiendo de la mutación específica presente.

Las mutaciones del gen *BRCA1* también incrementan el riesgo de desarrollo de carcinoma ovárico, que ocurre hasta en el 20 y el 40% de todas las mujeres portadoras (Rosem et al., 2003; Petrucelli et al., 2013). El gen *BRCA2* conlleva un riesgo menor de desarrollo de cáncer ovárico (10 al 20%), pero se asocia con más frecuencia a cáncer de mama en varones. (Kumar et al., 2010, p. 1077). Los individuos portadores de los genes mutados *BRCA1* y *BRCA2* también experimentan un riesgo mayor que el de otros cánceres epiteliales, como el de próstata y el de páncreas.

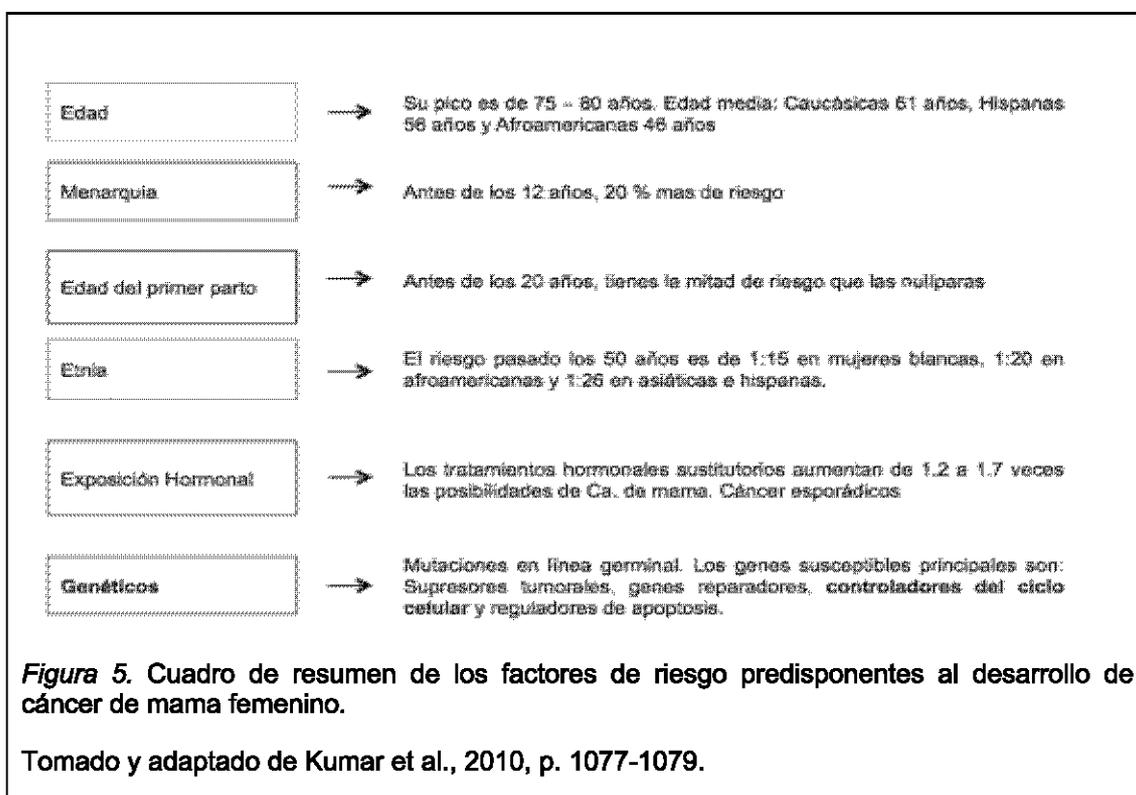
Se han descrito cientos de mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, la frecuencia de mutaciones que aumentan el riesgo de cáncer de mama es de sólo 0.1 – 0.2% dentro de la población general, y son frecuentes los polimorfismos sin consecuencias. Esto conlleva a que la prueba genética se torne difícil y en general se reserva para individuos con antecedentes familiares importantes o pertenecientes a determinados grupos étnicos (Kumar et al., 2010, p. 1078).

Los cánceres de mama asociados al gen *BRCA1* suelen ser poco diferenciados, tienen características medulares, un tipo de cáncer sin respuesta linfocítica, y no expresan receptores hormonales ni sobreexpresan el protooncogen *HER2/neu* (cáncer tipo triple negativo o *Basal-Like*), que codifica para una glicoproteína con actividad tirosina quinasa en su dominio intracitosólico y que actúa como un receptor para el factor de crecimiento de tipo epidérmico humano. También se asocian con frecuencia a pérdida del cromosoma X inactivo y reduplicación del X activo, lo que determina la ausencia del corpúsculo de Barr (Pageau et al., 2007). Los genes conocidos y asociados a un alto riesgo de cáncer de mama son responsables de tan solo alrededor del 25% de los cánceres de mama hereditarios. La búsqueda de un gen "*BRCA3*", de alto riesgo no ha tenido éxito y quizás no existan otros genes de alta penetrancia. Entonces, es probable que los restantes cánceres familiares estén causados por múltiples genes con efectos débiles (Kumar et al., 2010, p. 1078). Los genes de susceptibilidad principales para el cáncer de mama son supresores tumorales que tienen funciones normales en la reparación del ADN, el control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis en muchos tejidos. Excepto en lo que respecta al gen *p53*, las mutaciones de los genes implicados en el cáncer de mama familiar son raras en los cánceres de mama esporádicos. La expresión disminuida de *BRCA1* y *CHECK2*, un gen involucrado en el control de la progresión del ciclo mitótico y reparación del ADN, es frecuente en los cánceres esporádicos, en particular en los del tipo *Basal-Like* y poco diferenciados (Petrucci et al., 2013).

1.2.4. Cáncer de mama esporádico

Los factores de riesgo mayores para el cáncer de mama esporádico están relacionados con la exposición a hormonas; además con el sexo, edad de la menarquia y de la menopausia, número de partos, tiempo de lactancia, terapia hormonal sustitutiva y estrógenos exógenos. La mayoría de los cánceres esporádicos ocurren en mujeres posmenopáusicas y son positivas para receptor hormonal de estrógenos (Kumar et al., 2010, p. 1079). La exposición hormonal aumenta el número de células diana potenciales mediante

estimulación del crecimiento mamario durante la pubertad, los ciclos menstruales y el embarazo; del mismo modo impulsa ciclos de proliferación que determinan un riesgo de daño del ADN en las células. Una vez que existen células pre-malignas o malignas, las hormonas pueden estimular su crecimiento, así como el crecimiento de las células epiteliales y estromales normales que pueden favorecer el desarrollo tumoral (Yager y Davidson, 2006). Los estrógenos también pueden desempeñar un papel más directo en la carcinogénesis. Los metabolitos de los estrógenos pueden causar mutaciones o generar radicales libres dañinos para el ADN en células y en modelos animales. También se ha propuesto que las variantes de los genes participantes en la síntesis y el metabolismo del estrógeno pueden aumentar el riesgo de cáncer de mama. Tales variantes serían análogas a los alelos del citocromo de P-450 que alteran el metabolismo del tamoxifeno en algunas mujeres (Desta y Flockhart, 2007). El resumen de los factores predisponentes, descritos anteriormente y otros, a la ocurrencia del cáncer de mama se detallan en la Figura 5.



1.2.5. Clasificación del cáncer de mama femenino

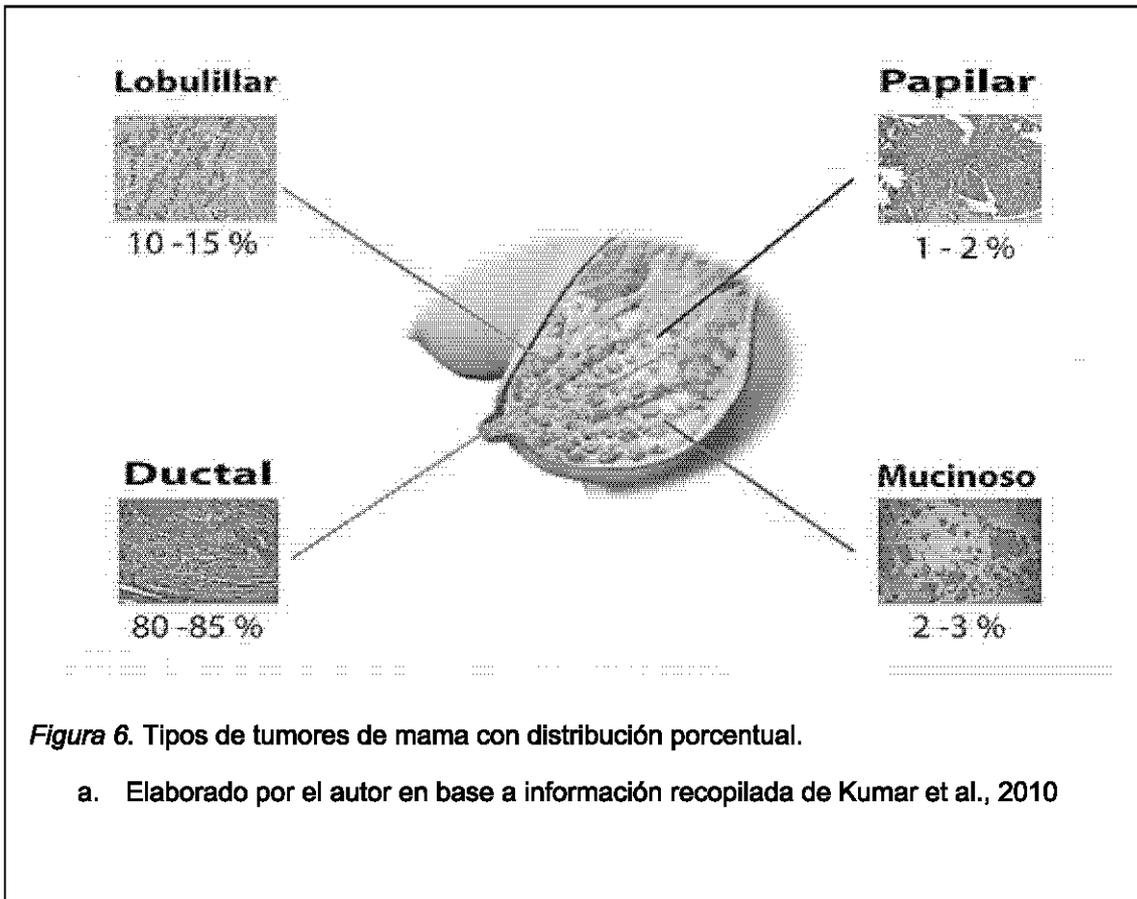
Más del 95% de las neoplasias malignas mamarias son adenocarcinomas, divididos en carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos. El término carcinoma *in situ* se refiere a una proliferación neoplásica limitada a los conductos y los lobulillos por la membrana basal.

El carcinoma invasivo es el cáncer que ha penetrado en el estroma a través de la membrana basal. En este caso las células pueden invadir la vascularización y, por tanto, alcanzar los ganglios linfáticos regionales y sitios distantes (Kumar et al., 2010, p. 1079). A pesar de las pruebas de que todos los carcinomas de mama se originan en células en la unidad lobulillar de conductos terminales (Wellings, 1980), persiste el uso de los términos lobulillar y ductal para describir los carcinomas *in situ* e invasivos.

El carcinoma *in situ* fue clasificado originalmente como ductal o lobulillar basándose en la semejanza de los espacios afectados con los conductos normales o con los lobulillos. Hoy en día se reconoce que los diversos patrones de crecimiento *in situ* no guardan relación con el sitio ni con la célula de origen, sino que reflejan diferencias en la biología de las células tumorales, como el que estas expresen o no la proteína de adhesión E-cadherina (DeVita et al., 2010; Kumar et al., 2010). Según la región donde se inicia el carcinoma se domina a cada tipo de tumor. En el figura 6, se ilustra la zona de la mama donde se desarrollan los tipos de carcinoma mas comunes y se detalla el porcentaje de ocurrencia de cada uno de estos.

1.2.5.1. Carcinoma Ductal

Puede subdividirse en carcinoma ductal *in situ* y carcinoma ductal invasor o infiltrante conforme a si se ha roto la membrana basal y se ha promovido la invasión al estroma (BreastCancerOrg, 2014).



El carcinoma ductal *in situ* consiste en una población clonal maligna de células limitada a los conductos y los lobulillos por la membrana basal. Las células mioepiteliales están conservadas, aunque quizás disminuidas en número. El carcinoma ductal *in situ* se puede extender a través de los conductos y los lobulillos y producir lesiones extensas que afectan a un sector completo de la mama. Cuando el carcinoma ductal *in situ* afecta a lobulillos, los ácinos suelen aparecer distorsionados y desplegados y adoptan el aspecto de conductos pequeños. El carcinoma ductal *in situ* (CDIS) es el tipo más común de cáncer de mama no invasivo. Ductal significa que el cáncer comienza dentro de los conductos lácteos. El CDIS se denomina "no invasivo" debido a que no se propaga fuera del conducto lácteo hacia otros tejidos mamarios circundantes normales (Kumar et al., 2010).

El CDIS no pone en peligro la vida, pero puede aumentar el riesgo de desarrollar un cáncer de mama invasivo más adelante (Kumar et al., 2010, p.

1081). La mayoría de los casos de recurrencias se dan dentro de los 10 años siguientes al diagnóstico. El riesgo de una recurrencia es menor del 30 %. Se ha establecido que las mujeres que se sometieron a lumpectomía (cirugía con preservación de mama) con diagnóstico de CDIS, sin terapia de radiación, presentan alrededor de 25 a 30% de riesgo de sufrir una recurrencia en eventos futuros. Incluir la radioterapia en el plan de tratamiento luego de una cirugía disminuye el riesgo de recurrencia a un 15% aproximadamente (BreastCancerOrg, 2014).

1.2.5.2. Carcinoma ducal infiltrante o invasor

El carcinoma ductal invasivo o también llamado infiltrante (CDI), es el tipo más común de cáncer de mama. Alrededor del 80 al 85% de todos los casos de cáncer de mama son de este tipo (BreastCancerOrg, 2014). El término invasivo significa que el cáncer ha “invadido” o se ha propagado hacia los tejidos de la mama que lo rodean. En resumen, el CDI hace referencia al cáncer que ha atravesado la pared del conducto lácteo y ha comenzado a invadir los tejidos de la mama (Kumar et al., 2010, p.1083). Una característica de este tipo de tumor es que con el paso del tiempo, el CDI puede propagarse hacia los ganglios linfáticos y posiblemente a otras áreas del cuerpo. Aunque este carcinoma puede afectar a mujeres de cualquier edad, resulta más común a medida que la mujer envejece. Un dato importante es que el carcinoma ductal invasivo también afecta a los hombres (BreastCancerOrg, 2014; Kumar et al., 2010).

1.2.5.3. Carcinoma lobulillar *in situ*

El carcinoma lobular *in situ* (CLIS) es una área o varias áreas de crecimiento celular anómalo que aumentan el riesgo de que una persona desarrolle cáncer de mama invasivo más adelante. Se ha visto que las personas diagnosticadas con CLIS suelen tener más de un lobulillo afectado (Kumar et al., 2010, p. 1085). A pesar de incluir el término “carcinoma” en su nombre, el CLIS no es un verdadero cáncer de mama pues, en realidad, el CLIS es un indicador de que

una persona presenta un mayor riesgo al promedio general de padecer cáncer de mama en eventos futuros. Por este motivo, algunos especialistas prefieren el término “neoplasia lobular” en lugar de “carcinoma lobular”. El CLIS se diagnostica en mujeres pre menopáusicas, frecuentemente entre los 40 y 50 años de edad. Menos del 10% de las mujeres diagnosticadas con CLIS ya han atravesado la menopausia. El CLIS es muy poco frecuente en hombres. Un problema importante en este tipo de cáncer es que no se conoce con certeza cuántas personas lo padecen. Ello se debe a que el CLIS no causa síntomas y habitualmente no aparece en una mamografía. Se suele diagnosticar como resultado de una biopsia realizada en la mama por exploración (Kumar et al., 2010).

1.2.5.4. Carcinoma lobulillar infiltrante

El carcinoma lobular invasivo o infiltrante (CLI), es el segundo tipo de cáncer de mama más común después del CDI. Alrededor del 10% de todos los tumores de mama diagnosticados son carcinomas lobulares invasivos. El término lobular establece que el cáncer comenzó en los lobulillos que son los productores de leche materna, los cuales vacían su contenido en los conductos que llevan la leche al pezón. El CLI hace referencia al cáncer que ha atravesado la pared que recubre al lobulillo y ha comenzado a invadir los tejidos aledaños en la mama.

Con el paso del tiempo, un carcinoma lobular invasivo puede propagarse hacia los ganglios linfáticos y posiblemente otras zonas del cuerpo, como el CDI. Los CLI son más comunes en mujeres mayores a 55 años o posmenopáusicas (BreastCancerOrg, 2014). Los CLI tienden a aparecer en edades más avanzadas que los carcinomas ductales invasivos: alrededor de los 60 años frente a los 55 a 60 años, respectivamente. Investigaciones llevadas a cabo sugieren que el uso de terapias de reemplazo hormonal durante y después de la menopausia puede aumentar el riesgo de desarrollar un CLI (Desta y Flockhort, 2007).

1.2.5.5. Carcinoma mucinoso

El carcinoma mucinoso, a veces llamado coloideo, es una forma poco frecuente de carcinoma ductal invasivo. El carcinoma mucinoso representa cerca del 2-3% de todos los casos de cáncer de mama diagnosticados. En este tipo de cáncer, el tumor se forma a partir de células anómalas que “flotan” en acumulaciones de mucina, uno de los principales componentes de la sustancia viscosa y escurridiza conocida como moco (BreastCancerOrg, 2014). Esta mucosidad recubre la mayoría de las superficies internas del cuerpo humano, entre ellas, el tubo digestivo, los pulmones, el hígado, etc. Muchos tipos de células cancerosas producen esta mucosidad.

Sin embargo, en el carcinoma mucinoso, la mucosidad se convierte en una parte principal del todo el tumor y rodea las células cancerígenas de mama. (Kumar et al., 2010, p.1087). El carcinoma mucinoso suele afectar a las mujeres mayores de 50 años o postmenopáusicas. Algunos estudios indican que la edad promedio al momento del diagnóstico es de 60 años o más. Una característica de este tipo de cáncer es el hecho de que tiene menos probabilidad de propagarse a los ganglios linfáticos que otros tipos de cáncer de mama y por tanto es más fácil de tratar (BreastCancerOrg, 2014)

1.2.5.6. Carcinoma papilar

Los carcinomas papilares invasivos de la mama son poco frecuentes y representan menos del 1-2 % de los casos de cáncer de mama invasivo. En la mayoría de los casos, estos tipos de tumor se diagnostican en mujeres mayores a 55 años o postmenopáusicas. El carcinoma papilar invasivo generalmente tiene un borde bien definido y está formado por prolongaciones pequeñas en forma de dedos. Con frecuencia, es un tumor moderadamente diferenciado. En la mayoría de los casos de carcinoma papilar invasivo, también está presente un componente de carcinoma ductal *in situ* (CDIS). (BreastCancerOrg, 2012).

1.2.6. Clasificación molecular del cáncer de mama femenino

El carcinoma de mama se clasifica de acuerdo a características de las células que forman el tumor, esto es determinado en base a cortes de los tejidos que son posteriormente observados al microscopio. Para definir de mejor forma a cada tipo de tumor se usan anticuerpos monoclonales que se ligan a proteínas expresadas tanto en la membrana citoplasmática como al núcleo celular. Los anticuerpos más usados están destinados a la identificación de receptores hormonales localizados en la membrana celular y la proteína codificada por el protooncogen *HER2/NEU*. Además se usan anticuerpos destinados a evaluar factores de crecimiento como el denominado Ki-67 que hoy en día es usado como marcador de crecimiento tumoral.

Las características clínicas, histológicas del cáncer de mama, han sido utilizadas y lo siguen siendo, como elementos importantes para la definición de los diferentes factores pronóstico y de tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, la identificación de las características inmunohistoquímicas del tumor nos permiten diferenciar alteraciones genéticas que proporcionan la posibilidad de clasificar el cáncer de mama de una manera más adecuada en lo que se refiere a pronóstico y efectividad en el tratamiento (Queckenbush et al., 2006; Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003). Analizado desde el punto de vista de la inmunohistoquímica el cáncer de mama se ha clasificado por las características del tumor en cuatro grupos fundamentales, donde la presencia o no de receptores de estrógenos son definitivos para la categorización de esta clasificación. De este modo tenemos dos grupos principales, los tumores con receptores de estrógenos positivos y los tumores con receptores de estrógeno negativos. El primer grupo se subdivide en dos grupos:

1. Luminal A: Receptores de estrógeno positivos, receptores de progesterona positivos o negativos, c-erB-2 negativo.
2. Luminal B: Receptores de estrógeno positivos, receptores de progesterona positivos, c-erB-2 positivo.

El segundo grupo por otra parte se subdivide en:

1. Her2/Neu: Receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos, c-erB-2 positivo.
2. Basal-Like: Receptores de estrógeno negativo, receptores de progesterona negativos, c-erB-2: negativo.

La determinación por microarreglos de ADN, ha permitido identificar las características genéticas del tumor, situación de alta complejidad, y de una manera mucho más amplia permite la identificación de mayores o menores alteraciones genéticas en un tumor, proporcionando entonces una diferenciación entre bajo y alto riesgo en relación al comportamiento del mismo (Queckenbush et al., 2006; Sorlie et al., 2003) lo que nos lleva a la creciente clasificación molecular que aun esta en definición por parte de los organismos mundiales para su aplicación a nivel de diagnóstico clínico.

Hoy en día, la clasificación molecular antes descrita es la menos usada en diagnóstico a nivel mundial y su uso se centra mas bien en proyectos de investigación científica. La clasificación celular e inmunohistoquímica, por otra parte, continúa siendo la mas usada a nivel de diagnóstico en hospitales y centros de salud; En Ecuador, los departamentos de patología de los distintos hospitales no son la excepción.

1.2.7. Genes involucrados en el desarrollo de cáncer de mama femenino

Se conoce hoy en día que mutaciones en línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* determinan un elevado riesgo de presentar cáncer de mama y corresponden al 5-10% del total de los casos (Walsh et al., 2006). Del mismo modo, aproximadamente del 15 al 25% de individuos con cáncer de mama presentan una sobreexpresión del gen *HER2/neu* por lo que es usual el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, tipo Her2+, con anticuerpos monoclonales humanizados contra la proteína HER2 como el Trastuzumab (antiHer2) (Romond et al., 2005). Otros genes como el *BMAL1* (proteína de

ciclo circadiano), *PER1*, *PER2* (genes de período de reloj circadiano) y *AANAT*, asociados con ciclos biológicos son estudiados actualmente pues se cree que cambios en los ciclos de descanso y actividad pueden determinar el desarrollo de neoplasias malignas de mama (Zienolddiny et al., 2013). Genes involucrados en la angiogénesis como el *VEGF* han sido importantes en el desarrollo de nuevos fármacos como el Bevacizumab (anti*VEGF*) que presenta resultados positivos en ciertos casos. (Schneider et al., 2013).

Sin embargo, existe particular interés hoy en día por investigar oncogenes acoplados con el ciclo celular. El objetivo de estas investigaciones radica en relacionar: Los cambios en la secuencia de nucleótidos (polimorfismos), los niveles de expresión del ARN y el efecto sobre la función de las proteínas con los distintos estadios y tipos de cáncer.

Es por esto que varios oncogenes reguladores del ciclo celular han sido considerados en el marco de investigaciones Biomédicas por su potencial como futuros blancos terapéuticos al tener un rol clave en la división celular, que al ser inhibido, podría disparar mecanismos de apoptosis o senescencia en células cancerígenas.

1.2.7.1. Aurora Quinasas en cáncer de mama femenino

Las Aurora Quinasas pertenecen a una familia conservada de serina/treonina proteína quinasas que son esenciales para la ejecución exitosa de la división celular, estas proteínas catalizan la fosforilación del grupo hidroxilo de la serina o treonina de otras proteínas inmersas en el control de la progresión del ciclo mitótico (Khan et al., 2011). Las Aurora Quinasas se han visto implicadas en varios eventos vitales durante la mitosis.

Tres auroras quinasa (A, B y C), que comparten homología de secuencia en sus dominios centrales catalíticos de quinasa se han identificado en mamíferos y son detalladamente reguladas por fosforilación y degradación, por lo cual, cualquier alteración de este proceso puede resultar en anomalías de la mitosis

dando como resultado inestabilidad genética (Gautschi et al., 2008). Los tres miembros de la familia de quinasas además de estar implicados como reguladores mitóticos, han generado un interés significativo en el campo de las investigaciones en cáncer debido a su elevada expresión detectada en muchos tipos de neoplasias malignas humanas (Kiat y Gopalan, 2007).

La Aurora Quinasa A (Aurora-A) se expresa en varios tejidos ubicuamente, especialmente en aquellos con un índice mitótico y meiótico alto (figura 7). El ARN mensajero (mARN), los niveles de expresión proteica y la actividad quinasa son regulados mediante el ciclo celular, se encuentran bajas en la fase G1/S, alcanzan su máximo nivel en G2/M para luego disminuir en la fase final o salida de la mitosis en el siguiente inicio de G1. La Aurora Quinasa A muestra una localización subcelular dinámica: desde centrosomas duplicados en el final de la fase S, pasando por el ensamblaje de los microtúbulos mitóticos de la profase, hasta llegar a la telofase (Jingyan et al., 2007).

La activación de la Aurora-A centrosomal en la fase G2 tardía es esencial para la maduración del centrosoma y la entrada en mitosis. Su activación adicional es requerida para la separación del centrosoma, dando lugar a la posterior formación del huso bipolar y la alineación cromosómica. Esta quinasa se ha visto sobre-expresada en algunos tipos de cáncer como el de mama, ovario, próstata y colorrectal. Aunque su potencial como oncogén es todavía controversial, muchos estudios consideran a la Aurora-A (proteína codificada por el gen *STK15*) como un factor promotor de la tumorigénesis (Gautschi et al., 2008).

La Aurora Quinasa B, codificada por el gen *STK12*, es responsable de la fosforilación de la histona H3 en la posición Ser-10 y Ser-28 durante la mitosis, formando un complejo con la proteína interna del centrómero (INCENP) y la proteína survivina. Alcanza su nivel máximo en la transición de metafase a anafase. Esta proteína se requiere también para corregir errores de síntesis cromosomal y es esencial para la citocinesis.

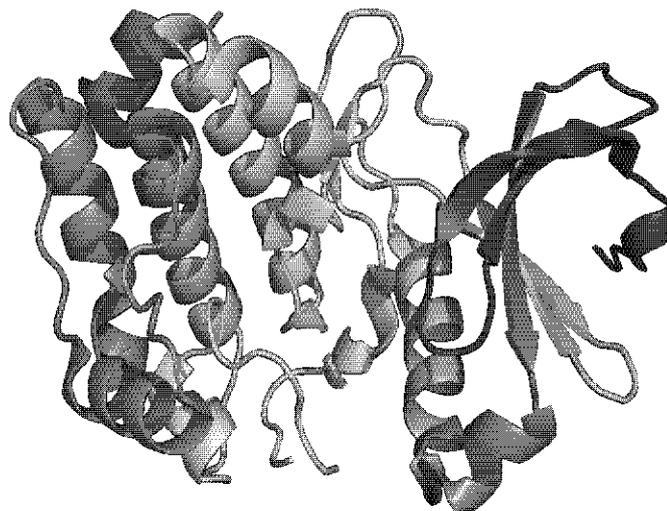


Figura 7. Estructura tridimensional de la Aurora quinasa A, codificada por el gen *STK15*

a. Imagen obtenida mediante el software PyMol bajo licencia libre. Identificación de la molécula: OMIM 603072.

Actividad similar de fosforilación de H3 también se ha observado en Aurora Quinasa C, una proteína codificada por el gen *STK13*. El bloqueo de la actividad de Aurora Quinasa B resulta en una mitosis anormal con fallas en el alineamiento de los cromosomas, segregación y citocinesis (Jingyan et al., 2007). Su actividad persiste desde la metafase hasta el final de la mitosis. Se expresa altamente en cáncer colorrectal y carcinoma de mama, la sobreexpresión resulta en multinucleación y poliploidía (Gopalan et al., 2007).

El rol de la Auroras Quinasa C está poco establecido, pero probablemente tiene función similar al de la Aurora Quinasa B en cuanto a la función del centrosoma, segregación de cromosomas y citocinesis. A diferencia de la Aurora Quinasa A y B, que se expresa de forma ubicua en muchos tejidos particularmente en las células mitóticamente divisorias, la Aurora Quinasa C se expresa predominantemente en los testículos y en la división mitótica de gametos donde se asocia con INCENP en los espermatozoides.

La Aurora Quinasa C compete directamente con la B por la unión a INCENP y survivina. La sobreexpresión de la Aurora Quinasa C en los tejidos cancerosos

y líneas celulares también plantea cuestiones sobre su papel potencial en la carcinogénesis y su efecto sobre la capacidad proliferativa de las células tumorales (Khan et al., 2011).

1.2.7.2. Gen *STK15*: Polimorfismos y Expresión

El gen *STK15*, que codifica para la proteína llamada Aurora Quinasa A (Aurora-A), ha llamado la atención debido a su relación directa con el ciclo celular como punto de control y por actuar tanto en la maduración del centrosoma como en el correcto ensamblaje de los microtúbulos del huso en la mitosis celular (Khan et al., 2011; Kiat & Gopalan, 2007).

Este gen junto con otros miembros de la misma familia de Quinasas, como el *STK12* y *STK13*, son quienes regulan y controlan la correcta segregación de los cromosomas y la división celular (Jingyan, 2007), un proceso que está dañado y descontrolado en varios tipos de cáncer que guardan relación directa con aneuploidías, como es el caso del cáncer de mama (Sun et al., 2004).

El gen *STK15* está implicado en la regulación de muchos de los primeros eventos de la mitosis como se puede observar en la figura 8. Uno de sus objetivos es *CDC25B*, un regulador directo del complejo B1-Cdk, que proporciona la base para el papel que esta enzima juega en la regulación de la entrada a la mitosis. Aurora-A regula la maduración del centrosoma moderando el reclutamiento de proteínas, como el TPX-2, Ajuba y Bora, que son a su vez esenciales para la acumulación de los componentes del huso de microtúbulos, tales como la gamma-tubulina. Aurora-A se asocia también con la separación de centrosomas, a través de la fosforilación de la proteína motora quinesina, Eg5 (Fancelli et al., 2006).

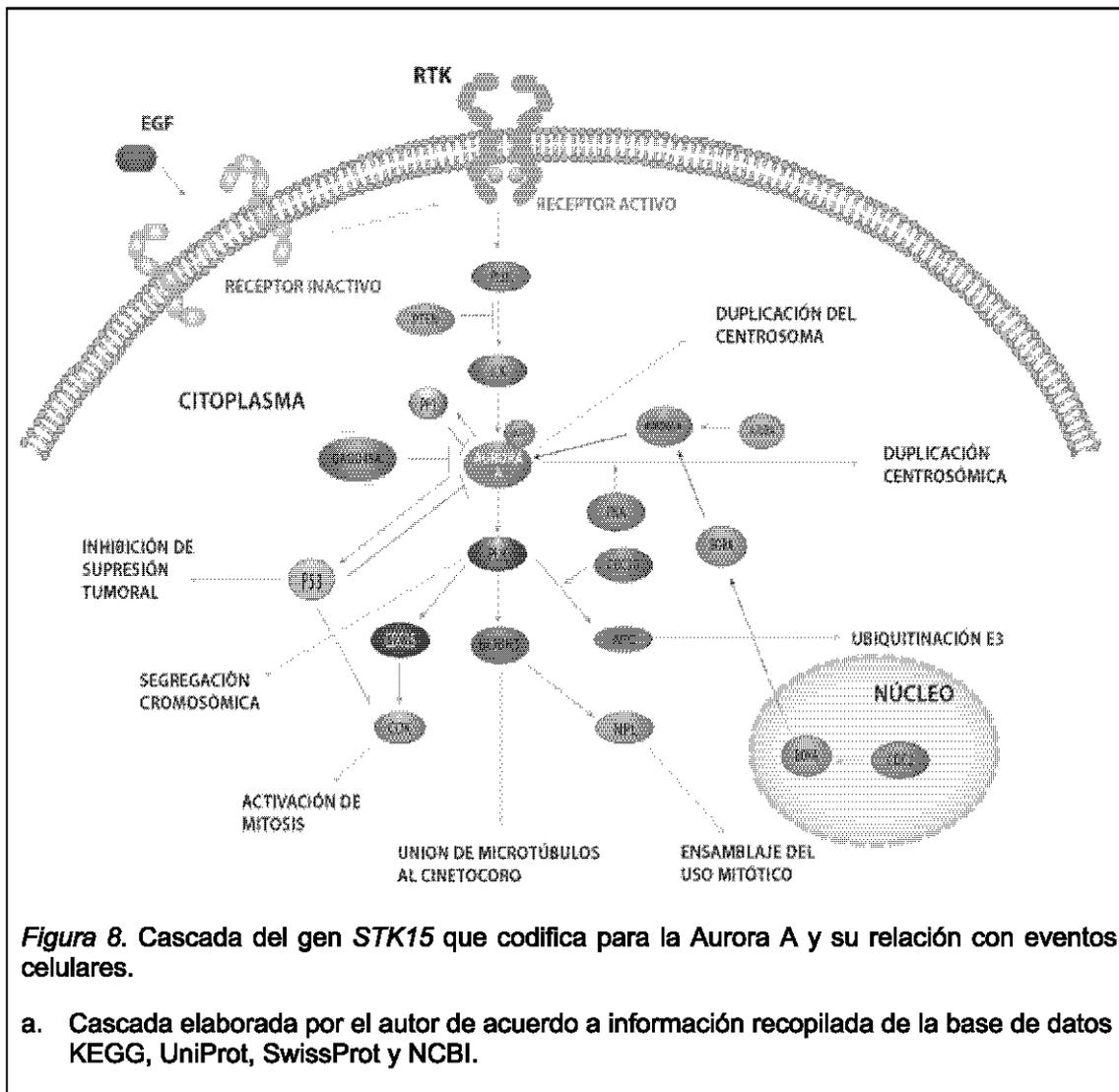
Además, esta enzima regula la red de microtúbulos que forman husos mitóticos, mediante la regulación de la EXTAK que es un complejo multiproteico. Desde su descubrimiento en la década de 1990, la Aurora Quinasa A ha sido fuertemente vinculada a la progresión de los cánceres

humanos. El gen de Aurora-A se ubica en el cromosoma humano 20q13, un locus alterado con frecuencia en los cánceres humanos. La sobreexpresión de Aurora-A se observa en muchos tipos de cáncer por lo que la prueba de inhibidores y la caracterización de Aurora-A en varias etnias es un área intensa de la investigación para el desarrollo de terapias contra el cáncer (Fancelli et al., 2006; Kinzel et al., 2010).

Aurora-A presenta una elevada expresión en varios tipos de neoplasias malignas humanas (Kiat & Gopalan, 2007). La activación de Aurora-A centrosomal en la fase G2 tardía es esencial para la entrada en mitosis, es por esto que varios estudios consideran a la Aurora Quinasa A como un factor promotor de la tumorigénesis al presentar una incidencia directa sobre la división celular descontrolada (Jingyan et al., 2007). Un polimorfismo en la región codificante del ARNm del gen *STK15* se ha identificado como alterador funcional de esta quinasa.

El polimorfismo Phe31Ile (1712T>A) cambia la secuencia de los aminoácidos de la proteína traducida; la variante 31Ile se asocia con la ocurrencia de segregaciones cromosómicas erradas, con la tumorigénesis en el cáncer y por potenciar y promover los eventos metastásicos en fases tardías de la enfermedad (Sun et al., 2004; Xu et al., 2013).

Estudios recientes han propuesto a Aurora-A como una promesa en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo al de mama, debido a su alta expresión encontrada en varios tipos de cáncer. La inhibición de esta proteína provocaría tanto la restricción de la mitosis celular y, por tanto, la reducción de crecimiento tumoral que junto a otros tratamientos como la quimioterapia o terapia hormonal y mastectomía pueden llevar a la remisión de la enfermedad.



Estudios oncológicos en fase II, han tenido resultados prometedores al probar nuevas moléculas sintéticas mediante técnicas biotecnológicas con la inclusión y aplicación de ARN de interferencia (ARNi) para bloquear a esta proteína (Xu et al., 2013; Wenging et al., 2011; Ursula et al., 2012). Las investigaciones no solo se han centrado en la pruebas de estas moléculas pues también se plantea la posibilidad de utilizar a la Aurora Quinasa A como un biomarcador de detección de pacientes en estadíos tempranos de la enfermedad y ser usada como un indicador de prognosis, así se lo plantea en una publicación reciente en donde se aborda a la Aurora-A como una estrategia en la detección y tratamiento del cáncer (Hilton et al., 2014), otra vía en la que la biotecnología cumplirá un rol importante al diseñar, crear y probar anticuerpos que puedan

ser usados como marcador de estas proteínas (Mendiola et al., 2009) para: la detección y el tratamiento direccionado hacia células cancerígenas específicas; dos acciones que permitirán mejorar el tratamiento y diagnóstico de esta enfermedad.

Los resultados obtenidos hasta el momento no reportan datos sobre la relación, incidencia y comportamiento del gen *STK15* en población sudamericana con cáncer, además se ha establecido que este gen se comporta de manera distinta según la etnia (Abba et al., 2010). Hasta el momento se ha estudiado a grupos étnicos caucásicos del centro y norte de Europa, norafricanos, población asiática y norteamericana, con reportes de resultados distintos según la zona del estudio (Pan et al., 2012; Miyoshi et al., 2001; Miao et al., 2004; Mendiola et al., 2009); esto crea la necesidad de generar información y reportes sobre el comportamiento del gen *STK15* y su proteína codificada, la Aurora-A, en población sudamericana.

CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de investigación

El presente es un estudio retrospectivo caso-control. Los casos fueron diagnosticados como positivos para malignidad y los controles fueron establecidos como mujeres saludables. Los individuos del grupo de casos y controles fueron pareados por edad en base a sus límites máximo y mínimo, y en referencia al promedio de edad en cada grupo. En el grupo de casos, las mujeres con antecedentes de familiares de tipos de cáncer asociados con el riesgo de cáncer de mama fueron eliminadas. Mujeres con síntomas de molestias, inflamaciones y dolores en las mamas fueron descartadas debido a la falta de certeza de un problema patológico en desarrollo. Tanto los criterios de inclusión y exclusión, como las variables consideradas en este estudio se detallan en la tabla 1.

2.2. Análisis de historias clínicas

Los análisis de las historias clínicas se realizaron en el departamento de Patología del Hospital Solón Espinoza Ayala (SOLCA) de la ciudad de Quito y en el Área de Patología del Hospital Eugenio Espejo. Para el presente estudio se seleccionó a pacientes que fueron diagnosticados entre los años 2010 - 2013, y que contaban con datos incluidos como variables en el presente estudio.

2.3. Obtención de muestras tumorales fijadas y embebidas en parafina

La obtención de muestras tumorales embebidas en parafina fueron de pacientes de los hospitales SOLCA y Eugenio Espejo diagnosticados con cáncer de mama femenino entre los años 2010 y 2013, sólo las pacientes de las que se obtuvieron datos confirmados fueron seleccionadas para la investigación. Para el estudio se contó con la aprobación por parte del comité de Bioética del Hospital SOLCA y de la Universidad de las Américas.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión para la selección de individuos, y variables del estudio consideradas en el presente trabajo de titulación.

Criterios de Selección	
<i>Criterios de Inclusión</i>	<i>Criterios de Exclusión</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Mujeres diagnosticadas con cáncer de mama • Rango de edad de 35 – 80 años • Etnia mestiza 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de diagnóstico positivo para cáncer de mama. • Rango de edad menor a 35 años y mayor a 80 años. • Etnia distinta a la mestiza.
<i>Variables de estudio</i>	
Tipos de carcinoma de mama	<ul style="list-style-type: none"> • Ductal • Lobulillar • Papilar • Mucinoso • Mixto
Receptores hormonales	<ul style="list-style-type: none"> • Receptores de Estrógeno y Progesterona positivos • Receptores de Estrógeno y Progesterona negativos
Factores de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> • KI-67.
Invasión a ganglios linfáticos (Metástasis Ganglionar)	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Lateralidad	<ul style="list-style-type: none"> • Mama derecha. • Mama Izquierda. • Ambas mamas.
Grado Tumoral/Histológico	<ul style="list-style-type: none"> • SBRI • SBRII • SBRIII
Estadío de la Enfermedad (Estadío Tumoral)	<ul style="list-style-type: none"> • 0 • I • II • III
Edad	<ul style="list-style-type: none"> • <40 años • 41-50 años • 51-60 años • >60 años

2.4. Marcaje de zona tumoral en placas y en parafinas

Las placas que contenían al menos el 80% de tejido tumoral, del total de tejido parafinado, fueron seleccionadas debido a la facilidad para su marcaje y para evitar que células no neoplásicas provoquen sesgos en los resultados del estudio. Una vez identificada la región del tumor en la placa, se procedió a marcar en el bloque de parafina utilizando una aguja estéril.

2.5. Procedimientos

2.5.1. Extracción de Ácidos Nucleico

2.5.1.1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica

La muestra de sangre periférica se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA-K3, (concentración 1.8 mg de EDTA anhidro por mL de sangre). En el caso de que la muestra obtenida hubiere estado en un tubo con Heparina, la muestra fue previamente lavada con PBS 1X, dos veces, para eliminar el anticoagulante y no tener contaminación en la extracción. En la extracción de ADN a partir de sangre periférica se utilizó el kit comercial PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen™), las recomendaciones del fabricante fueron modificadas para obtener un mayor rendimiento, eficiencia y optimizar la extracción.

Para mejorar la concentración de ADN, 5 mL de volumen de sangre periférica de cada muestra colocada en tubos para centrifuga tipo Falcon (Corning, New York, USA) estériles de 15 mL de capacidad, volúmenes inferiores a 5mL de sangre periférica se ajustaron con PBS 1X hasta llegar a 15 mL. Todos los tubos, debidamente rotulados, fueron centrifugados a 10.000 x g por 3 minutos. El sobrenadante generado fue desechado y el pellet se resuspendió en 1mL de PBS 1X. De esta manera se obtuvo muestras con mayor acumulación de células y, por tanto, mayor cantidad de ADN. La solución resultante de la suspensión en PBS fue transferida a microtubos estériles de 1,5 mL (Axygen, CA, USA) para generar un banco de muestras sanguíneas, cada caja y tubo se rotuló de acuerdo a un código interno del Instituto de Investigaciones

Biomédicas que identifica a cada individuo dentro del presente estudio. Una vez generado el banco de muestras sanguíneas se continuó con el proceso de extracción de ADN.

Como paso inicial se programó un bloque térmico AccuBlock™ Digital Cry Block (Labnet, NJ, USA) a una temperatura de 55°C y se ajustó la temperatura de una estufa (Mettler, Frankfurt, Alemania) a 37°C. Un volumen de 200 µL de muestra de sangre de cada individuo se colocó en un microtubo estéril de 1,5 mL, a este volumen se añadió 20 µL de Proteinasa K y 20 µL de RNasa A, incluidas en el kit, se dio vórtex por 5 segundos y se dejó la muestra en incubación por 2 minutos a temperatura ambiente. Una vez completado este tiempo se colocó en cada tubo 200 µL del buffer de lisis celular incluido en el kit, se homogenizó utilizando el vórtex. Cada tubo se colocó en el bloque térmico a 55°C por un tiempo exacto de 10 minutos para promover la digestión de proteínas. Completado los 10 minutos los tubos fueron retirados del bloque térmico, se añadió 200 µL de etanol grado analítico (conc. 99%) (Merck, Darmstadt, Alemania) y con vórtex durante cinco segundos se obtuvo una mezcla homogénea. El volumen total generado, aproximadamente 640 µL, se traspasó a una columna de extracción provista por el kit; las mismas que fueron rotuladas de acuerdo al código de cada individuo. Las columnas fueron centrifugadas a 10.000 x g, por 1 minuto a temperatura ambiente. Se desechó el tubo recolector con el líquido remanente y se colocó la columna en un nuevo tubo estéril provisto por el kit. A cada tubo se añadió 500 µL del buffer de lavado 1, preparado con base de etanol grado analítico, y se centrifugó la columna a 10.000 x g, por 1 minuto. Se descartó el tubo recolector y se pasó la columna a un nuevo tubo recolector estéril. A cada muestra se añadió 500 µL del buffer de lavado 2 y se centrifugó a 17.200 x g, por 3 minutos. Una vez concluido este paso se pasó la columna a un microtubo estéril de 1,5 mL. Para la elución final se colocó 50 µL del buffer de elución, incluida en el kit, en la zona central de la membrana interna de la columna de extracción. Cada muestra se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se llevó a la columna a la centrifugadora a 17.200 x g, por 2 minutos a temperatura

ambiente. Terminado este paso, se descartó la columna y se conservó y rotuló el microtubo de 1,5 mL que contiene el ADN de acuerdo a la codificación. Las muestras de ADN se colocaron en cajas y se almacenaron a -20°C .

2.5.1.2. Extracción de ADN a partir de muestras embebidas en parafina

Para el proceso de extracción de ADN a partir de tejido tumoral embebido en parafina se utilizó el kit comercial PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen™), las recomendaciones del fabricante se modificaron para obtener un mayor rendimiento, eficiencia y optimización del kit.

Los bloques de parafina, que contenían el tejido tumoral, fueron marcados conforme a lo descrito en el apartado 2.4. Una vez que se estableció la zona tumoral, se realizaron de 5 a 10 cortes longitudinales de $5\ \mu\text{m}$ de espesor con el uso de un micrótopo (SLEE 6062, Mainz, Alemania). Los cortes se realizaron por duplicado y se colocaron en microtubos estériles de 1.5 mL para proceder a la extracción de ADN. Una vez realizados los cortes de cada muestra tumoral, los tubos fueron almacenados en cajas, a temperatura ambiente, para formar un banco de muestras tumorales. Posteriormente se procedió a la extracción del ácido nucleico. Para esto se programó un bloque térmico (Labnet, NJ, USA) a 55°C y se ajustó la temperatura de una estufa (Mettler, Frankfurt, Alemania) a 37°C .

El tejido tumoral de cada muestra se desparafinó añadiendo 1 mL de xilol, luego los tubos se colocaron a 37°C por 10 minutos para promover la disolución de la parafina en el xilol añadido. Pasado este tiempo se centrifugó a $17.200\ \times\ g$, por 3 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante generado y se añadió 1 mL de etanol, grado analítico, y se centrifugó a $17.200\ \times\ g$, por 3 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se conservó el pellet que contenía el tejido tumoral.

En los casos en los que se constató que quedó un remanente de parafina se duplicó el paso de remoción de la parafina. Una vez extraído el sobrenadante los tubos se colocaron en la estufa a 37°C para eliminar los residuos de etanol

por 10 minutos. Cumplido el tiempo, a cada tubo se añadió 180 μL de buffer de digestión y 30 μL de Proteinasa K (Quiagen, Hilden, Alemania). Se dio vórtex por 10 segundos y se colocó los tubos en el bloque térmico a 55°C por un lapso de 12 a 24 horas, el tiempo de incubación dependió de la digestión y lisado del tejido tumoral. Una vez que se verificó al menos el 80% del lisado del tejido tumoral se centrifugó la muestra a 17.200 x g, por 3 minutos a temperatura ambiente. Alrededor de 200 μL del sobrenadante fue transferido a un microtubo estéril de 1,5 mL y se añadió 20 μL de RNasa.

La muestra se incubó por 2 minutos, luego se añadió 200 μL del buffer de lisis y de unión a la membrana y 200 μL de etanol grado molecular, provistos por el kit, se mezcló por vórtex durante 5 segundos hasta formar una solución homogénea. Los 640 μL generados a partir de estos pasos se transfirieron a una columna de extracción provista por el kit de extracción. Las columnas se centrifugaron a 10.000 x g, por 1 minuto y temperatura ambiente.

El tubo recolector se descartó y se colocó la columna en un nuevo tubo recolector estéril provisto por el kit. Posteriormente se añadió 500 μL de buffer de lavado 1 a cada columna de extracción y se centrifugo a 10.000 x g, por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo recolector y se colocó la columna en un nuevo tubo recolector. Se añadió 500 μL de buffer de lavado 2 y se centrifugo la muestra a 17.200 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el tubo recolector y se colocó la columna a un microtubo estéril de 1,5 mL para la elución final. En cada columna se colocó 50 μL de buffer de elución, se incubo la muestra por 2 minutos y a temperatura ambiente y se centrifugo a 17.200 x g, por 2 minutos. Las muestras de ADN se colocaron en cajas y se almacenaron a -20°C.

2.5.1.3. Extracción de ADN a partir de muestras quirúrgicas

Un total de 25 piezas muestras quirúrgicas fueron recolectadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas en un periodo comprendido entre el año 2011 y 2013. Cada pieza quirúrgica de tejido tumoral fue procesada y cortada en

cubos de aproximadamente 5 mm² para facilitar su almacenamiento y posterior extracción de ADN y ARN. Cada tejido tumoral fue almacenado en viales de congelación de 2,0 mL rosca interna sin faldilla (Cultek - Axygen, CA, USA). Para la extracción de ADN a partir de tejido tumoral se usó el kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.5.1.4. Extracción de ARN a partir de muestras embebidas en parafina

Los bloques de parafina, que contenían al tejido tumoral, se marcaron conforme a lo descrito en el apartado 2.4. Una vez establecida la zona tumoral, se realizaron de 5 a 10 cortes longitudinales de 5 µm de espesor con el uso de un micrótopo (SLEE 6062, Mainz, Alemania). Los cortes se realizaron por duplicado y se colocaron en microtubos estériles de 1,5 mL debidamente rotulados para proceder a la extracción de ARN. Para el proceso de extracción de ARN a partir de tejido tumoral embebido en parafina se utilizó el kit comercial PureLink[™] FFPE Total RNA Isolation Kit (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.5.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de ADN y ARN

Para el análisis cuantitativo y cualitativo de los productos de extracción de ADN y ARN se utilizaron dos métodos. Para el análisis cualitativo se preparó un gel de agarosa al 1% p/v, para lo cual se tomó agarosa liofilizada y se disolvió en TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Se utilizó un microondas para la disolución de la solución formada a partir de la agarosa y el TBE 1X. Una vez que perdió calor hasta el punto de ser tolerante al tacto, se añadió Bromuro de Etidio a razón de 1 µL por cada 20 mL de gel en estado acuoso.

Como solución precipitante para la carga de las muestras de ADN se utilizó Azul de Bromofenol (Promega, WI, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante, a razón de 1 µL de solución de carga por cada 4 µL de muestra de ADN. Para el análisis cuantitativo se utilizó el NanoDrop2000 de acuerdo a las

recomendaciones del fabricante en lo referente a la cuantificación de ácidos nucleicos.

2.5.3. Obtención de cDNA a partir de ARN total

Para este proceso, se partió de la obtención de ARN total de cada muestra incluida en el estudio. Se usó el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit versión 06 (Roche Diagnostics, IN, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante en su totalidad.

2.5.4. Determinación de Genotipos

El polimorfismo analizado se estudió mediante la técnica de PCR de punto final con cebadores diseñados para este fin y secuenciación capilar Sanger. La correcta amplificación de la región de interés se corroboró, en primera instancia, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% preparado como se detalla en el apartado 2.5.2., y una vez identificada la amplificación del fragmento de interés, se procedió a realizar la secuenciación capilar para determinar el polimorfismo en cada una de las amplificaciones de todas las muestras del estudio tanto en casos como en controles.

2.5.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN obtenido a partir de parafinas y sangre periférica se utilizó como templado para la reacción. Los cebadores usados en la amplificación del fragmento fueron llevados a un ensayo de PCR *in silico* para establecer la amplificación de la zona de interés y la generación de una sola zona de amplificación, para esto se utilizó la página del navegador del grupo de Bioinformática Genómica de la Universidad de California en Santa Cruz en base al genoma humano actualizado hasta diciembre del 2010 (<https://genome.ucsc.edu>).

2.5.4.1.1. Reacción de PCR de punto final para el polimorfismo Phe31Ile (1712 T>A) del gen *STK15*

Para el estudio del polimorfismo se diseñaron cebadores que limitaban la zona de interés. Para este fin se utilizó la herramienta de diseño de cebadores del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en base a una zona marcada en la secuencia del gen *STK15* (OMIM: 6030725). El fragmento generado a partir de la amplificación por PCR fue de 232 pares de bases.

Para la amplificación se establecieron las siguientes condiciones tomando en consideración si el ADN utilizado provenía de un bloque de parafina o de sangre periférica. Para la amplificación del fragmento en el caso de un templado de parafina se ajustó a un volumen final de reacción de 25 μ L por cada muestra, la cual estuvo compuesta por 11.7 μ L de H₂O grado PCR, 2.5 μ L de buffer (-MgCl₂)10X, 0.8 μ L de MgCl₂(50mM), 0.5 μ L de dNTPs (dideoxinucleótidos trifosfato a 200 mM cada uno), 2.5 μ L de primer FW 5'-CTGCTTGCTCTTTTGGGTGT-3' (0.2 pmol), 2.5 μ L de primer Rv 5'-CTCTTCCATTCTAGGCTACAGCTC-3' (0.2 pmol), 2.5U de Platinum[®] *Taq* DNA Polimerasa (Invitrogen) y 6 μ L de templado de ADN (200 ng).

La reacción fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial de 4 minutos a 94°C; 32 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 54°C y 45 segundos a 72°C; y una elongación final de 10 minutos a 72°C, en un termociclador SureCycler8800 (Agilent, Santa Clara, CA).

2.5.4.2. PCR en Tiempo Real

Para la cuantificación de los niveles de expresión del gen *STK15* en relación al gen *GAPDH* se usó ARN extraído a partir de tejido tumoral y tejido sano del mismo individuo. Para la estimación de los niveles de expresión se utilizó cDNA como templado obtenido mediante el proceso descrito previamente (apartado 2.5.3.) y con el uso del kit LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche). Para

la amplificación en tiempo real del gen *STK15* el volumen final se ajustó a una reacción de 20 μL por cada muestra, la cual estuvo compuesta por 6 μL de H_2O grado PCR, 7 μL de Master Mix, 1 μL de primer FW 5'-GCTGCTTGCTCTTTTGGGTG-3' (1 μM), 1 μL de primer Rv 5'-ACGTGTTCTCGTGACTIONCAGC-3' (1 μM), y 5 μL de templado de cDNA (100 ng). Para la amplificación en tiempo real del gen *GAPDH* (OMIM: 138400) el volumen final se ajustó a una reacción de 20 μL por cada muestra, la cual estuvo compuesta por 6 μL de H_2O grado PCR, 7 μL de Master Mix, 1 μL de primer FW 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' (1 μM), 1 μL de primer Rv 5'-GAAGATGGTGATGGGATT-3' (1 μM), y 5 μL de templado de cDNA (100 ng).

La reacción fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones: pre-incubación de 5 minutos a 95°C (Ramp/Rate de 4.4°C/s); 55 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, amplificación a 62°C por 20 segundos (Ramp/Rate de 2.2°C/s) y elongación a 72°C por 9 segundos; y un paso de enfriamiento a 40°C por 10 segundos. Para la curva de melting se estableció las siguientes condiciones: 95°C por 5 segundos, 65°C por 1 minuto (Ramp/Rate de 2.2°C/s) y 97°C continuo con adquisición de 5 por °C.

2.5.4.3. Secuenciación Capilar

2.5.4.3.1. Identificación del polimorfismo Phe31Ile (1712T>A) en casos y controles

Cada fragmento amplificado, de longitud esperada de 232 pb fue corrido en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, a 100V por 20 minutos y revelados en el transiluminador ImageQuant300 (General Electric, Fairfield, USA). Una vez confirmada la correcta amplificación, el fragmento fue purificado mediante el Kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez purificado el fragmento de PCR se procedió a realizar una PCR de secuencia usando los reactivos del kit comercial BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Tx, USA), las recomendaciones del fabricante fueron

modificadas para obtener un mayor rendimiento, eficiencia del kit y optimizar los resultados. Para la amplificación del fragmento se ajustó a un volumen final de reacción de 12 μL por cada muestra, la cual estuvo compuesta por 2.8 μL de H_2O grado PCR, 2 μL de buffer 5X, 1 μL de BigDye Terminator 3.1 Mix, 3.2 μL de primer FW 5'-CTGCTTGCTCTTTTGGGTGT-3' (0.2 pmol) y 3 μL de PCR purificada como templado. La reacción fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial de 3 minutos a 96°C; 25 ciclos de: 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50.5°C y 4 minutos a 60°C; y un enfriamiento a 4°C por tiempo indefinido, en un termociclador SureCycler8800 (Agilent, Santa Clara, CA).

Una vez realizada la amplificación, el fragmento fue purificado con el kit Agencourt CleanSEQ - Dye Terminator Removal (Beckman Coulter, Inc.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez purificado el fragmento y solubilizado en H_2O grado PCR fue transferido al plato de carga del equipo. La secuencia del fragmento se analizó en el equipo GeneticAnalyzer3130 (Applied Biosystems, Austin, TX) para determinar la presencia o ausencia de la variante en estudio. Los resultados no concluyentes fueron analizados por duplicado para confirmar la presencia del polimorfismo.

2.6. Análisis Estadístico

Después de determinar el genotipo de cada uno de los individuos analizados, tanto de casos como de controles, es importante calcular la frecuencia alélica de la variante estudiada. El cálculo consiste en dividir el número de alelos alterados para el número total de alelos de los grupos, siendo el número total de alelos el doble de individuos estudiados ya que cada persona posee dos copias de un mismo alelo.

De manera similar, se procede a calcular las frecuencias genotípicas de la población control y afecta, la misma que se obtiene dividiendo el número de

individuos con cada genotipo (homocigoto dominante, heterocigotos y homocigoto recesivo) para el número total de individuos. Para determinar el equilibrio en la población estudiada, la suma de las frecuencias genotípicas para un solo locus debe ser igual a 1.00. Las frecuencias esperadas se obtienen a partir de las frecuencias alélicas mediante la ecuación de Hardy-Weinberg. De esta manera, las frecuencias de los individuos homocigotos consiste en la frecuencia de cada alelo elevado al cuadrado, mientras que la frecuencia de los individuos heterocigotos es dos veces la frecuencia de cada alelo (López et al., 2010). Para determinar si existen diferencias significativas entre los individuos efectos, control y los polimorfismos, se realiza un análisis estadística mediante la prueba Chi-Cuadrado con el software SPSS bajo licencia académica.

En los últimos años, el uso de la prueba estadística denominada Odds Ratio (OR) en investigaciones biomédicas y ensayos clínicos ha ido en aumento, al punto de llegar a ser el más usado y aceptado en estudios caso-control. Esta prueba es versátil pues se puede estimar el riesgo de ocurrencia de una enfermedad en base a un perfil genético, así como asociar las variantes y fijarlas a una característica puntual de una enfermedad mediante una regresión logística. En este estudio se aplica la prueba de OR con el fin de determinar el riesgo relativo de ocurrencia de cáncer de mama y su relación con la presencia del genotipo *STK15*, en base a la variante de estudio, entre individuos afectos con respecto a los controles mediante el uso de tablas de contingencia de 2X2.

En lo referente a la expresión génica relativa, se utiliza una fórmula matemática que compara la expresión de un gen blanco en referencia a un gen constitutivo como control endógeno y calibrado con la expresión de estos dos genes en tejido sin patología (Ecuación 1). Una prueba estadística comúnmente usada es la denominada U de Mann-Whitney, que relaciona la distribución de expresión entre los casos y los controles para establecer si existe diferencia de expresión génica entre estos dos grupos. En la expresión génica también se

puede usar la prueba de Odds Ratio mediante tablas de contingencia 2X2 donde se incluyan el promedio de expresión de cada tumor.

$$2^{-\Delta\Delta C_t} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Además se puede usar un modelo de regresión logística, donde se incluyan todas las variables del estudio, para fijar la variante genética a una característica puntual de la enfermedad o a la progresión de la misma. La determinación del equilibrio Hardy-Weinberg, las pruebas estadísticas de Chi-Cuadrado, Odds ratio y U de Mann-Whitney en conjunto sustentan o no la importancia de una variable genética en el desarrollo y progresión de una enfermedad. Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon en base a la información obtenida de los genotipos.

La prueba estadística chi-cuadrado (χ^2) fue usada para examinar las diferencias en la distribución de genotipos, y para establecer la paridad de edad entre casos y controles. Las asociaciones entre el polimorfismo Phe311le del gen *STK15* y el riesgo de desarrollar cáncer de mama fue estimado con la prueba Odds Ratio (OR) con un intervalo de confianza al 95% (IC). Cada factor o característica de los tumores fue asociada con el polimorfismo de estudio mediante regresión logística.

Las pruebas estadísticas se realizaron en el software SPSS (IBM, USA) y el software libre SNPStats del Instituto Catalán de Oncología (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Para el análisis de la expresión relativa se usó el método de Livak (Livak et al, 2010) y la prueba estadística U de Mann-Whitney que establece si la diferencia de expresión entre casos y controles es significativamente estadística.

CAPÍTULO III RESULTADOS

3.1. Compilación de datos de Historias Clínicas

El presente estudio analizó un total de 124 casos y 148 controles, con un total de 272 muestras biológicas procedentes de mujeres ecuatorianas. Del total de los casos, 14 fueron del Hospital Eugenio Espejo y 110 del Hospital de SOLCA de la Ciudad de Quito. Todas las muestras de tejido tumoral fueron diagnosticadas como positivas para malignidad por parte del departamento de patología de cada hospital. Cada muestra tumoral contó con los datos establecidos previamente en la Tabla 1 siempre que fuese posible. El cuadro que detalla la población total de estudio se detalla en el Anexo 1.

3.2. Clasificación de muestras tumorales

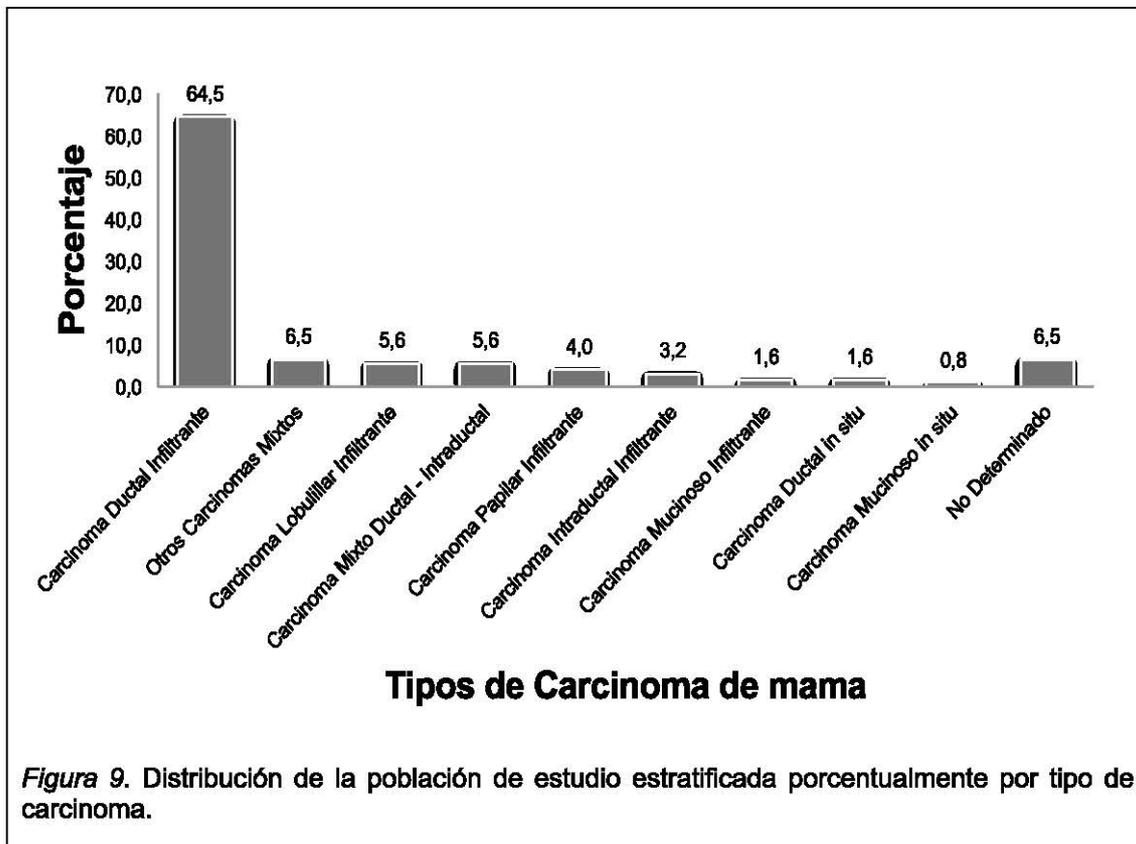
Todas las muestras tumorales fueron clasificadas de acuerdo a los parámetros del estudio para realizar la estadística descriptiva. La estratificación y descripción global, de cada una de las muestras biológicas de los casos, se muestra de manera más detallada en el anexo 2 ubicado en el apartado final.

3.2.1. Tipos de Carcinoma de mama

Dentro de la población de estudio el carcinoma más común fue el de tipo Ductal con el 66.1% en total (carcinoma *in situ* más carcinoma infiltrante), seguido del tipo Lobulillar infiltrante con el 5.6%, Papilar infiltrante con el 4.0% y Mucinoso con el 2.4% entre carcinoma *in situ* más carcinoma infiltrante. Los carcinomas mixtos, definidos como aquellos que representan a un tipo de carcinoma con componente de otro tipo, mostraron un total de 12.1%. Estos datos porcentuales se pueden observar en la figura 9 que muestra un diagrama de barras de acuerdo a cada tipo de carcinoma.

Los tumores que al momento del estudio no contaban con una determinación del tipo de carcinoma completo correspondieron al 6.5% del total de los casos de estudio. Los datos obtenidos en el presente trabajo guardan similitud, en

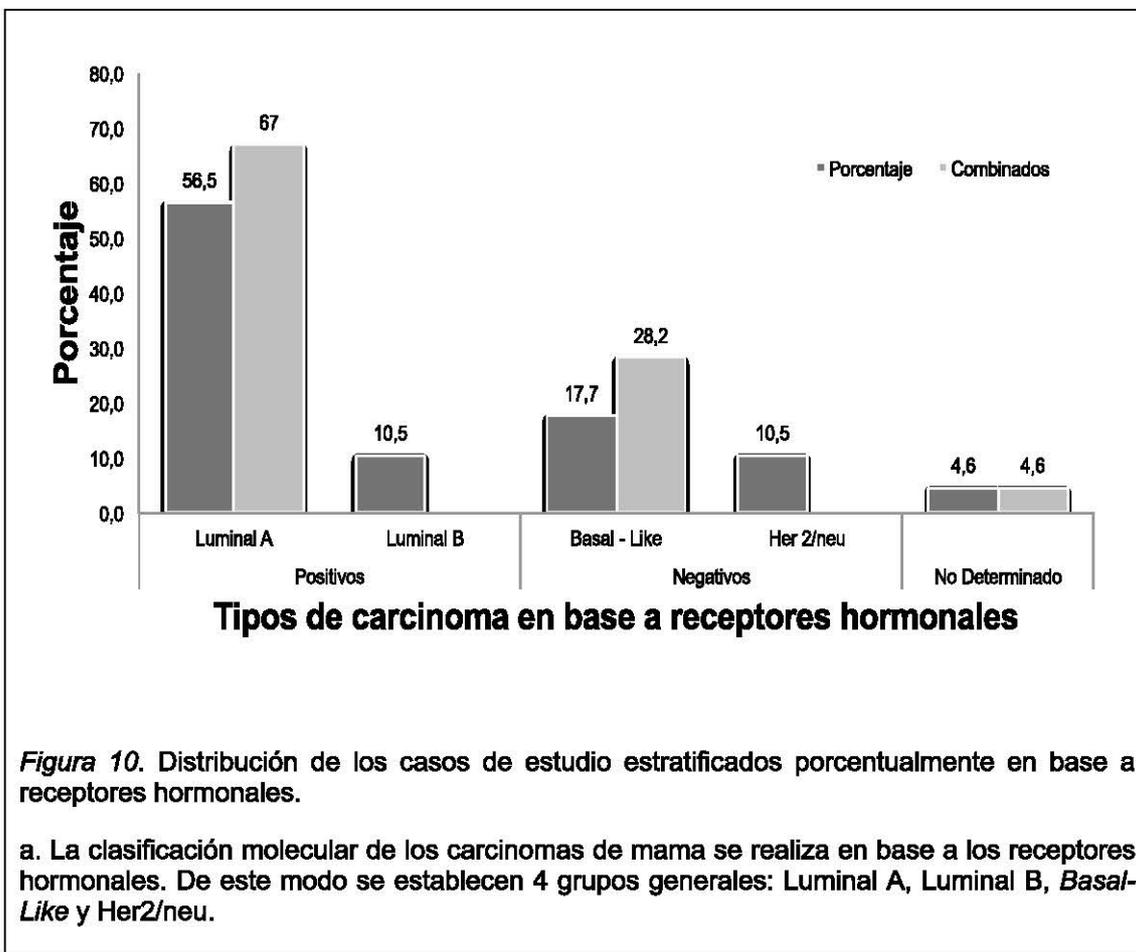
términos de distribución, a los datos estadísticos a nivel mundial reportados por el National Cancer Institute en el 2014 y por Siegel et al., en el mismo año.



3.2.2. Receptores Hormonales

La estratificación en base a los receptores hormonales se distribuyó en dos grupos: los receptores de estrógeno y progesterona positivos y receptores de estrógeno y progesterona negativos. Como se puede ver en la figura 10, en el primer grupo son considerados los tipos de tumor denominados Luminal A y Luminal B; para el segundo grupo los llamados *Basal-Like* y Her2/neu. En conjunto, los tipos de tumor positivos para receptores hormonales representaron el 67.0%, mientras que los negativos correspondieron al 28.2% del total de casos. Los tumores que no presentaron una determinación diagnóstica referente a receptores hormonales al momento del estudio fueron el 4.6% del total. El tipo de tumor más frecuente en relación a receptores hormonales fue el tipo Luminal A con el 56.5% del total, lo que está en concordancia con la estadística global en relación a este tipo de tumor por

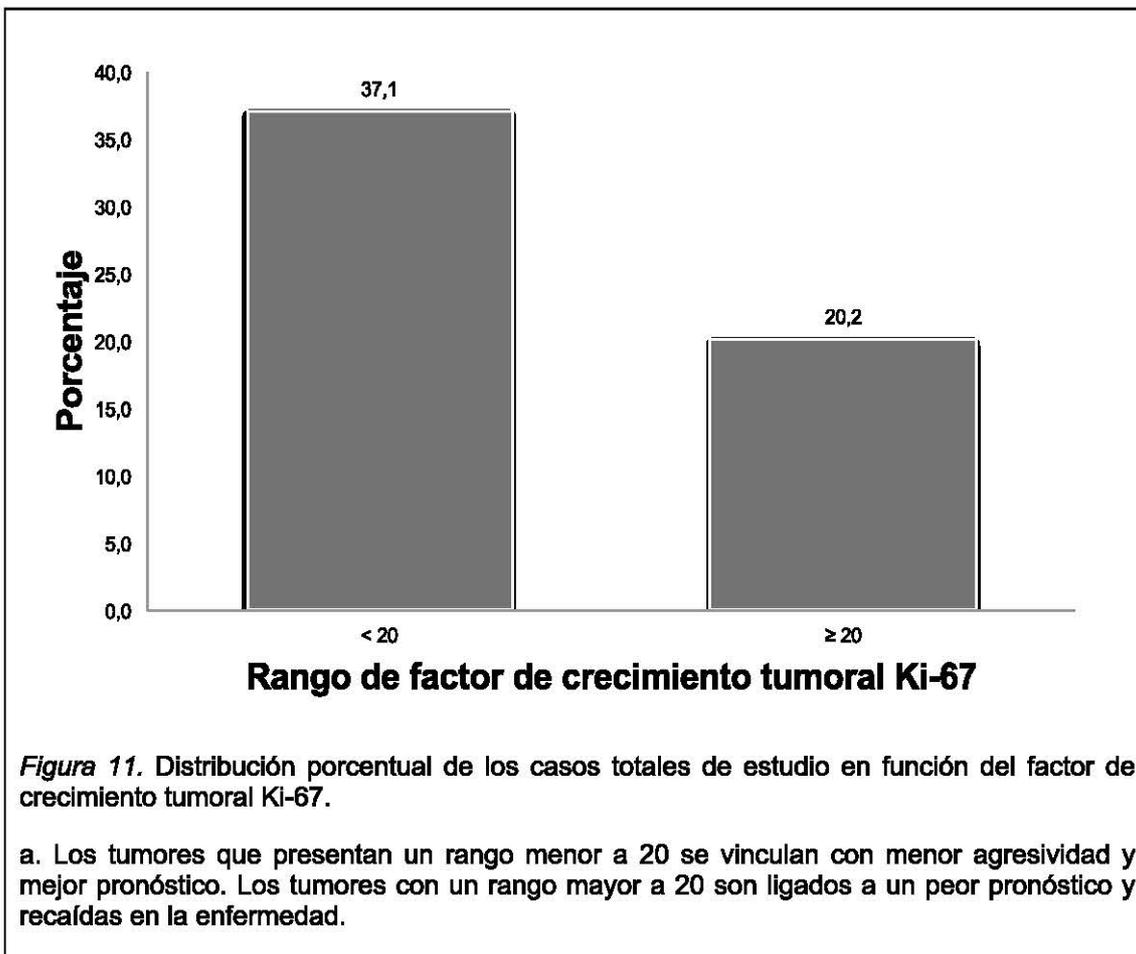
presentarse como el más común en el cáncer de mama (Siegel et al., 2014; WHO 2014).



3.2.3. Factor de Crecimiento Ki-67

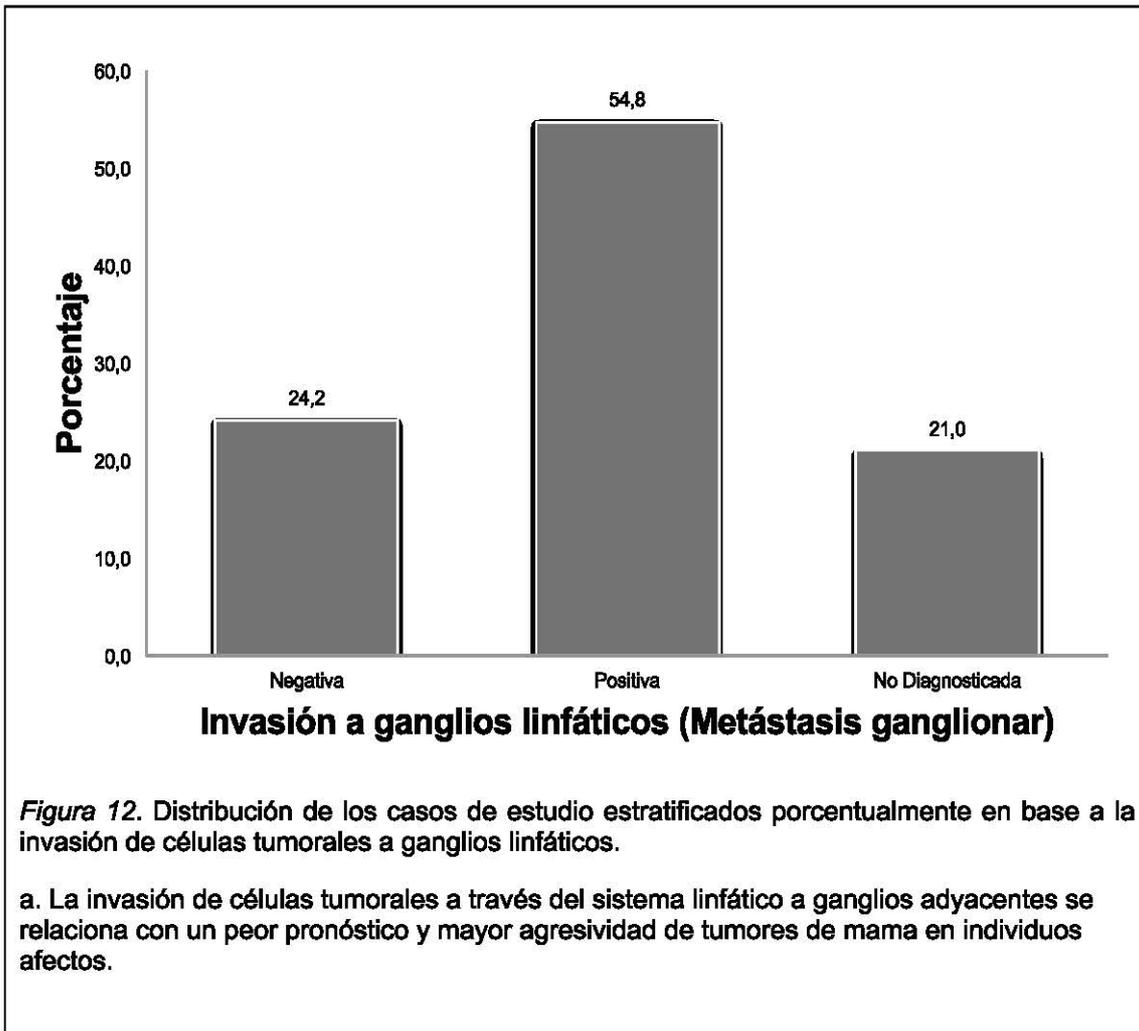
Para la estratificación de los casos de estudio, en función del factor de crecimiento Ki-67, se segregó a los tumores en base a un umbral (“*cut-off*”) del 20% aceptado y adoptado en investigaciones a nivel mundial. Los tumores que presentan un Ki-67 mayor al 20% son catalogados como de mal pronóstico y altamente agresivos e invasivos. En la figura 11 se puede observar que en los casos estudiados se encontró que los tumores con menos del 20% de Ki-67 representaron al 37.1%, mientras que los tumores con un Ki-67 mayor representaron al 20.2% del total.

Los tumores sin diagnóstico de Ki-67 representaron al 42.7%, un dato aceptado pues dentro del protocolo de análisis de tumores para el diagnóstico de los mismos no siempre se evalúa el factor Ki-67.



3.2.4. Invasión a Ganglios Linfáticos (Metástasis Ganglionar)

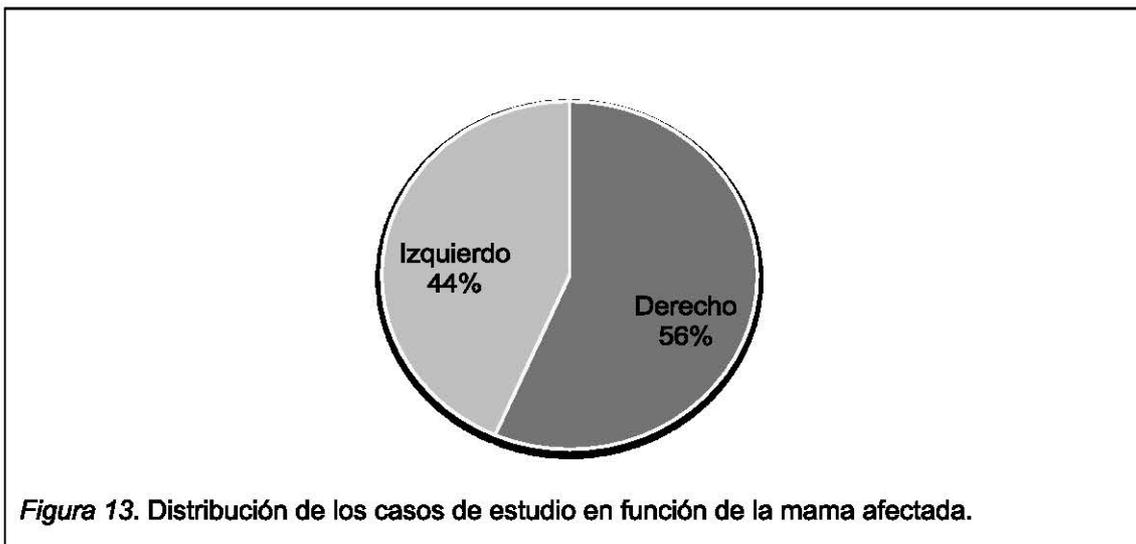
La distribución del total de los casos analizados en función de la invasión de células tumorales a ganglios linfáticos, un factor de mal pronóstico, mostró que el 54.8% de los casos presentó invasión a ganglios en al menos uno de los analizados, el 24.2% fue negativo en la invasión y el 21.0% no fue diagnosticado debido al estadio tumoral o al protocolo de diagnóstico seguido. Los datos porcentuales se muestran en la figura 12, en base a si existió invasión de células tumorales a ganglios adyacentes.



3.2.5. Lateralidad

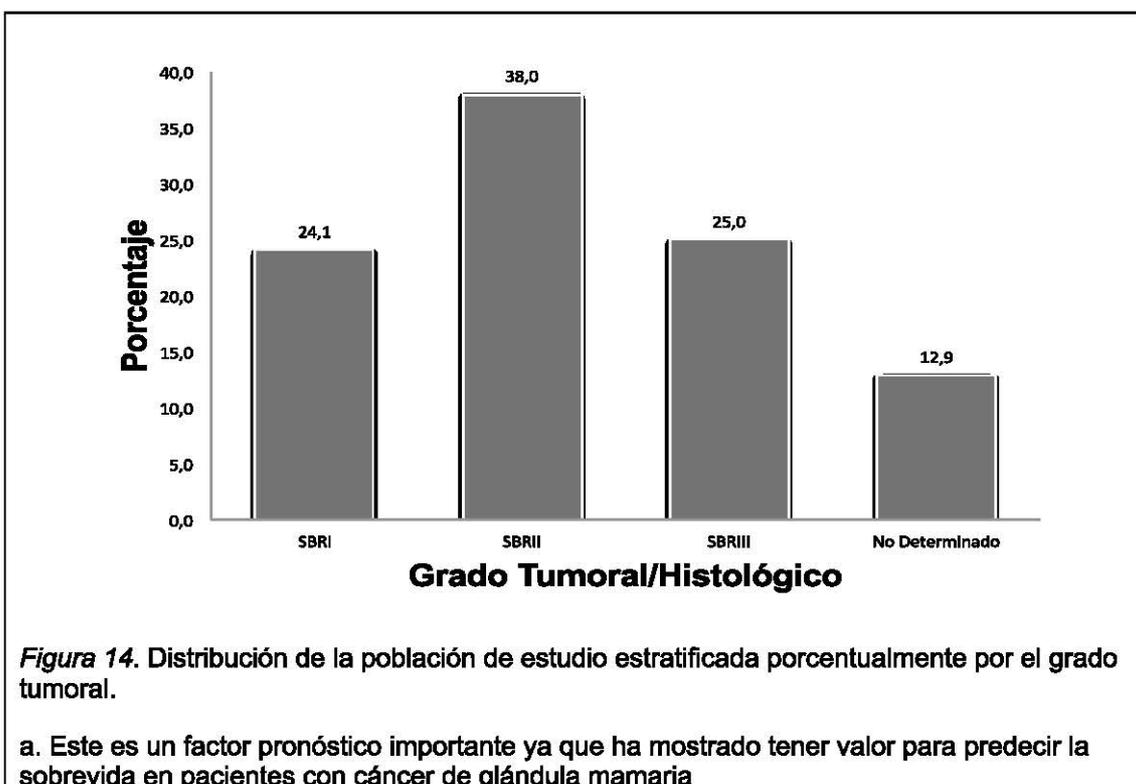
La lateralidad, definida en base a la mama que es afectada por el desarrollo de un tumor maligno, es un factor pronóstico dentro del diagnóstico para este cáncer.

En la figura 13 se puede observar que el 56.0% de los casos mostraron la afectación de la mama derecha mientras que el 44.0% restante mostraron la afectación de la mama izquierda. Cuando la mama afectada es la derecha se tiene una mayor probabilidad de metástasis pulmonar (Siegel et al., 2014).



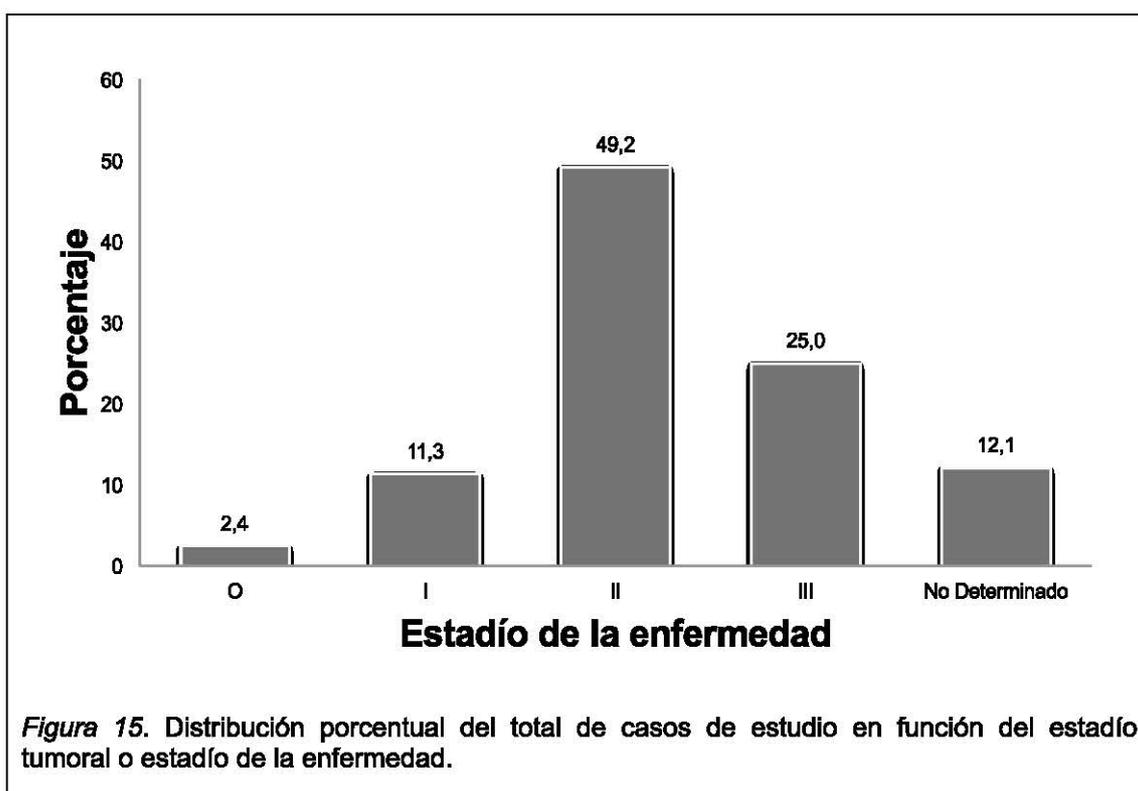
3.2.6. Grado Tumoral/Histológico

El grado tumoral de mayor predominancia en el estudio fue el tipo II, también denominado SBRII o de diferenciación moderada con el 38.0%, seguido por el SBRIII o pobremente diferenciado con el 25.0%, y finalmente los bien diferenciados con el 24.1% del total de los casos de estudio, tal y como se puede observar en la figura 14.



3.2.7. Estadío de la Enfermedad (Estadío Tumoral)

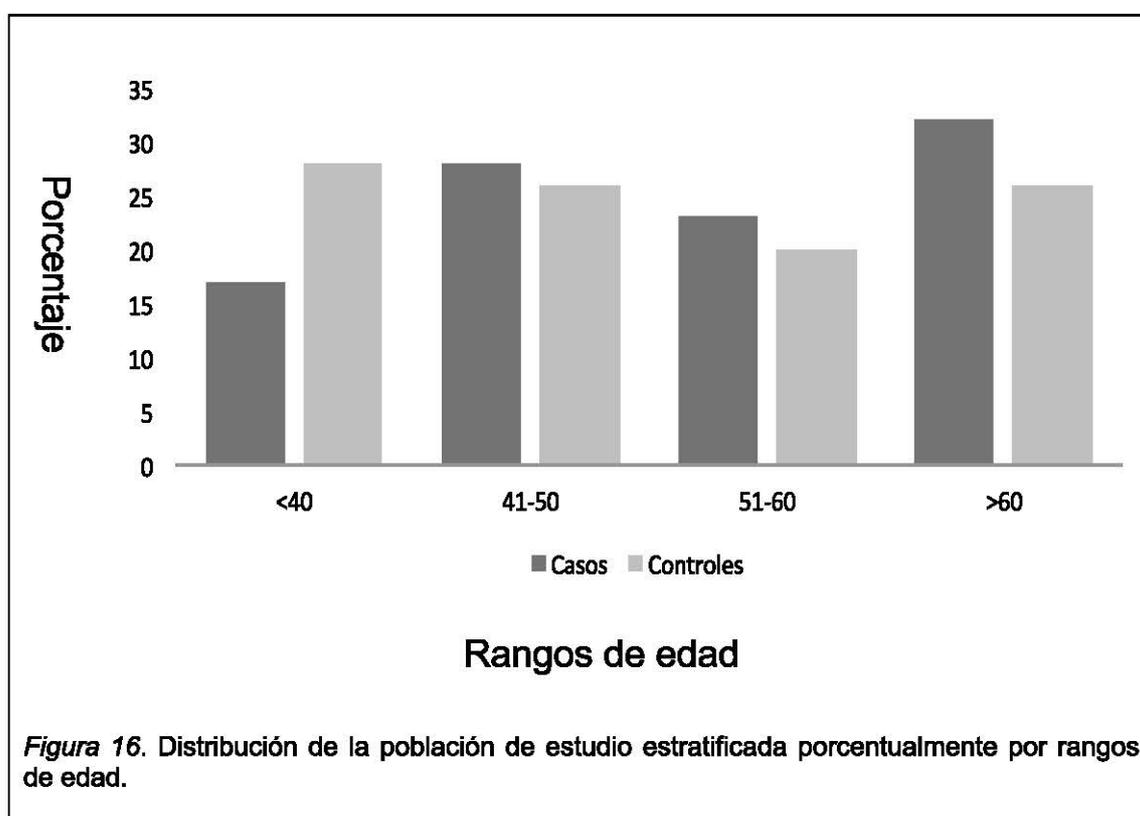
La distribución de la población total de casos del estudio fue analizada en base a su estadío tumoral o estadío de la enfermedad. Como se puede observar en la figura 15, los tumores determinados como *in situ*, es decir aquellos que no han roto la membrana basal y por tanto no han invadido tejido conjuntivo, fueron únicamente 3 y representan el 2.4% del total. El 49.2% fueron tumores en estadío II, el 25.0% diagnosticados como estadío III y el 11.3% como estadío I; el 12.1% no fueron determinados. El mayor porcentaje se centró en los tumores con estadío II, lo que sugiere que las mujeres con afecciones tumorales de mama acuden en etapas avanzadas de la enfermedad en mayor porcentaje.



3.2.8. Edad

La estratificación y análisis por edad de la población total de estudio (figura 16), mostró que la edad media de los casos fue de 54.8 y de los controles de 42.75 años. La prueba de chi-cuadrado (χ^2) en base a la estratificación por edad para

el análisis de distribución de casos y controles arrojó un valor de $P= 0.098$, lo que muestra que la diferencia de distribución de edades no es significativamente diferente y sustenta el hecho de paridad de edades (“age-matched”) requerido para todo estudio de tipo caso-control en cáncer. La estratificación por edad para el análisis de la prueba estadística χ^2 se segregó en 4 grupos. Para el análisis de riesgo asociado se separó en dos grupos: mayores a 50 años (>50) y menores a 50 años (≤ 50) por razones netamente ligadas al objetivo principal, aceptadas y acogidas en estudios de tipo caso-control, como el que se plantea en el presente trabajo.



3.3. Determinación de Genotipos

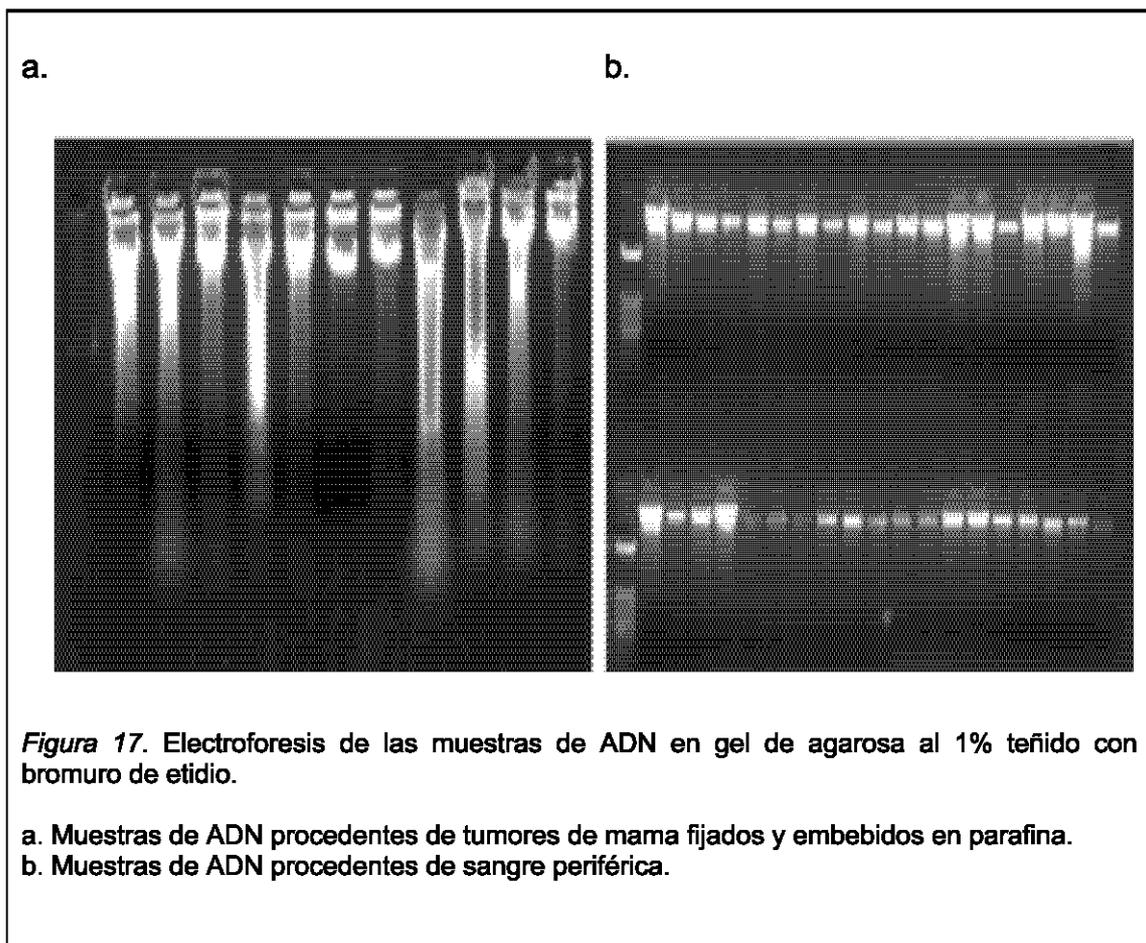
3.3.1. ADN extraído de sangre periférica y de tejido tumoral fijado y embebido en parafina

Utilizando los kits comerciales previamente descritos en el apartado de metodología se obtuvieron 122 muestras de ADN tanto de tumores de mama

fijados y embebidos en parafina, y de 148 muestras de ADN a partir de sangre periférica.

Las muestras de los tumores fijados y embebidos en parafina mostraron un barrido a los largo del carril de electroforesis, como se puede ver en la figura 17, lo que sugiere una degradación y fragmentación del material genético debido a procesos propios del pre tratamiento y fijación del tejido tumoral.

Las muestras de ADN obtenidas a partir de sangre periférica no mostraron problemas de barrido, la intensidad de la banda está en relación directa con la concentración del material genético. Las concentraciones de cada muestra de ADN, tanto de tejido tumoral como de sangre periférica, se muestran en el Anexo 3.



3.3.2. Amplificación del fragmento de Interés del gen *STK15*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las condiciones y concentraciones de reactivos descritos dieron como resultado un fragmento de aproximadamente 232 pares de bases como se puede observar en la figura 18.

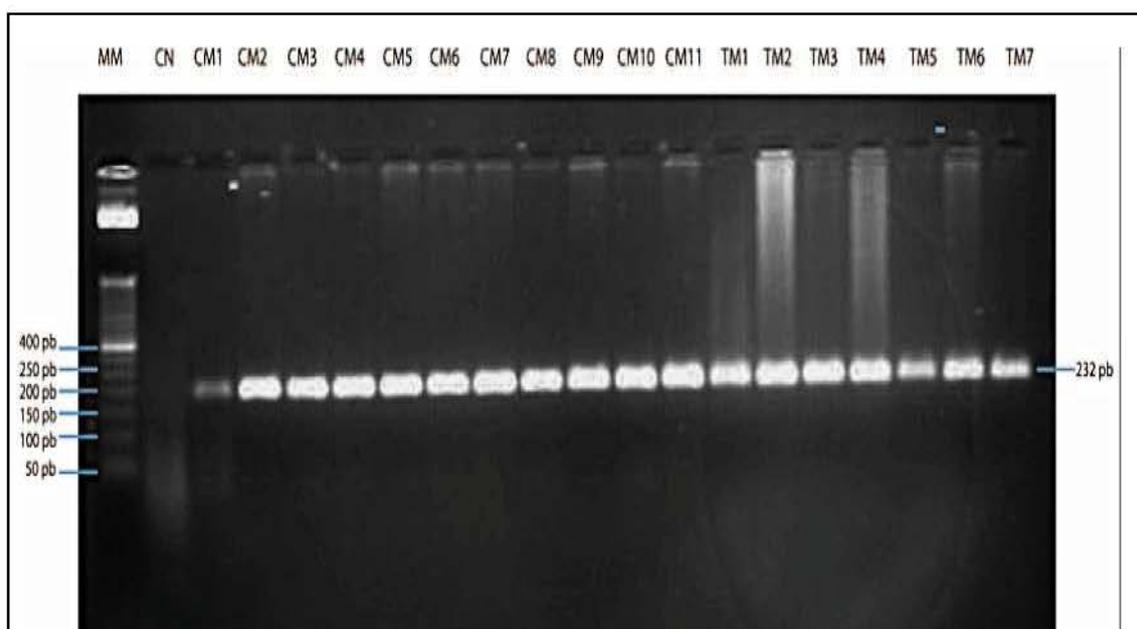


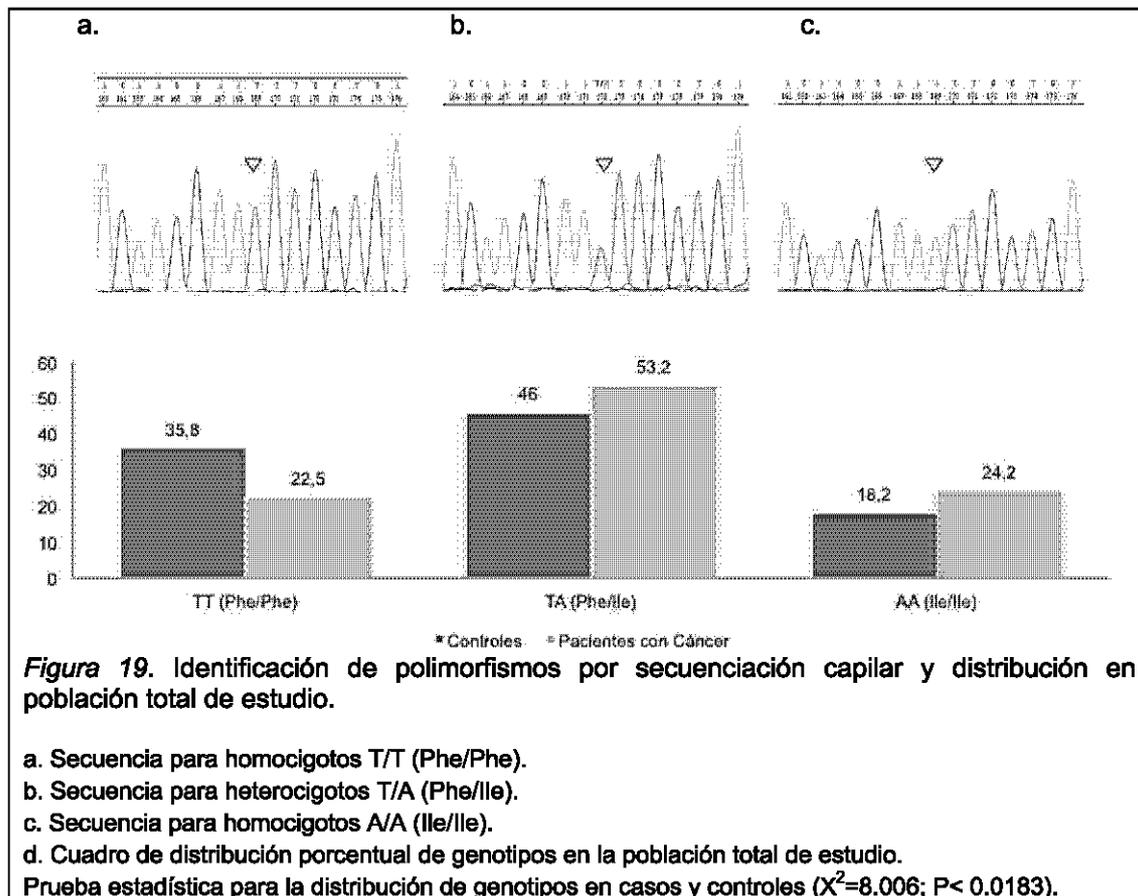
Figura 18. Electroforesis del fragmento de ADN de aproximadamente 232 pares de bases localizado en el exón 5 del gen *STK15*, en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

- a. Carril 1: Marcador Molecular de 50 pares de bases.
- b. Carriles 3 – 13: Amplificación del fragmento en muestras controles de mama.
- c. Carriles 14 – 20: Amplificación del fragmento en muestras casos de mama.
- d. Carril 2: Control negativo (Reacción ensamblada sin templado de ADN)

3.3.3. Secuenciación Capilar

Los tres tipos de resultados para homocigotos T/T (Phe/Phe), heterocigotos T/A (Phe/Ile) y homocigotos A/A (Ile/Ile) se detallan en la figura 19 junto a los resultados de los genotipos para casos y controles en porcentajes. Mediante la prueba de chi-cuadrado se estableció entre casos y de controles la diferencia

de distribución entre los dos grupos en función de cada genotipo. Un valor de $P < 0.05$ fue obtenido con esta prueba estadística, lo que indica que la distribución de los genotipos en casos y controles es diferente.



3.4. Frecuencia Genotípica y Alélica

Los genotipos observados en la población estudiada fueron debidamente ordenados para poder establecer las frecuencias genotípicas y alélicas. Mediante la prueba chi-cuadrado ajustada realizada para cada grupo se obtuvieron valores de P mayores a 0.05, que muestran que ambos grupos están en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) y que no existen diferencias significativas tal y como se detalla en la tabla 2.

El HWE para la muestra total de estudio se estableció en 0.90 lo que es estadísticamente no significativo en relación a diferencias entre poblaciones, un

requisito fundamental al momento de continuar con el análisis estadístico en modelos de estudio caso-control.

Tabla 2. Distribución genotípica, frecuencias alélicas del polimorfismo Phe31Ile (1712A>T) del gen *STK15* y análisis de equilibrio Hardy Weinberg.

Gen	Polimorfismo	Genotipo	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alelica			Valor P HWE
			Casos	Controles	Total	Casos	Controles	Total	
<i>STK15</i>	rs2273535	T/T	0,23	0,36	0,30	0,49	0,59	0,54	Total 0,90
		T/A	0,53	0,46	0,49				Casos 0,59
		A/A	0,24	0,18	0,21	0,51	0,41	0,46	Controles 0,61

HWE= Equilibrio Hardy-Weinberg

3.5. Fijación del polimorfismo Phe31Ile con las distintas características tumorales y estadio de la enfermedad

La distribución de los genotipos en función de todos los parámetros considerados en el presente trabajo se muestran en la tabla 3. Se encontró que el alelo Ile, el cual está asociado al riesgo de desarrollo de carcinoma de mama, se presenta más en el tipo de tumor ductal infiltrante e intraductal infiltrante. Además este alelo se relacionó con la afectación a la mama izquierda y con ausencia de metástasis a ganglios linfáticos.

En lo referente al grado tumoral, el alelo Ile presentó una asociación considerable con los tumores moderadamente y pobremente diferenciados. Los tumores que presentaron un factor de crecimiento tumoral Ki-67 mayor o igual al 20% también se asociaron con una mayor presencia del alelo. No se encontró relación evidente del alelo Ile con los receptores hormonales, sin embargo si se asoció con el receptor Her2/neu negativo, como se muestra en la tabla 3.

El estadio tumoral III en general y específicamente el estadio IIIB se encontró relacionado con la presencia del alelo Ile. Los tumores de mayor tamaño (T3) se asociaron de manera directa con la presencia del alelo. Finalmente, en relación a la clasificación tumoral, el alelo Ile tuvo relación con los tipos de tumor *Basal-Like* y Luminal A.

Tabla 3. Genotipos y asociación alélica del polimorfismo Phe31Ile (1712 T>A) del Gen *STK15* en la población de estudio en relación con características tumorales, factor de crecimiento y

Estratificación	TT (Phe/Phe)		TA (Phe/Ile)		AA (Ile/Ile)		Frecuencia Alélica Ile
	No.	%	No.	%	No.	%	
Controles	53	35,8	68	45,9	27	18,2	0,412
Pacientes con Cáncer	28	22,6	66	53,2	30	24,2	0,508
Tipo Patológico							
Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	1	50,0	0	0,0	1	50,0	0,500
Carcinoma Mucinoso <i>in situ</i>	0	0,0	1	100,0	0	0,0	0,500
Carcinoma Ductal Infiltrante	20	24,4	40	48,8	22	26,8	0,512
Carcinoma Lobulillar Infiltrante	2	28,6	4	57,1	1	14,3	0,429
Carcinoma Mixto Ductal - Intraductal	0	0,0	6	85,7	1	14,3	0,571
Carcinoma Papilar Infiltrante	2	40,0	3	60,0	0	0,0	0,300
Carcinoma Intraductal Infiltrante	0	0,0	2	50,0	2	50,0	0,750
Carcinoma Mucinoso Infiltrante	0	0,0	3	100,0	0	0,0	0,500
Lateralidad							
Derecho	18	25,7	36	51,4	16	22,9	0,486
Izquierdo	10	18,5	30	55,6	14	25,9	0,537
Metástasis Ganglionar al momento del diagnóstico							
Ausencia M-	5	16,1	19	61,3	7	22,6	0,532
Presencia M+	17	24,3	35	50,0	18	25,7	0,507
Grado Tumoral							
SBR I	9	29,0	19	61,3	3	9,7	0,403
SBR II	8	16,0	32	64,0	10	20,0	0,520
SBR III	8	24,2	8	24,2	17	51,5	0,636
KI-67							
< 20	15	31,3	31	64,6	2	4,2	0,365
≥ 20	5	20,0	9	36,0	11	44,0	0,620
Estado de Receptor de Estrógenos							
Positivo	18	20,5	47	53,4	23	26,1	0,528
Negativo	10	23,8	21	50,0	11	26,2	0,512
Estado de Receptor de Progesterona							
Positivo	14	18,4	39	51,3	23	30,3	0,559
Negativo	14	25,9	29	53,7	11	20,4	0,472
Estado de receptor Her2/neu							
Positivo	11	39,3	12	42,9	5	17,9	0,393
Negativo	17	16,7	56	54,9	29	28,4	0,559
Estadío Tumoral							
O	1	33,3	1	33,3	1	33,3	0,500
I	0	0,0	14	100,0	0	0,0	0,500
II	14	23,0	31	50,8	16	26,2	0,516
IIIA	9	29,0	14	45,2	8	25,8	0,484
IIIB	1	14,3	2	28,6	4	57,1	0,714
IIIC	4	50,0	0	0,0	4	50,0	0,500
Tamaño Tumoral							
T1	6	14,3	30	71,4	6	14,3	0,500
T2	17	31,5	26	48,1	11	20,4	0,444
T3	1	7,7	4	30,8	8	61,5	0,769
Clasificación Molecular							
Luminal A	12	17,1	38	54,3	20	28,6	0,557
Luminal B	5	38,5	5	38,5	3	23,1	0,423
Basal-Like	4	17,4	16	69,6	3	13,0	0,478
Her2/neu	5	38,5	6	46,2	2	15,4	0,385

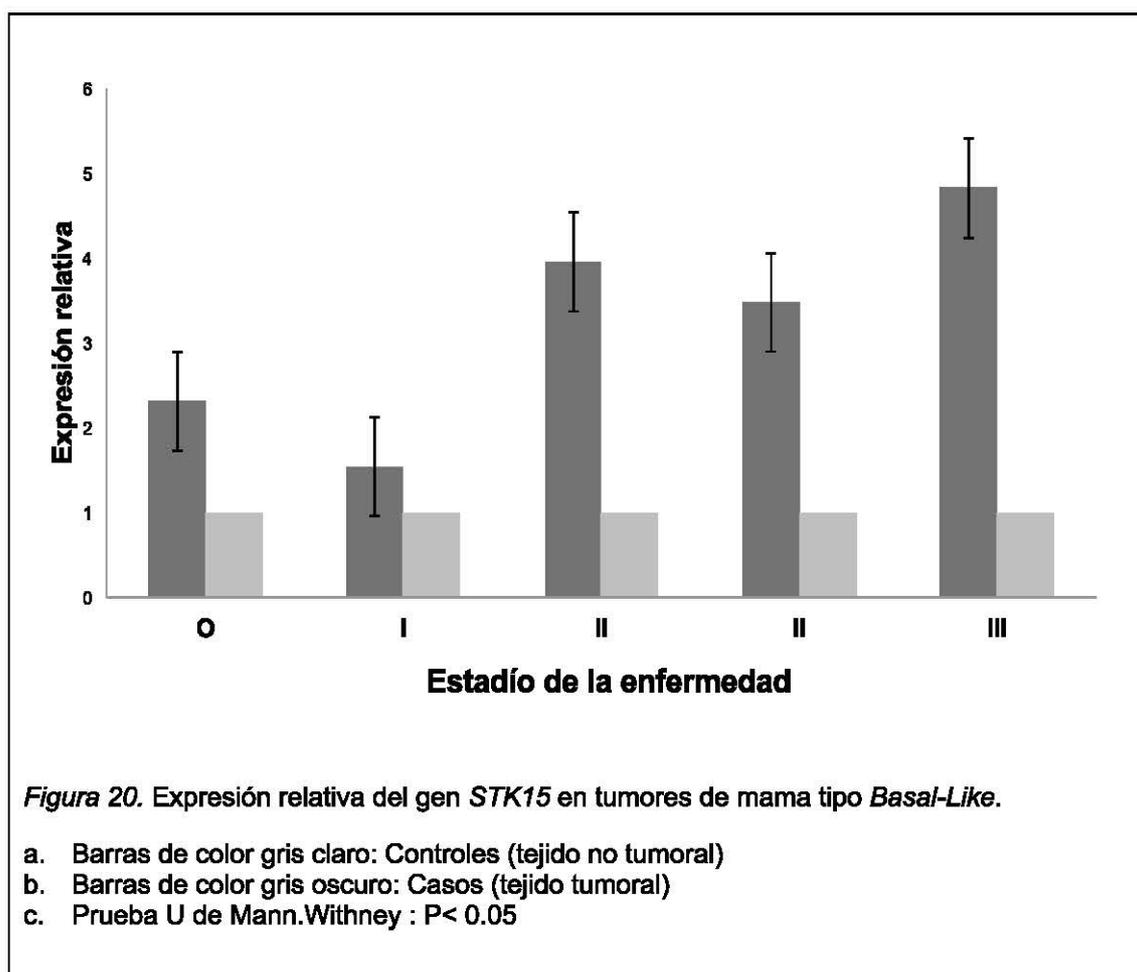
clasificación molecular.

Nota: Se calculó la presencia del alelo ile en base a los distintos parámetros de estudio. Los números en negrilla son aquellos que mostraron una presencia mayor del alelo ile que fue determinado con el alelo que incrementa el riesgo de ocurrencia del cáncer de mama femenino.

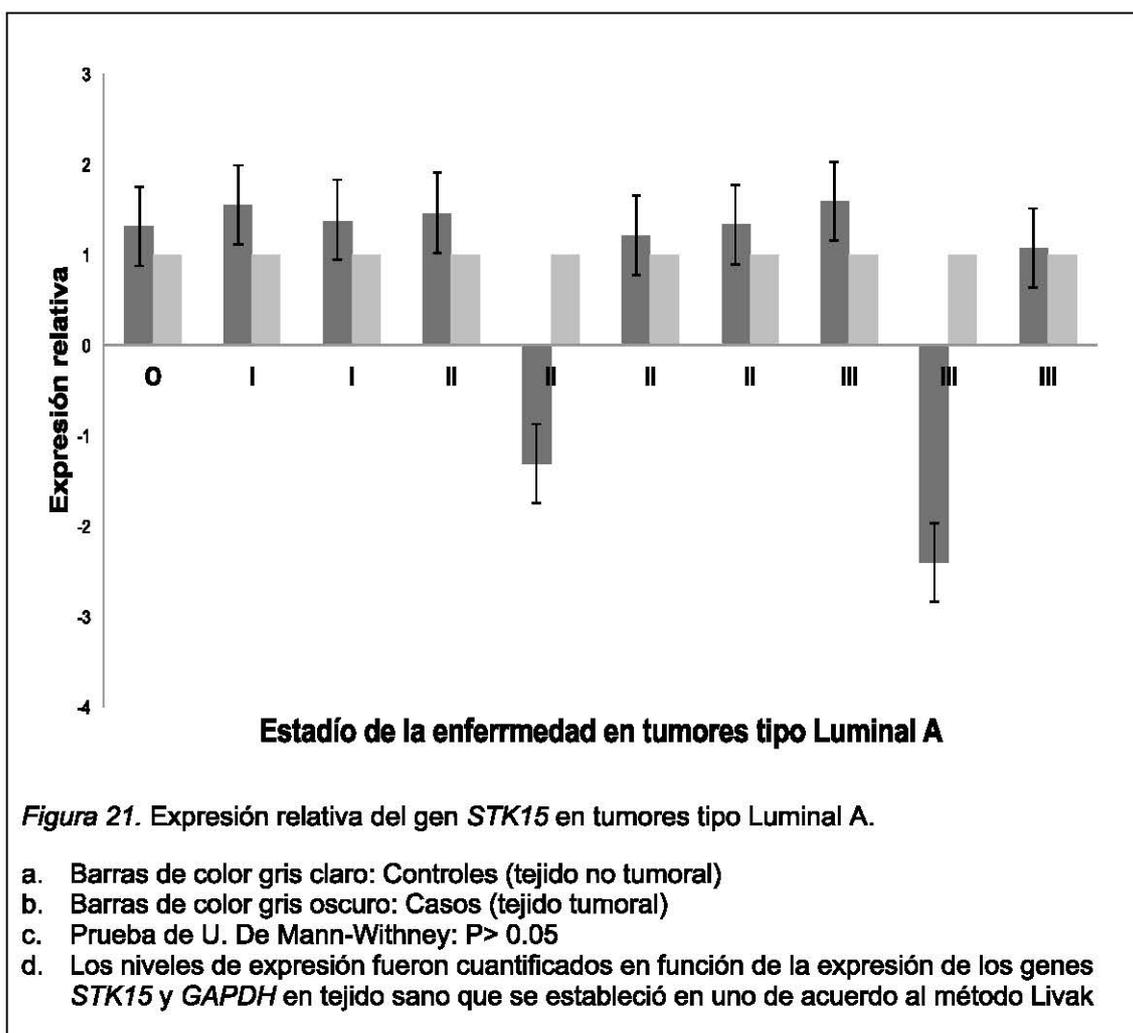
3.6. Niveles de Expresión

3.6.1. Expresión gen *STK15*

Para el análisis de expresión relativa del gen *STK15* en tumores de mama se seleccionaron muestras representativas de cada tipo de tumor, en base a su clasificación molecular general y una asociación mayor con el alelo lle. Seis tumores de mama fueron seleccionados en el grupo *Basal-Like* y 10 tumores en el grupo Luminal. Los resultados de expresión relativa en los tumores *Basal-Like* se muestran en la figura 20. Estos resultados indicaron que la sobreexpresión está relacionada con el genotipo AA (lle/lle) y por lo tanto con el alelo lle. Además, se evidenció que la expresión del gen *STK15* se incrementa conforme la enfermedad avanza.



Para los tumores en estadio III la expresión del gen *STK15* se incrementó 4.8 veces y para los tumores en estadio II el promedio de expresión fue de 3.7 veces más en relación al gen *GAPDH* y calibrado en base a la expresión de estos dos genes en tejido sano de cada paciente. La prueba estadística para determinar la diferencia de expresión del gen *STK15* entre tejido no tumoral y tumoral fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$). El genotipo *AA* (*Ile/Ile*), y en especial el alelo *Ile*, se asoció con la sobreexpresión del *STK15* en tumores tipo *Basal-Like*. Los resultados de expresión relativa del gen *STK15* en tumores tipo Luminal A se muestran en la figura 21, la expresión del gen no fue estadísticamente significativa entre tejido no tumoral y tumoral bajo la prueba de U. De Mann-Whitney.



El nivel de expresión relativa más alto reportado fue en un tumor estadio III, con 1.6 veces más expresión en relación al gen *GAPDH* y calibrado con la expresión de estos dos genes en tejido no tumoral. Los resultados además mostraron que en dos individuos afectados el gen *STK15* estaba sub expresado con -1.3 y -2.5 veces en tumores estadio II y III respectivamente. Los genotipos de cada tumor no presentaron asociación con los niveles de expresión.

3.7. Análisis Estadístico

3.7.1. Pruebas Chi-Cuadrado y Odds Ratio

Con respecto a los receptores hormonales, no existió diferencia significativa en la distribución genotípica entre los positivos versus los negativos para estrógeno ($P=0.688$), mientras que entre los positivos versus los negativos para receptor de progesterona existió una diferencia significativa ($P=0.037$). Los resultados muestran que los receptores de estrógenos negativo (RE-) y progesterona positivo (RP+) se encuentran en mayor porcentaje en pacientes con genotipo Ile/Ile.

En la tabla 4 se puede observar que la prueba de OR no arrojó resultados significativos de asociación del polimorfismo con el estado de los receptores. Cuando se combinaron los estados del RE y RP no se evidenció asociación significativa. Cuando se analizó la sobreexpresión del receptor Her2/neu se vio que el alelo Ile es más frecuente cuando el receptor no está sobre expresado, este resultado se muestra en la tabla 3. Existió una diferencia significativa de distribución del genotipo entre los positivos versus los negativos ($P<0.001$).

En lo referente al factor de crecimiento Ki-67, el alelo Ile se mostró más frecuente en tumores con un factor de crecimiento mayor a 20% (62.0%). La distribución de genotipos fue diferente entre los tumores con un Ki-67 menor a 20 versus los mayores a 20 ($P<0.001$). En la tabla 4 se muestra que se encontró que los individuos con el genotipo Ile/Ile presentaron una asociación con este factor (OR=16.5; 95%IC: 2.686-101.33; $P=0.002$) en relación a los

Phe/Phe (ver tabla 5). Este resultado sugiere que el genotipo Ile/Ile está asociado con la tumorigénesis una vez que se encontró además que el genotipo Ile/Ile se relaciona con los tumores mayores a 5cm con respecto a los menores de 5cm (OR: 9.5; 95%IC: 1.095-81. 522; P=0.041).

Tabla 4. Asociación del polimorfismo Phe31Ile del gen *STK15* con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en función de características tumorales

	Odds Ratio; intervalo de confianza al 95%				
	T/T (Phe/Phe)	T/A (Phe/Ile)	P	A/A (Ile/Ile)	P
Metástasis					
M+ versus M-	1.0	0.5 (0.172 - 1.699)	0.293	0.7 (0.201 - 2.840)	0.679
KI-67					
≥20 versus <20	1.0	0.8 (0.248 - 3.055)	0.829	16.5 (2.686 - 101.33)	0.002
Estado de receptor de Estrógenos					
RE+ versus RE-	1.0	1.2 (0.491 - 3.146)	0.645	1.2 (0.403 - 3.337)	0.780
Estado de receptor de Progesterona					
RP+ versus RP-	1.0	1.3 (0.556 - 3.252)	0.510	2.1 (0.745 - 5.868)	0.161
Estado de receptor Her2/Neu					
Her2- versus Her2+	1.0	3.0 (1.131 - 8.060)	0.027	3.8 (1.113 - 12.647)	0.032
Estadio Tumoral					
II-III versus I	1.0	0.2 (0.055 - 1.271)	0.097	2.2 (0.192 - 26.813)	0.514
Tamaño Tumor					
T3 versus T1	1.0	1.7 (0.114 - 11.855)	0.896	9.5 (1.095 - 81.522)	0.041
T2 versus T1	1.0	2.6 (0.272 - 26.092)	0.399	10.4 (1.155 - 93.297)	0.036
T3-T2 versus T1	1.0	0.3 (0.924 - 0.903)	0.032	1.7 (0.229 - 4.542)	0.824
Grado Tumoral					
SBRIII versus SBRI	1.0	0.4 (0.134 - 1.671)	0.245	6.4 (1.348 - 30.142)	0.019
SBRII versus SBRI	1.0	1.9 (0.625 - 5.742)	0.258	3.7 (0.754 - 18.642)	0.106
SBRIII - SBRII versus SBRI	1.0	1.1 (0.443 - 3.163)	0.735	5.0 (1.192 - 21.487)	0.027
Estado de Receptores hormonales					
RE+/RP+ versus RE+/RP-	1.0	1.8 (0.555 - 6.163)	0.316	2.3 (0.553 - 10.195)	0.244
RE-/RP+ versus RE+/RP+	1.0	0.3 (0.041 - 2.558)	0.285	1.2 (0.199 - 7.992)	0.804
RE+/RP+ versus RE-/RP-	1.0	1.8 (0.520 - 6.287)	0.350	1.3 (0.453 - 3.716)	0.626

SBRI= Bien diferenciado SBRII= Moderadamente diferenciado SBRIII= Poco diferenciado

M= Metástasis

T1= <2cm T2= 2-5 cm T3= >5cm

RE= Receptor de Estrógenos RP=Receptor de Progesterona Her2=Her2/neu

Cuando se analizó la frecuencia del alelo Ile en relación a la invasión a ganglios linfáticos se encontró que este se asoció en similar frecuencia entre la invasión negativa y positiva, no se obtuvo por tanto una diferencia significativa

en la distribución de los genotipos entre los casos con metástasis positiva versus negativa ($P=0.068$). Se analizó el efecto potencial del polimorfismo Phe31Ile en relación a la invasión tumoral y la metástasis, no se observaron diferencias significativas cuando se uso la prueba estadística de OR.

Se observó que el alelo Ile es más frecuente en afecciones a la mama derecha con un 53.7% que en la mama izquierda con el 48.6%, no existió una diferencia significativa ($P=0.176$) en la distribución de genotipos en relación a la lateralidad. En relación al grado tumoral, los datos mostraron que existe una diferencia significativa en la distribución de genotipos cuando se tomó como referencia a la distribución de los genotipos en los casos SBRI y se los comparó con la distribución entre los casos que fueron diagnosticados como SBRIII y SBRII ($P<0.001$). Se determinó que el alelo Ile es más frecuente en los tumores tipo SBRIII (63.6%) que en los SBRI (40.3%) y que la frecuencia aumenta conforme se avanza de SBRI a SBRIII pasando por SBRII (52.0%). La frecuencia del genotipo Ile/Ile fue 50.0% en los tumores con grado SBRIII y ausente para los tumores SBRI, lo que plantea la hipótesis de que el genotipo Ile/Ile está en estrecha relación con la pobre diferenciación de las células tumorales, factor que se relaciona con un mal pronóstico.

Se observó una diferencia significativa ($P=0.0001$) de la distribución genotípica entre los tumores SBRIII y SBRI, el análisis por regresión logística mostró que los tumores con genotipo Ile/Ile presentaron 10 veces más riesgo de desarrollar cáncer de mama en relación a los tumores Phe/Phe ($OR=6.4$; 95%IC: 1.348-30.142; $P=0.019$), tal y como se detalla en la tabla 5, lo que sugiere que el alelo Ile está involucrado con el desarrollo tumoral con tendencia a la pobre diferenciación celular.

El alelo Ile se asoció con los estadios avanzados de la enfermedad, los tumores en estadio IIIC mostraron una frecuencia del alelo Ile del 71,4%, en relación al 50% de los tumores *in situ* o estadio O ($P<0.001$). El alelo Ile es más frecuente en tumores con mayor tamaño con un 76.9% en tumores T3 o

mayores a 5cm y 44.4% en tumores T2. Existe una diferencia significativa en la distribución del genotipo entre estos factores ($P < 0.001$). El alelo Ile es más frecuente en el tipo de tumor Luminal A (55.7%) y tipo *Basal-Like* (47.8%), lo que sugiere que estos tipos de tumor están relacionados con el polimorfismo de estudio y con la sobreexpresión del gen *STK15*.

La distribución de edad y las características clínicas e histoquímicas de los individuos analizados se resumen en el anexo 2. No se observó diferencias significativas entre pacientes con cáncer de mama y controles en términos de distribución de edad ($P = 0.098$), esto establece que el emparejamiento de frecuencias fue adecuado. En la tabla 2 se muestran las frecuencias genotípicas observadas en casos y controles, estas no se desviaron significativamente de las esperadas de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg ($P > 0.05$), lo que confiere robustez a la investigación. Se observó una diferencia significativa ($P = 0.006$) de la distribución genotípica entre casos (0.23 Phe/Phe, 0.53 Phe/Ile y 0.24 Ile/Ile) y controles (0.36 Phe/Phe, 0.46 Phe/Ile y 0.18 Ile/Ile). En el grupo de individuos afectados, la frecuencia de los alelos Ile y Phe fue 0.51 y 0.49 respectivamente, los cuales difieren significativamente del 0.46 para el alelo Ile y 0.54 para el alelo Phe en el grupo control ($P = 0.0003$). En lo referente al tipo patológico de tumor de mama, se vio que el alelo Ile es más frecuente en los tipos Intraductal infiltrante y ductal infiltrante que suelen ser comunes en el diagnóstico de individuos con cáncer de mama. En los tumores del tipo lobulillar la frecuencia del alelo Ile fue de 42.9% y que toma importancia debido a su infrecuente diagnóstico en comparación con el ductal infiltrante.

La prueba estadística Odds Ratio (ver tabla 5), mostró que los individuos homocigotos Ile/Ile tienen 2.46 veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama comparado con los individuos homocigotos Phe/Phe (95%IC: 1.18–5.14, $P = 0.034$) en un modelo codominante. Los individuos heterocigotos Phe/Ile mostraron 1.96 veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con los individuos homocigotos Phe/Phe (95%IC: 1.06–3.54, $P = 0.036$) bajo el mismo modelo.

Cuando se planteó un modelo de herencia dominante y uno recesivo se encontró que el alelo Phe actuaría como un alelo protector en el desarrollo de la enfermedad. Adicionalmente, el riesgo de desarrollo de cáncer de mama asociado con los genotipos de *STK15* fue examinado en base a una estratificación por edad. El riesgo de presentar la enfermedad fue más alto en el grupo de <50 años (OR=3.39; 95%IC: 1.28-8.96; P=0.001) que en el grupo de ≥50 años al momento del diagnóstico.

Tabla 5. Asociación del polimorfismo Phe31Ile del gen *STK15* con el riesgo de desarrollo de cáncer de mama femenino.

SNP	Modelo	Genotipos	Casos (%)	Controles (%)	OR	95% IC	P	AIC
<i>STK15</i>								
Phe31Ile		T/T	28 (22.6)	53 (35.8)	1.0 (Ref)			
1712 T>A	Codominante	T/A	66 (53.2)	68 (46.0)	1,93	1.06 - 3.54	0,036	347,6
rs2273535		A/A	30 (24.2)	27 (18.2)	2,46	1.18 - 5.14	0,034	
	Dominante	T/T	28 (22.6)	53 (35.8)	1.0 (Ref)			346,2
		A/A + T/A	96 (77.4)	95 (64.2)	2,08	1.17 - 3.68	0,011	
	Recesivo	T/T - T/A	121 (81.8)	94 (75.8)	1,0			350,3
		A/A	27 (18.2)	30 (24.2)	1,61	0.87 - 3.00	0,130	
	Aditivo				1,59	1.10 - 2.29	0,012	346,3

En resumen, el alelo Ile se muestra fijado en factores de crecimiento tumoral positivo, no está asociado a receptores hormonales para estrógeno y se muestra mayor conforme pasa del grado tumoral SBRI al SBRIII y conforme el tamaño de tumor aumenta. Además está asociado a tumores tipo *Basal-Like* que se caracterizan por su agresividad y mal pronóstico. Estos resultados sugieren que el alelo Ile es un factor de mal pronóstico en mujeres con cáncer de mama. Una vez que se estableció la asociación del polimorfismo con las distintas características patológicas e inmunohistoquímicas de cada tumor. Se analizó la expresión del gen *STK15* en aquellos tumores que mostraron una frecuencia del alelo Ile mayor. Cinco muestras de tumores tipo *Basal-Like* y 10 tipo Luminal A fueron llevados a un análisis por PCR en tiempo real.

El análisis por expresión relativa con un control endógeno *GAPDH* y calibrado con la expresión de estos dos genes en tejido sano mostró que el gen *STK15* está 3.2 veces más expresado en tumores de mama que en tejido sano en tumores tipo *Basal-Like*. La prueba estadística U de Mann-Whitney mostró que existe una diferencia significativa entre la expresión del gen *STK15* en tumores de mama versus tejido no tumoral ($P < 0.05$), además se observó que la sobreexpresión de este gen se incrementa conforme la enfermedad avanza y que es mayor en tumores T3 y cuando presentan el genotipo A/A (Ile/Ile). Estos datos sugieren que la sobreexpresión del gen *STK15* está en relación con la progresión de la enfermedad en tumores tipo *Basal-Like* y que el genotipo Ile/Ile está en relación con la sobreexpresión del *STK15*.

En los tumores del tipo Luminal A no se encontró diferencias significativas entre la expresión del gen *STK15* en tejido tumoral versus tejido no tumoral ($P > 0.05$) mediante la prueba U de Mann-Whitney. Además no se vio un patrón de expresión conforme se avanza en los estadios de la enfermedad como se observó en tumores tipo *Basal-Like* ni tampoco una asociación con algún genotipo. Estos datos sugieren que existe otro tipo de mecanismo que promueve el desarrollo y progresión tumoral en tumores tipo Luminal A que no están en relación directa con la expresión del gen *STK15*.

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

Este estudio epidemiológico molecular examinó si la función del polimorfismo Phe31Ile del gen *STK15* podría tener un impacto en la progresión y riesgo de desarrollar cáncer de mama. Para cumplir con este objetivo, se planteó un estudio retrospectivo caso-control en población ecuatoriana y, en base a información obtenida de bases de datos de rutas celulares se propuso una posible vía de activación de la proteína codificada por el gen *STK15* para su abordaje y asociación de resultados.

Sobre el análisis de la población estudiada, se encontró que las mujeres con genotipo Ile/Ile presentaron un mayor riesgo a desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres con genotipo Phe/Phe y genotipo heterocigoto Phe/Ile, lo que sugiere que el alelo Phe actúa como protector o reductor del riesgo de desarrollar esta enfermedad. Se encontró que el riesgo de desarrollar cáncer de mama asociado con el genotipo Ile/Ile fue más pronunciado en mujeres menores de 50 años. Esta observación concuerda con el concepto de que la susceptibilidad genética a menudo se asocia con edades tempranas de inicio de la enfermedad (Miyoshi et al., 2001; Goepfert et al., 2002; Royce et al., 2004).

En base al grado histopatológico del tumor, se observó que el genotipo Ile/Ile es más frecuente en tipos de tumor SBR III que en SBR II, y está ausente completamente en SBR I, sugiriendo que existe un crecimiento selectivo de células con genotipo Ile/Ile en la tumorigénesis lo que determina un mal pronóstico para portadores de este genotipo, que se entiende como el crecimiento acelerado del tumor, una mala respuesta a tratamiento y, sobre todo, recidivas tumorales.

Esta deducción se sustenta en que el alelo Ile se presenta con más frecuencia que el alelo Phe en pacientes con cáncer de colon y de mama, pacientes heterocigotos para el genotipo Phe/Ile presentaban más células aneuploides que los pacientes homocigotos para el genotipo Phe/Phe (Sun et al., 2004;

Goepfert et al., 2002; Ewart-Toland et al., 2005), lo que establece que el alelo Ile se relaciona directamente con eventos que llevan al desarrollo tumoral; esto queda sustentado además, por un estudio donde se estableció que, en comparación con el *STK15* (Phe/Phe), el *STK15* (Ile/Ile) muestra una unión deficiente a la enzima ubiquitina de conjugación E2 (UBE2N), sugiriendo que la sustitución Phe31>Ile inhibe la degradación a nivel proteico de la Aurora-A (Ile31), en la mitosis tardía, y por tanto facilitar su efecto oncogénico (Ewart-Toland et al., 2005). Además, nuestros resultados muestran que el polimorfismo de estudio se asoció significativamente con tumores de un tamaño mayor a cinco centímetros (T3) versus los que mostraron un tamaño menor a dos centímetros (T1), lo que respalda aún más el hecho de que tumores que presentan el alelo Ile en la Aurora-A son tumores de crecimiento acelerado y por tanto fortalece su efecto oncogénico.

También se observó que las mujeres con falta de expresión de receptores de estrógeno (RE-) de forma global presentaron una mayor frecuencia del alelo Ile, sin embargo la diferencia de distribución de frecuencias de los alelos Ile y Phe no son significativos, por lo que estudios posteriores son necesarios para elucidar su asociación o falta de esta con la expresión de los receptores de estrógeno. Sobre este punto es importante tomar en cuenta que el estado de los receptores hormonales son los factores pronósticos más importantes para el cáncer de mama (Loman et al., 2001). Las hormonas esteroideas, especialmente el estrógeno, juegan un rol importante en el desarrollo del cáncer de mama (Colditz et al., 2004). Factores como la menarquia temprana, menopausia tardía y la terapia hormonal de reemplazo se han asociado con un mayor riesgo de esta enfermedad (Bundred, 2001; Colditz et al., 2004). Pacientes que presentan receptores hormonales positivos para estrógeno (RE+) sometidos a mastectomía muestran una menor incidencia de recidivas y un intervalo libre de enfermedad más largo, sin importar el tamaño tumoral o la invasión de ganglios linfáticos (Hammond et al., 2010; Rakha et al., 2007; Lindstrom et al., 2012). El papel de la progesterona en el desarrollo del cáncer de mama sigue siendo discutible, el valor pronóstico de la condición del

receptor de progesterona (RP) es debatible pues se ha sugerido que el estado de RP debería ser ligado con la condición de RE dado que los pacientes RE+ y RP+ tienen un mejor pronóstico que los pacientes RE+ y RP-; cabe anotar que los tumores RE- pueden tener un peor pronóstico si son RP+ (Rakha et al., 2007; Lindstrom et al., 2012); sin embargo, un embarazo a término donde los niveles de progesterona son altos, llegando a 100-200ng/ml en su fase final, es considerado como un factor de resistencia al desarrollo de cáncer de mama (Wakeling et al., 2001).

Los resultados del presente trabajo no mostraron una asociación significativa del polimorfismo Phe31Ile o el alelo Ile en función del estado de los receptores hormonales lo que sugiere que esta variante genética está desligada de la expresión de receptores hormonales a nivel de membrana plasmática en células tumorales, y por tanto, no tendría relación con la respuesta a terapia hormonal suministrada a pacientes con estos tipos de tumores; algo que debería ser evaluado en futuras investigaciones.

A pesar de lo expuesto en el párrafo anterior, en el presente estudio, el riesgo de desarrollar cáncer de mama asociado con el polimorfismo Phe31Ile fue más pronunciado en mujeres menores de 50 años. Este resultado sugiere una interacción entre Aurora-A y el nivel de estrógenos, ya que 50 años es la edad promedio de ingreso en el período menopáusico para mujeres ecuatorianas. Por tanto, la asociación de los receptores hormonales con la variante genética en estudio no es inmediatamente determinante y se plantea la posibilidad de realizar ensayos posteriores para elucidar esta asociación.

Por otra parte, se encontró asociación significativa entre el polimorfismo y la invasión a ganglios linfáticos y el receptor Her2/neu negativo, con el riesgo de desarrollar cáncer de mama femenino, lo que concuerda con hallazgos encontrados en población norteamericana (Ewart-Toland et al., 2005). Esto sugiere que tumores sin sobreexpresión de Her2/neu presentarían mayor

agresividad en su crecimiento y una incrementada tasa de división celular al estar ligados a la presencia del alelo Ile de la Aurora-A.

Se ha visto que el polimorfismo Phe31Ile del gen *STK15* esta correlacionado con la invasión y metástasis en cáncer de vejiga (Fraizer et al., 2004), colon (Baba et al., 2009), esófago (Pan et al., 2012; Chava et al., 2011) y ovario (DiCioccio et al., 2004). Para el cáncer de mama, sin embargo, varios estudios han mostrado que el polimorfismo Phe31Ile del *STK15* es más relevante en la iniciación de la tumoración que en eventos metastásicos (Gopfert et al., 2002; Ewart-Toland et al., 2005), estos hallazgos están en concordancia con nuestros resultados que muestran una asociación del polimorfismo Phe31Ile de *STK15* con el riesgo de ocurrencia de cáncer de mama, mas no con la invasión a ganglios linfáticos y por tanto a eventos metastásicos.

Los niveles de expresión reportados en este estudio muestran una sobreexpresión del gen *STK15* en tumores de mama del tipo *Basal-Like*, lo que coincide con lo establecido en estudios anteriores (Yamamoto et al., 2009), esto apoya la deducción de que el gen estaría íntimamente asociado a la ocurrencia del cáncer de mama y promoviendo su agresividad. Los tumores triple negativos son identificados por ser altamente agresivos y por no tener un tratamiento efectivo hasta la actualidad, para este tipo de tumores se ha propuesto a la Aurora-A como posible blanco terapéutico en base a su expresión estudiada en tumores de mama (Staff et al., 2009). Una inhibición de esta proteína podría reducir el tamaño tumoral mejorando el pronóstico de los pacientes con cáncer de mama. La expresión del gen *STK15* en tumores tipo Luminal A no fue estadísticamente evidente, esto respalda la ausencia de asociación entre la variante Phe31Ile y los receptores hormonales positivos que se observó en los resultados obtenidos.

Otro hecho que sugiere que la variante Phe31Ile estaría en relación con los niveles de expresión se determinó cuando se asoció la sobreexpresión del gen *STK15*, en tumor tipo *Basal-Like* con el genotipo de estos tumores. Aquellos

que mostraron una mayor expresión presentaban la variante lle, esto está en concordancia con estudios anteriores de otros grupos de investigación realizados en cáncer de colon y mama (Lin et al., 2010; Cammareri et al., 2010).

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio, que muestran una asociación entre el riesgo de ocurrencia de cáncer de mama, el polimorfismo Phe31Ile y la sobreexpresión del gen *STK15* en población femenina ecuatoriana mestiza, son biológicamente confiables ya que la variante de estudio y su sobreexpresión mostraron estar en relación con la selectividad de crecimiento de células tumorales versus células normales (tumorigénesis), algo que esta sustentado además en la asociación del polimorfismo con tumores de tamaño mayor a 2 cm, y sobre todo con su ligage a tumores pobremente diferenciados. Una sobreexpresión del transcrito del gen *STK15* se ha identificado en cáncer de mama *in situ* e infiltrante, indicando que *STK15* juega un rol importante en la tumorigénesis del cáncer de mama (Goepfert et al., 2002; Royce et al., 2004; Ewart-Toland et al., 2005; Miao et al., 2004). Los datos obtenidos en este estudio en referencia con investigaciones previas apoyan la inferencia de que el polimorfismo Phe31Ile del gen *STK15* es un factor de susceptibilidad genética predisponente al desarrollo de cáncer de mama y que la sobreexpresión de este gen está relacionada a un tipo de tumor altamente agresivo y de mal pronóstico lo que sugiere que podría ser usado como blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los datos generados muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles de acuerdo a la distribución del genotipo del gen *STK15* y que el alelo lle es el que determina la ocurrencia de cáncer de mama en la población de estudio.

El alelo lle del gen *STK 15* está asociado al grado tumoral, tamaño del tumor y factor de crecimiento tumoral en los tumores de mama, lo que determina un mal pronóstico en individuos afectos con este tipo de cáncer.

Este estudio proporciona la primera evidencia de que el genotipo lle/lle del gen *STK15* está asociado con un mayor riesgo de ocurrencia de carcinoma mamario en población ecuatoriana y que la sobreexpresión de este gen está ligada a los tipos de tumor *Basal-like* y determina un mal pronóstico en individuos afectos con cáncer de mama.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que *STK15* es un gen candidato de susceptibilidad de desarrollo tumoral en humanos y su utilidad como posible biomarcador de susceptibilidad en el diagnóstico y pronóstico de pacientes con cáncer de mama.

Se recomienda plantear un estudio donde se incluya un mayor número de casos y controles para elucidar la ausencia de asociación entre los receptores hormonales positivos y la variante de estudio. Aumentar la población hace que los datos ganen robustez estadística. Además, es importante correlacionar los resultados obtenidos con pruebas citogenéticas e inmunohistoquímicas, pues los datos a nivel molecular deben ser respaldados a nivel cromosómico y a nivel de expresión de proteínas para establecer un marcador de pronóstico y diagnóstico en base al significativo resultado del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Abba, M., Lacunza, E., Butti, M., Aldaz, C. (2010). *Biomarker Insights Breast cancer Biomarker Discovery in the Functional Genomic Age: A systematic Review of 42 Gene expression signatures*. *Biomark Insights*. 5:103-18. doi:10.4137/BMI.S5740.
- Allen, N., Beral, V., Casabonne, D., Kan, S., Reeves, G., Brown, A., et al. (2009). *Moderate alcohol intake and cancer incidence in women*. *J Natl Cancer Inst*. 101(5): p. 296-305.
- American cancer society board of directions. (1998). *ACS challenge goals for US cancer: Mortality for the year 2015*. Atlanta-USA: Proceeding of the board of directions.
- Arce, C., bargallo, E., Villaseñor, Y., Gamboa, C., Lara, F., Pérez, V. (2011). *Cáncer de mama*. *Cancerología*. 6:77-86.
- Baba, Y., Nosho, K., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Toyoda, S., et al. (2009). *Aurora-A expression is independently associated with chromosomal instability colorectal cancer*. *Neoplasia*. 11(5):418-425.
- Beral, V. y Million Women Study. (2003). *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. *Lancet Oncol*. 362(9382): p. 419-27.
- Beral, V. y Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer Breast cancer and breastfeeding. (2002). *Collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. *Lancet*. 360(9328):187-95.
- Bradbury, AR., Olopade, O. (2007). *Genetic susceptibility to breast cancer*. *Rev Endocr Metab Disord*. 8:225.

- Cammareri, P., Acopelliti, A., Todaro, M., Eterno, V., Francescangeli, F., Moyer, M., Agrusa, A., Dieli, F., Zeuner, A., Stassi, G. (2010). *Aurora-A is essential for the tumorigenic capacity and chemoresistance of colorectal cancer stem cells*. *Cancer research*. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3953.
- Chava, S., Mohan, V., Pasopuleti, N., Latha, M., Khan, A., Upendram, P., et al. (2011). *Evaluation of Aurora-A gene polymorphism and esophageal cancer risk in south Indian population*. *Genet Test Mol Biomarkers*. 15(3):185-189.
- Desta, Z., Flockhart, D. (2007). *Germline pharmacogenetic of tamoxifen response: have we learned enough?*. *J Clin Oncol*. 25:5147.
- DeVita, V., DeVita, VJr., Laurence, T., Rosenberg, S. (2011). *Cancer: Principles & Practice of oncology: Primer of the molecular biology of cancer*. Philadelphia USA: Lippincott Williams & Wilking.
- DiCioccio, R., Song, H., Waterfall, C., Kimura, M., Nagase, H., McGuire, V., et al. (2004). *STK15 polymorphism and association with risk of invasive ovarian cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13:1598-1594.
- Edwards, B., Word, E., Kahler, B. (2010). *Annual report to the nation on the status of cancer*. *Cancer*. 116:544-73.
- Elmore, S. (2007). *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. *Toxicologic Pathology*. 35:495-516.
- Ewart-Toland, A., Dai, Q., Gao, Y., Nagase, H., Dunlop, M., Farrington, S., et al. (2005). *Aurora-A/STK15 T+91A is a general low penetrance cancer susceptibility gene: a meta-analysis of multiple cancer types*. *Oxford Journals*. 26:1368-1373.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., Bray, F. (2013). *GLOBOCAN*

2012: *Cancer Incidence and Mortality Worldwide (IARC)*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. (2010). *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. International Journal of Cancer, 127(12), 2893-2917. Wiley Subscription Services, Inc. doi:10.1002/ijc.25516.

Fraizer, G., Diaz, M., Lee, I., Borton-Grossman, H., Sen, S. (2004). *Aurora-A/STK15/BTAK enhances chromosomal instability in bladder cancer cells*. Int J Oncol. 25:1019:1039.

García-Closas, M., et al. (2008). *Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and psychological characteristics*. Plos Genetics. 4:e10000054.

Gautschi, O., Heghway, J., Mack, P., Purnell, P., Lara, P., Gandara, D. (2008). *Aurora kinases as anticancer drug targets*. Clin Cancer Res. 14(6): 1639-48.

Goepfert, M., Adiyun, Y., Zhong, L., Gay, L., Medina, D., Brinkley, W. (2002). *Centrosome amplification and overexpression of Aurora-A are early events in rat mammary carcinogenesis*. Cancer Res. 62:4115-4122.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell. 100:p57.

Hilton, F., y Shapiro, G. (2014). *Aurora kinase inhibition as an anticancer strategy*. Journal of Clinical Oncology. 32(1):57-9. doi:10.1200/JCO.2013.50.7988.

Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y. (2003). *Apoptosis – the p53 network*. The Journal of Cell Science. 116:4077-85.

IARC. (2008). *World Cancer Report 2008*: IARC.

- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2010). *Estadísticas Hospitalarias, Camas y Egresos*. [En Línea]. Recuperado el 21 de octubre del 2013 de <http://anda.inec.gob.ec/anda/index.php/catalog/258>.
- Jingyan, F., Minglei, B., Qing, J. (2007). *Roles of aurora kinases in mitosis and tumorigenesis*. *Mol Cancer Res*. 5:1-10.
- Khan, J., Ezan, F., Crémet, J., Fautel, A., Gilot, D., et al. (2011). *Overexpression of active Aurora-C kinase results in cell transformation and tumor formation*. *PLoS ONE*. 6(10): e26512. doi: 10.1371/journal.pone.0026512.
- Kiat-Lim, S., Gopalan, G. (2007). *Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway*. *Biochem J*. 403(Pt 1): 119–127.
- Kumar, V., Aster, J., Fausto, N., Abbas, A. (2010). *Robis y Cotran: Patología estructural y funcional*. (8va ed.). España: Elsevier-Saunders Publications.
- La Hora. (2013). *El cáncer de mama puede evitarse*. [En Línea]. Recuperado el 21 de octubre del 2013 de http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101410129/-1/El_cáncer_de_mama_puede_evitarse.html#.UmXmPBbeWi0.
- Lindstrom, L., Karlsson, E., Wilking, U., Johansson, U., Hartman, J., Lidbrink, E., et al. (2012). *Clinically used breast cancer markers such as estrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 are unstable throughout tumor progression*. *J Clin Oncol*. 30:2601-2608.
- Lin, Z., Jeng, Y., Hu, F., Pan, H., Tsao, H., Lai, P., Lee, P., Cheng, A., Hsu, H. (2010). *Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma*. *BMC cancer*. 10:461.

- Loman, N., Johannson, O., Kristoffersson, U., Olson, H., Barg, A. (2001). *Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer*. J Natl Cancer Inst. 93:1215-1223.
- Macarulla, T., Ramos, F., Tabernero, J. (2011). *Comprender el cáncer*. Barcelona-España: Editorial AMAT.
- Mansel, R., Fodstad, O., Jiang, W. (2007). *Metastasis of breast cancer*. Springer Publications.
- Makay, J., Crofton, J. (2013). *Tobacco and the development world*. *British medical Bulletin*. 52(1): 206-21.
- Mendiola, M., Barriuso, J., Mariño-Enríquez, A., Redondo, A., Domínguez-Cáceres, A., Hernández-Cortés, G., Pérez-Fernández, E., Sánchez-Navarro, I., Fresno, J., et al. (2009). *Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma*. *Human pathology*. 40(5): 631-638. doi: 10.1016.
- Miao, X., Sun, T., Wang, Y., Zhang, X., Tan, W., Lin, D. (2004). *Functional STK15 Phe31Ile polymorphism is associated with the occurrence and advanced disease status of esophageal squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*. 64:2680-2683.
- Miyoshi, y., Iwao, K., Egawa, C., Noguchi, S. (2001). *Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers*. *Int J Cancer*. 92:370-373.
- Monninkhof, E., Elias, S., Vlems, F., Van der Tweel, I., Schuit, A., Voskuil, D. (2007). *Physical activity and breast cancer: a systematic review*. *Epidemiology*. 18(1):137-57.
- Naidoo, N., Pawitan, Y., Soong, R., Cooper, DN., Ku, C. (2011). *Human genetics and genomics a decade after the release of the draft*

sequence of the human genome. Hum Genomics 5 (6): 577–622.
doi:10.1186/1479-7364-5-6-577

- Pan, J., Ajani, J., Gu, J., Gang, Y., Quin, A., Hung, M., et al. (2012). *Association of Aurora-A (STK15) kinase polymorphisms with clinical outcome of esophageal cancer treated with preoperative chemoradiation*. Cancer. 118(17):4346-4353.
- Pageau, G, et al. (2007). *The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers*. Nat Rev Cancer. 7: 628.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA. (2000). *Molecular portraits of human breast tumors*. Nature. 406:747-752.
- Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT. (1999). *Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers*. Proc Natl Acad Sci USA. 96:9212-9217.
- Pass, H., Carbone, D., Johnson, D., Minna, J., Scagliotti, G., Turrisi, A. (2012). *Principles and practice of lung cancer: The official reference text of the international association for the study of lung cancer*. Philadelphia-USA: Lippincott Williams & Wiljings.
- Qi, W., Cooke, L., Liu, X., Rimsza, L., Roe, D., Manziolli. A., Persky, D., Miller, T., Mahadevan, D. (2011). *Aurora inhibitor MLN8237 in combination with docetaxel enhances apoptosis and anti-tumor activity in mantle cell lymphoma*. Biochemical Pharmacology. 81(7):881-890.
- Quackenbush J. (2006). *Microarray analysis and tumor classification*. N Engl J Med. 354:2463-2472.
- Rakha, E., Sayod, M., Green, A., Lee, A., Robertson, J., Elis, I. (2007). *Prognostic markers in triple-negative breast cancer*. Cancer. 190:25-32.

- Reeves, G., Pirie, K., Beral, V., GEE, J., Spencer, E., Bull, D. (2007). *Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study*. *BMJ*. 335(7630):1134.
- Romond, E., Perez, E., Bryant, J., Suman, V., Wolmark, N. (2005). *Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer*. *N Engl J Med*. 353:1673-1684. doi: 10.1056/NEJMoa052122.
- Royce, M., Xiau, W., Sahin, A., Katayama, H., Johnston, D., Hortobagyi, G., et al. (2004). *STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis*. *Cancer*. 100:12-19.
- Ryerson, A., Miller, J., Ehemann, C., White, M. (2007). *Use of mammograms among women aged >40 years. United States 2000 – 2005*. *MMWIZ*. 56:49.
- Senra-Varela, A. (2002). *El cancer: Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención*. (2da. Ed.) México DF: Harcourt S.A.
- Schneider, B., Gray, R., Radovich, M., Shen, F., Vance, G., et al. (2013). *Prognostic and predictive value of tumor VEGF gene amplification in metastatic breast cancer treated with paclitaxel with and without bevacizumab; results from ECOG 2100 trial*. *Clin Can Res*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3029.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A. (2003). *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100;8418-8423.
- Sun, T., Miao, X., Wang, J., Tan, W., Zhou, Y., Yu, C., & Lin, D. (2004). *Functional Phe31Ile polymorphism in Aurora A and risk of breast carcinoma*. *Carcinogenesis*. 25(11): 2225–30. doi:10.1093/carcin/bgh244.

- Ursula, A., Matulonis, A., Sudarshan, S., Sharad, G., Gordon, M., Salvatore A. Del Prete, S., Ray-Coquard, I., Kutarska, E., Liu, H., Fingert, H., Zhou, X., Danaee, H., Schilder, J. (2012). *Phase II study of MLN8237 (alisertib), an investigational Aurora A kinase inhibitor, in patients with platinum-resistant or -refractory epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma*. *Gynecologic Oncology*. 127(1):63-69.
- Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M. (2002). *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. *Nature*. 415:530-536.
- Walsh, T., Casadei, S., Coats, K., et al. (2006). *Spectrum of Mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in Families at High Risk of Breast Cancer*. *JAMA*, 295(12):1379-1388.
- Weinberg, R. (2006). *The biology of cancer*. NY-USA: Garland Science.
- Wellings, S. (1980). *A hypothesis of the origin of human breast cancer from the terminal ductal lobulillar unit*. *Pathol Res Pract*. 160:515.
- Winchester, H., y Winchester, N. (2006). *Breast cancer*. (2da. ed.). Ontario: Decker Inc.
- World Health Organization. (2008). *Report on the global tobacco epidemic*. The MPOWER Package.
- Xu, J., Wu, X., Zhou, W., Liu, A., Wu, J. (2013). *Aurora-A identifies early recurrence and poor prognosis and promises a potential therapeutic target in triple negative breast cancer*. *PLOS ONE* 8(2): e56919. doi:10.1371/journal.pone.0056919.
- Yager, J., Davidson, N. (2006). *Estrogen carcinogenesis in breast cancer*. *N Engl J Med*. 354:270.

Zienolddiny, S., Haugen, A., Sigstad, J., Kjuus, H., Anmarkrud, K., Kjærheim K. (2013). *Analysis of polymorphisms in the circadianrelated genes and breast cancer risk in Norwegian nurses working night shifts*. *Breast Cancer Research*, 15:R53 doi:10.1186/bcr3445.

ANEXOS

Anexo 1.

No.	CODIGO IB	EDAD	SNP STK16	GRUPO	TIPO	HER 2 / NEU	RECEPTOR PROGESTERONA	RECEPTOR ESTROGENO	K-47	LATERALIDAD	GRADO TUMORAL	METASTASIS GANG. LINFATICOS	CLASIFICACIÓN MOLECULAR	ESTADIO TUMORAL	TAMAÑO TUMOR
1	TM1	<50	T/A	CA	D	P	N	N	<20	D	MO	M+	H2	I	<2
2	TM2	>50	T/A	CA	D	N	N	N	NA	I	MO	M+	B	IIB	<5
3	TM3	<50	T/A	CA	D	P	P	P	NA	D	MO	M-	LB	IIA	<2
4	TM4	<50	T/A	CA	M	N	P	P	NA	D	BI	M+	LA	IIB	<5
5	TM5	>50	T/A	CA	P	N	P	P	<20	I	MO	M+	LA	IIIA	<5
6	TM6	<50	T/A	CA	MDI	N	P	P	>20	I	BI	M-	LA	IIA	<5
7	TM7	<50	T/A	CA	D	P	N	P	NA	D	MO	M-	LB	I	<2
8	TM8	>50	T/A	CA	D	N	P	P	>20	D	BI	M+	LA	IIA	<2
9	TM9	>50	T/A	CA	NA	N	P	P	<20	I	BI	M-	LA	I	<2
10	TM10	<50	A/A	CA	D	N	P	P	>20	I	NA	NA	LA	IIA	<2
11	TM11	<50	A/A	CA	D	P	P	P	NA	D	MO	M+	LB	IIIA	<2
12	TM12	<50	T/A	CA	D	N	N	N	NA	I	PO	M+	B	IIIA	<2
13	TM13	<50	T/A	CA	MDI	N	N	N	>20	I	MO	M-	B	I	<2
14	TM14	<50	T/A	CA	ME	N	N	N	NA	D	NA	M-	B	I	<2
15	TM15	>50	T/T	CA	L	N	P	P	<20	D	NA	M+	LA	IIIC	<2
16	TM16	>50	T/A	CA	D	P	P	N	<20	D	MO	M+	H2	IIA	<2
17	TM17	<50	T/T	CA	D	N	P	P	<20	I	BI	M-	LA	IIA	<2
18	TM18	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	D	MO	M-	LA	I	<2
19	TM19	>50	T/A	CA	L	N	P	P	NA	D	NA	M+	LA	IIA	<2
20	TM20	>50	T/A	CA	I	N	P	P	<20	I	NA	M+	LA	IIA	<2
21	TM21	>50	T/T	CA	D	P	P	P	>20	D	BI	M+	LB	IIA	<2
22	TM22	>50	T/A	CA	MDI	N	N	N	<20	I	BI	M+	B	IIIA	<2
23	TM23	<50	A/A	CA	L	N	P	P	>20	I	PO	M+	LA	IIIC	<2
24	TM24	>50	T/A	CA	NA	P	P	P	NA	I	NA	M-	LB	I	<2
25	TM25	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	I	BI	M+	LA	IIA	<2
26	TM26	<50	T/A	CA	L	N	P	P	<20	D	NA	NA	LA	I	<2
27	TM27	>50	T/A	CA	D	N	P	P	NA	D	MO	M+	LA	IIB	<5
28	TM28	>50	T/A	CA	NA	N	P	P	NA	D	MO	M+	LA	IIB	<5
29	TM29	<50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	I	MO	M-	LA	IIA	<5
30	TM30	<50	T/T	CA	D	N	P	P	<20	D	BI	M+	LA	IIA	<5
31	TM31	<50	T/A	CA	D	N	N	N	<20	I	MO	M+	B	IIB	<5
32	TM32	>50	T/A	CA	L	N	N	N	<20	D	NA	M-	B	IIA	<5
33	TM33	>50	T/T	CA	D	N	N	N	NA	I	MO	M-	B	IIA	<5
34	TM34	<50	T/A	CA	D	N	N	N	<20	D	PO	M-	B	IIB	<5
35	TM35	<50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	I	MO	M+	LA	IIB	<5
36	TM36	<50	T/A	CA	NA	N	P	P	NA	D	NA	M+	LA	IIB	<5
37	TM37	<50	A/A	CA	D	N	P	P	<20	I	MO	M+	LA	IIB	<5
38	TM38	<50	T/A	CA	D	P	N	N	<20	D	MO	M+	H2	IIB	<5
39	TM39	>50	T/T	CA	D	P	P	P	<20	D	MO	M+	LB	IIIA	<5
40	TM40	<50	T/T	CA	MDP	N	N	N	<20	D	PO	M+	B	IIB	<5
41	TM41	<50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	I	NA	M+	LA	IIB	<5
42	TM42	<50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	I	MO	M+	LA	IIB	<5
43	TM43	>50	T/T	CA	P	N	N	P	<20	D	NA	M-	LA	IIA	<5
44	TM44	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	D	BI	M-	LA	IIA	<5
45	TM45	>50	T/T	CA	D	N	P	P	<20	D	BI	NA	LA	IIA	<5
46	TM46	<50	A/A	CA	MDI	N	N	N	>20	I	PO	NA	B	NA	<5
47	TM47	<50	T/T	CA	D	P	P	N	NA	D	BI	NA	H2	IIB	<5
48	TM48	>50	T/T	CA	D	N	P	P	NA	I	MO	M+	LA	IIB	<5
49	TM49	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	D	BI	NA	LA	IIB	<5
50	TM50	>50	T/T	CA	D	P	N	N	>20	D	PO	M+	H2	IIIC	<5
51	TM51	>50	T/A	CA	D	N	N	N	>20	I	PO	NA	B	IIB	<5
52	TM52	<50	A/A	CA	D	P	N	N	>20	I	PO	M+	H2	IIB	<5
53	TM53	<50	A/A	CA	D	N	P	P	>20	I	PO	M+	LA	IIIC	>5
54	TM54	>50	T/A	CA	D	N	P	P	NA	I	MO	NA	LA	IIB	>5
55	TM55	>50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	I	NA	NA	LA	O	<2
56	TM56	>50	T/T	CA	D	N	P	N	>20	D	PO	NA	EN	IIA	<5
57	TM57	<50	A/A	CA	D	N	P	N	NA	D	PO	M-	EN	IIA	<5
58	TM58	>50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	D	PO	NA	LA	IIA	<5
59	TM59	<50	T/A	CA	NA	N	P	P	NA	D	BI	M+	LA	IIIA	>5
60	TM60	>50	T/A	CA	D	N	N	P	NA	D	BI	M+	LA	IIIA	<5
61	TM61	>50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	I	BI	NA	LA	IIB	>5
62	TM62	<50	A/A	CA	MM	N	P	P	NA	D	PO	M+	LA	IIB	>5

63	TM63	>50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	D	MO	M+	LA	III C	<5
64	TM64	>50	T/T	CA	D	N	N	N	NA	I	PO	M-	B	O	<2
65	TM65	>50	T/A	CA	P	N	N	P	NA	I	MO	M+	LA	III A	<5
66	TM66	>50	A/A	CA	I	P	N	P	NA	D	PO	M-	LB	III B	>5
67	TM67	>50	T/T	CA	MDL	N	P	P	<20	I	MO	M+	LA	NA	
68	TM68	<50	A/A	CA	D	N	P	N	NA	I	PO	M+	EN	NA	
69	TM69	>50	T/A	CA	D	P	N	P	NA	D	MO	NA	LB	NA	
70	TM70	>50	T/A	CA	M	N	N	P	NA	I	MO	M+	LA	III A	>5
71	TM71	>50	T/A	CA	M	N	N	P	NA	I	NA	M-	LA	O	<2
72	TM72	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	I	MO	M+	LA	NA	
73	TM73	>50	A/A	CA	D	N	P	P	>20	D	MO	M+	LA	IIA	<2
74	TM74	<50	T/A	CA	D	N	P	P	>20	D	PO	M+	LA	III A	<2
75	TM75	<50	T/T	CA	D	P	N	N	NA	D	MO	NA	H2	NA	
76	TM76	<50	A/A	CA	D	N	N	P	>20	D	MO	M+	LA	III B	<5
77	TM77	>50	A/A	CA	NA	N	P	P	>20	I	BI	M+	LA	III B	>5
78	TM78	<50	T/T	CA	D	N	N	P	NA	I	MO	M+	LA	III B	<5
79	TM79	>50	A/A	CA	D	P	N	N	NA	I	PO	NA	H2	NA	
80	TM80	>50	T/T	CA	D	P	N	P	<20	D	BI	M+	NA	III A	<2
81	TM81	<50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	D	MO	NA	LA	NA	
82	TM82	<50	T/A	CA	D	N	P	P	NA	D	MO	NA	NA	NA	
83	TM83	>50	T/T	CA	D	P	N	N	NA	I	PO	NA	H2	III B	>5
84	TM84	>50	T/A	CA	D	N	N	N	NA	D	PO	NA	B	NA	
85	TM85	<50	T/A	CA	D	P	N	N	NA	I	MO	NA	H2	III B	>5
86	TM86	<50	T/A	CA	MDM	N	N	N	NA	D	MO	NA	B	NA	
87	TM87	>50	T/T	CA	D	P	N	P	NA	D	BI	NA	LB	NA	
88	TM88	>50	T/A	CA	D	N	N	P	NA	D	BI	M+	LA	NA	
89	TM89	>50	T/A	CA	D	N	N	P	NA	D	BI	M+	LA	III A	<5
90	TM90	>50	A/A	CA	D	N	N	N	NA	D	PO	M-	B	NA	
91	TM91	<50	T/T	CA	L	N	P	P	>20	I	PO	M+	LA	III C	<2
92	TM92	<50	T/T	CA	D	N	P	P	<20	D	BI	M+	LA	IIA	<5
93	TM93	>50	T/T	CA	D	P	P	P	<20	D	MO	M+	LB	III A	<5
94	TM94	<50	T/T	CA	MDP	N	N	N	<20	D	PO	M+	B	III B	<5
95	TM95	>50	T/T	CA	P	N	N	P	<20	D	NA	M-	LA	IIA	<5
96	TM96	>50	T/T	CA	D	P	N	N	>20	D	PO	M+	H2	III C	<5
97	TM97	>50	T/T	CA	MDL	N	P	P	<20	I	MO	M+	LA	NA	
98	TM98	>50	T/T	CA	D	P	N	P	<20	I	BI	M+	LB	III A	<5
99	TM99	<50	T/A	CA	D	P	N	N	<20	D	MO	M+	H2	I	<2
100	TM100	>50	T/A	CA	P	N	P	P	<20	I	MO	M+	LA	III A	<5
101	TM101	<50	T/A	CA	MDI	N	P	P	>20	I	BI	M-	LA	IIA	<5
102	TM102	>50	T/A	CA	D	N	P	P	>20	D	BI	M+	LA	IIA	<2
103	TM103	>50	T/A	CA	NA	N	P	P	<20	I	BI	M-	LA	I	<2
104	TM104	>50	T/A	CA	D	P	P	N	<20	D	MO	M+	H2	IIA	<2
105	TM105	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	D	MO	M-	LA	I	<2
106	TM106	<50	T/A	CA	D	N	N	N	<20	I	MO	M+	B	III B	<5
107	TM107	<50	T/A	CA	D	N	N	N	<20	D	PO	M-	B	III B	<5
108	TM108	>50	T/A	CA	D	N	N	N	>20	I	PO	NA	B	III B	<5
109	TM109	<50	T/A	CA	D	N	P	P	>20	D	PO	M+	LA	III A	<2
110	TM110	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	D	BI	NA	LA	III B	<5
111	TM111	<50	T/A	CA	L	N	P	P	<20	D	NA	NA	LA	I	<2
112	TM112	<50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	I	MO	M-	LA	IIA	<5
113	TM113	>50	T/A	CA	I	N	P	P	<20	I	NA	M+	LA	IIA	<2
114	TM114	>50	T/A	CA	D	N	P	P	<20	I	BI	M+	LA	IIA	<2
115	TM115	<50	T/A	CA	D	P	N	P	NA	D	MO	M-	LB	I	<2
116	TM116	>50	T/A	CA	MDI	N	N	N	NA	I	BI	M+	B	III A	<2
117	TM117	<50	T/A	CA	MDI	N	N	N	NA	I	MO	M-	B	I	<2
118	TM118	>50	A/A	CA	D	N	P	P	>20	D	MO	M+	LA	IIA	<2
119	TM119	<50	A/A	CA	D	N	N	P	>20	D	MO	M+	LA	III B	<5
120	TM120	>50	A/A	CA	NA	N	P	P	>20	I	BI	M+	LA	III B	>5
121	TM121	<50	A/A	CA	D	N	P	N	NA	D	PO	M-	EN	IIA	<5
122	TM122	>50	A/A	CA	D	N	P	P	NA	D	PO	NA	LA	IIA	<5
123	TM123	>50	A/A	CA	MM	N	P	P	NA	D	PO	M+	LA	III B	>5
124	TM124	>50	A/A	CA	I	P	N	P	NA	D	PO	M-	LB	III B	>5

No.	CODIGO IIB	EDAD	SNP STK15	GRUPO	No.	CODIGO IIB	EDAD	SNP STK15	GRUPO
125	CM1	<50	T/T	CO	199	CM75	<50	A/A	CO
126	CM2	<50	T/T	CO	200	CM76	<50	T/A	CO
127	CM3	>50	T/T	CO	201	CM77	<50	T/A	CO
128	CM4	<50	A/A	CO	202	CM78	<50	T/T	CO
129	CM5	<50	T/T	CO	203	CM79	>50	A/A	CO
130	CM6	<50	T/T	CO	204	CM80	<50	T/T	CO
131	CM7	<50	T/A	CO	205	CM81	<50	T/A	CO
132	CM8	<50	T/T	CO	206	CM82	>50	T/A	CO
133	CM9	<50	T/A	CO	207	CM83	<50	T/A	CO
134	CM10	<50	T/A	CO	208	CM84	>50	T/A	CO
135	CM11	<50	T/A	CO	209	CM85	<50	T/A	CO
136	CM12	<50	T/T	CO	210	CM86	<50	T/T	CO
137	CM13	>50	A/A	CO	211	CM87	<50	T/T	CO
138	CM14	<50	T/A	CO	212	CM88	<50	T/A	CO
139	CM15	>50	T/T	CO	213	CM89	<50	T/A	CO
140	CM16	<50	T/A	CO	214	CM90	<50	T/A	CO
141	CM17	>50	T/T	CO	215	CM91	<50	T/A	CO
142	CM18	>50	T/T	CO	216	CM92	<50	A/A	CO
143	CM19	<50	T/A	CO	217	CM93	<50	T/A	CO
144	CM20	>50	T/A	CO	218	CM94	<50	T/A	CO
145	CM21	>50	T/A	CO	219	CM95	<50	T/A	CO
146	CM22	<50	T/T	CO	220	CM96	<50	A/A	CO
147	CM23	<50	T/T	CO	221	CM97	<50	T/T	CO
148	CM24	>50	T/A	CO	222	CM98	>50	T/A	CO
149	CM25	<50	T/T	CO	223	CM99	<50	T/T	CO
150	CM26	<50	T/A	CO	224	CM100	<50	A/A	CO
151	CM27	>50	T/T	CO	225	CM101	<50	T/T	CO
152	CM28	<50	T/A	CO	226	CM102	>50	T/A	CO
153	CM29	<50	T/A	CO	227	CM103	<50	A/A	CO
154	CM30	<50	T/T	CO	228	CM104	>50	T/A	CO
155	CM31	>50	A/A	CO	229	CM105	<50	T/T	CO
156	CM32	<50	T/T	CO	230	CM106	>50	T/A	CO
157	CM33	>50	T/A	CO	231	CM107	>50	T/A	CO
158	CM34	>50	T/T	CO	232	CM108	>50	T/A	CO
159	CM35	>50	T/A	CO	233	CM109	<50	A/A	CO
160	CM36	<50	T/A	CO	234	CM110	<50	T/T	CO
161	CM37	<50	A/A	CO	235	CM111	>50	T/A	CO
162	CM38	<50	T/A	CO	236	CM112	<50	T/T	CO
163	CM39	<50	T/A	CO	237	CM113	<50	T/A	CO
164	CM40	<50	T/T	CO	238	CM114	<50	T/A	CO
165	CM41	>50	A/A	CO	239	CM115	<50	T/A	CO
166	CM42	<50	T/T	CO	240	CM116	<50	T/A	CO
167	CM43	<50	A/A	CO	241	CM117	<50	T/T	CO
168	CM44	>50	T/A	CO	242	CM118	<50	T/A	CO
169	CM45	<50	T/T	CO	243	CM119	<50	A/A	CO
170	CM46	<50	T/T	CO	244	CM120	<50	T/A	CO
171	CM47	<50	T/T	CO	245	CM121	<50	T/T	CO
172	CM48	>50	T/A	CO	246	CM122	<50	T/T	CO
173	CM49	<50	A/A	CO	247	CM123	<50	T/A	CO
174	CM50	>50	T/T	CO	248	CM124	<50	A/A	CO
175	CM51	<50	T/T	CO	249	CM125	<50	T/A	CO
176	CM52	<50	T/A	CO	250	CM126	<50	T/T	CO
177	CM53	<50	T/T	CO	251	CM127	<50	T/A	CO
178	CM54	<50	T/T	CO	252	CM128	<50	T/T	CO
179	CM55	<50	T/T	CO	253	CM129	<50	T/T	CO
180	CM56	<50	T/T	CO	254	CM130	<50	T/A	CO
181	CM57	<50	A/A	CO	255	CM131	<50	T/A	CO
182	CM58	<50	A/A	CO	256	CM132	<50	T/T	CO
183	CM59	<50	T/A	CO	257	CM133	<50	T/A	CO
184	CM60	>50	T/T	CO	258	CM134	<50	A/A	CO
185	CM61	>50	T/A	CO	259	CM135	<50	A/A	CO
186	CM62	>50	T/T	CO	260	CM136	<50	T/T	CO
187	CM63	>50	T/A	CO	261	CM137	>50	T/T	CO
188	CM64	<50	T/A	CO	262	CM138	>50	T/T	CO
189	CM65	<50	T/A	CO	263	CM139	<50	A/A	CO
190	CM66	<50	T/A	CO	264	CM140	<50	T/A	CO
191	CM67	<50	A/A	CO	265	CM141	>50	A/A	CO
192	CM68	<50	T/A	CO	266	CM142	>50	T/T	CO
193	CM69	<50	A/A	CO	267	CM143	>50	T/T	CO
194	CM70	<50	T/A	CO	268	CM144	<50	T/A	CO
195	CM71	<50	T/T	CO	269	CM145	<50	T/A	CO
196	CM72	<50	A/A	CO	270	CM146	<50	T/A	CO
197	CM73	<50	T/A	CO	271	CM147	>50	A/A	CO
198	CM74	<50	A/A	CO	272	CM148	<50	T/A	CO

Anexo 2.

	Casos n= 124		Controles n= 148		
	n	(%)	n	(%)	
Edad (años)					
≤ 50	54	(43.5)	91	(61.5)	P > 0.05
>50	70	(56.5)	57	(38.5)	
Tipo Patológico					
Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	2	(1.6)			
Carcinoma Mucinoso <i>in situ</i>	1	(0.8)			
Carcinoma Ductal Infiltrante	80	(64.5)			
Carcinoma Lobulillar Infiltrante	7	(5.6)			
Carcinoma Mixto Ductal - Intraductal	7	(5.6)			
Carcinoma Papilar Infiltrante	5	(4.0)			
Carcinoma Intraductal Infiltrante	4	(3.2)			
Carcinoma Mucinoso Infiltrante	2	(1.6)			
Otros Carcinomas Mixtos	8	(6.5)			
No Determinado	8	(6.5)			
Lateralidad					
Derecho	70	(56.5)			
Izquierdo	54	(43.5)			
Metástasis a ganglios linfáticos al momento del diagnóstico					
Ausencia M-	30	(24.2)			
Presencia M+	68	(54.8)			
No diagnosticado	26	(21.0)			
KI-67					
< 20	46	(37.1)			
≥ 20	25	(20.2)			
No Diagnosticado	53	(42.7)			
Tipo Tumor					
Luminal A	70	(56.5)			
Luminal B	13	(10.5)			
Basal - Like	22	(17.7)			
Her 2/neu	13	(10.5)			
No Determinado	6	(4.8)			
Grado Tumoral					
SBRI	30	(24.1)			
SBRII	47	(38.0)			
SBRIII	31	(25.0)			
No Determinado	16	(12.9)			
Estado Patológico					
O	3	(2.4)			
I	14	(11.3)			
II	61	(49.2)			
III	31	(25.0)			
ND	15	(12.1)			

Resumen descriptivo de la población total de estudio estratificada en función a los parámetros de estudio incluidos en el presente trabajo.

Nota:

SBRI: Bien diferenciado

SBRII: Moderadamente diferenciado

SBRIII: Poco diferenciado

M: Metástasis

T1: <2cm T2: 2-5cm T3: >5cm

Anexo 3

Código IIB	Concentración ng/UI	260 / 280	Código IIB	Concentración ng/UI	260 / 280
TM1	75.2	1.81	TM62	104.6	2.08
TM2	199.1	1.81	TM63	94.4	1.92
TM3	19	1.86	TM64	37.7	1.92
TM4	22.4	1.79	TM65	31.8	1.97
TM5	17.3	1.69	TM66	111.1	1.9
TM6	161.3	1.86	TM67	68.1	2.08
TM7	9.3	1.7	TM68	44.2	2.08
TM8	11.1	1.78	TM69	84.7	2.03
TM9	62.1	1.81	TM70	374.7	1.92
TM10	28.1	1.83	TM71	106.3	1.92
TM11	173.4	1.69	TM72	60.3	2.04
TM12	67.4	1.78	TM73	15.1	1.78
TM13	27.1	1.81	TM74	39	1.78
TM14	54.5	1.89	TM75	104.3	2.08
TM15	62.3	1.85	TM76	81.8	1.92
TM16	19.7	1.87	TM77	132.2	1.92
TM17	24	1.79	TM78	33	2.08
TM18	21.7	1.76	TM79	271.8	1.78
TM19	34.6	1.75	TM80	24.4	2.08
TM20	23.1	1.81	TM81	301.5	1.92
TM21	12.6	1.95	TM82	87.2	1.92
TM22	60	1.73	TM83	249.9	2.08
TM23	13.1	1.99	TM84	31.6	1.78
TM24	70.5	1.8	TM85	253.9	2.08
TM25	18.8	1.99	TM86	94.7	1.81
TM26	23.3	1.46	TM87	15.7	1.87
TM27	70.2	1.79	TM88	70.2	2.04
TM28	13.8	2.14	TM89	132.4	2.04
TM29	256.1	1.94	TM90	39.2	1.87
TM30	133.4	1.98	TM91	100.3	1.83
TM31	114.4	1.95	TM92	40.8	1.88
TM32	133.2	1.94	TM93	12.2	1.87
TM33	49.8	2.06	TM94	120	1.84
TM34	191.7	1.92	TM95	37.4	1.91
TM35	110.3	1.95	TM96	89.3	1.83
TM36	83.8	1.91	TM97	72	1.93
TM37	33	1.92	TM98	36.9	1.95
TM38	174.2	1.94	TM99	19.8	2.01
TM39	40.9	2.03	TM100	84.9	1.92
TM40	55.5	1.92	TM101	94.7	1.81
TM41	271.2	1.95	TM102	44.2	1.92
TM42	89.7	2	TM103	39	1.97
TM43	110.5	1.97	TM104	104.3	1.87
TM44	165.5	1.9	TM105	81.8	1.83
TM45	15.5	2.08	TM106	132.2	1.87
TM46	15.5	2.08	TM107	33	1.83
TM47	25.7	2.03	TM108	271.8	1.87
TM48	31.2	1.92	TM109	22.1	1.92
TM49	25.3	1.92	TM110	301.5	1.97
TM50	108.4	2.04	TM111	10.7	2.01
TM51	103.4	1.78	TM112	249.9	1.83
TM52	217.3	1.92	TM113	301.5	1.93
TM53	83.3	1.78	TM114	40.8	1.87
TM54	92.3	1.97	TM115	24.4	1.83
TM55	196.6	1.9	TM116	100.3	2.01
TM56	47.9	2.08	TM117	47.9	1.93
TM57	22.1	2.04	TM118	120	1.92
TM58	161.2	1.78	TM119	87.2	1.97
TM59	179.6	1.92	TM120	36.9	1.83
TM60	10.7	2.04	TM121	104.3	1.87
TM61	65.8	1.78	TM122	15.1	1.95

Anexo 4.

MUESTRA	TIPO	EDAD	SNP STK15	GRADO TUMORAL	ESTADIO TUMORAL	KI-67	METASTASIS A GANGLIOS	TAMAÑO TUMOR	GEN	CASO Cp	GEN	CONTROL Cp	EXPRESION RELATIVA
TM15	Ductal	<50	AA	PO	III	ND	M+	<2	<i>AUKA</i>	43.5	<i>AUKA</i>	45.8	4.8
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.0	
TM102	Ductal	>50	TT	PO	O	ND	M-	<2	<i>AUKA</i>	45.7	<i>AUKA</i>	46.8	2.3
									<i>GAPDH</i>	41.8	<i>GAPDH</i>	41.8	
TM4	Ductal	>50	TA	MO	II	ND	M+	<5	<i>AUKA</i>	43.2	<i>AUKA</i>	45.1	3.9
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.0	
TM16	MDI	<50	TA	MO	I	>20	M-	<2	<i>AUKA</i>	33.3	<i>AUKA</i>	33.6	1.5
									<i>GAPDH</i>	42.5	<i>GAPDH</i>	42.2	
TM38	D	<50	TA	MO	II	<20	M+	<5	<i>AUKA</i>	41.0	<i>AUKA</i>	42.8	3.5
									<i>GAPDH</i>	42.0	<i>GAPDH</i>	42.0	
TM40	L	>50	TA	ND	II	<20	M-	<5	<i>AUKA</i>	45.7	<i>AUKA</i>	44.6	0.46
									<i>GAPDH</i>	42.0	<i>GAPDH</i>	42.0	

Anexo 5.

MUESTRA	TIPO	EDAD	SNP STK15	GRADO TUMORAL	ESTADÍO TUMORAL	KI-67	METASTASIS A GANGLIOS	TAMAÑO TUMORAL	GEN	CASO Cp	GEN	CONTROL Cp	EXPRESION RELATIVA
TM7	M	<50	TA	BI	II	ND	M+	<5	<i>AUKA</i>	30.6	<i>AUKA</i>	31.1	1.4
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.1	
TM20	D	<50	TT	BI	I	<20	M-	<2	<i>AUKA</i>	30.5	<i>AUKA</i>	31.1	1.5
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.1	
TM74	D	<50	AA	PO	III	>20	M+	>5	<i>AUKA</i>	31.3	<i>AUKA</i>	31.8	1.6
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	41.9	
TM79	D	>50	AA	ND	O	ND	ND	<2	<i>AUKA</i>	31.4	<i>AUKA</i>	31.8	1.3
									<i>GAPDH</i>	42.4	<i>GAPDH</i>	42.0	
TM30	D	>50	TA	BI	II	<20	M+	<2	<i>AUKA</i>	31.8	<i>AUKA</i>	31.4	-1.3
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.2	
TM29	ND	>50	TA	ND	I	ND	M-	<2	<i>AUKA</i>	30.8	<i>AUKA</i>	31.3	1.3
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.1	
TM97	MIM	>50	AA	PO	III	ND	M+	>5	<i>AUKA</i>	31.2	<i>AUKA</i>	29.8	-2.5
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.1	
TM112	MDL	>50	TA	MO	II	<20	M+	<2	<i>AUKA</i>	31.4	<i>AUKA</i>	31.6	1.2
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.2	
TM114	D	<50	AA	PO	III	ND	ND	<5	<i>AUKA</i>	31.6	<i>AUKA</i>	31.7	1.1
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.0	
TM130	D	<50	AA	MO	II	>20	M+	<5	<i>AUKA</i>	31.6	<i>AUKA</i>	32.1	1.3
									<i>GAPDH</i>	42.1	<i>GAPDH</i>	42.1	

Anexo 6

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AANAT	Aralkylamine N-acetyltransferase
AJUBA	Proteína Ajuba (“curiosidad”, del dialecto Indio Urdu)
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
<i>BMAL1</i>	Gen involucrado en el ciclo circadiano y regulación de melatonina (<i>Brain And Muscle ARNT-Like</i>)
B1-Cdk	Proteína que en los humanos está es codificada por el gen <i>CCNB1</i> y actúa como proteína reguladora en la mitosis
Bora	Proteína Bora
<i>BRCA1</i>	Gen de alta penetrancia relacionado con el desarrollo de cáncer de mama femenino (<i>Breast cancer gene 1</i>)
<i>BRCA2</i>	Gen de alta penetrancia relacionado con el desarrollo de cáncer de mama femenino (<i>Breast cancer gene 2</i>)
<i>CHECK2</i>	Gen involucrado en la progresión de la mitosis (<i>checkpoint kinase 2</i>)
CDC25B	Fosfatasa 2 inductora de fase mitótica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDTA-K3	Ácido etilendiaminotetraacético sal tripotásica
Eg5	<i>Kinesin-Related Motor Protein</i>
ERO/ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)

EXTAH	Complejo formado por proteínas: Eg5, XMAP215, Tpx2, Aurora A, and HURP
GAPDH	Gen que codifica para la proteína Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg (<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>)
HER2/NEU	Protooncogen que codifica para una glicoproteína con actividad tirosina quinasa
IARC	Agencia internacional para la investigación en cáncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
INCEP	Proteína centrómero Interior (complejo que actúa como un regulador clave de la mitosis)
PCR	Reacción en cadena de la Polimeraza (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PER1	Gen involucrado en los periodos del ciclo circadiano (<i>Period circadian clock 1</i>)
PER2	Gen involucrado en los periodos del ciclo circadiano (<i>Period circadian clock 2</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
RE	Receptores de estrógeno
RI	Radiación Ionizante
RP	Receptores de Progesterona
SBR	Sistema de clasificación <i>Scarff-Bloom Richardson</i> para estimación de grado o índice tumoral
SBRI	Grado tumoral I o bien diferenciado
SBRII	Grado tumoral II o moderadamente diferenciado

SBRIII	Grado tumoral III o pobremente diferenciado
SSB	Proteínas ligantes de ADN monocatenario (<i>single-stranded DNA binding proteins</i>)
STK15	Gen que codifica para la proteína Aurora Quinasa A
TPX-2	Proteína que localiza y se liga a la proteína Xklp2
UV	Rayos ultravioletas
VEGF	Gen que codifica para factores de angiogénesis (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)