

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CITOGÉNÉTICA DE PACIENTES CON
CÁNCER**



LUIS CARLOS SALAZAR ALVAREZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
BOGOTÁ, COLOMBIA
2013**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CITOGENÉTICA DE PACIENTES CON
CÁNCER**

LUIS CARLOS SALAZAR ALVAREZ

**INGRID SCHULER GARCÍA
DECANO ACADÉMICO**

**ANDREA PATRICIA FORERO RUIZ
DIRECTORA CARRERA DE BIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CITOGÉNÉTICA DE PACIENTES CON
CÁNCER**

LUIS CARLOS SALAZAR ALVAREZ

SANDRA RAMÍREZ CLAVIJO Ph.D
DIRECTOR

MARTHA BERMÚDEZ Ph.D
JURADO

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo No 23 de la resolución No 13 de 1946

1. RESUMEN

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizada por el aumento de la proliferación de una población celular como consecuencia de diferentes alteraciones, incluyendo mutaciones e inestabilidad genómica. Este grupo de patologías constituye un problema de salud pública debido al continuo incremento en la tasa de incidencia en los últimos años. Es muy importante realizar estudios que permitan conocer mejor los procesos biológicos alterados en cáncer. En el presente estudio se presenta un aporte a la identificación y valorización de biomarcadores de la enfermedad. Con el objetivo de determinar los niveles de expresión de los genes Her-2, LMO4 y mamoglobina y de identificar las anomalías cromosómicas en los grupos de individuos participantes en el estudio, se analizaron muestras de sangre periférica provenientes de pacientes con diferentes tipos de cáncer, tales como mama, colon, gástrico, pulmón, ovario y de un grupo de individuos sanos.

Los niveles de expresión génica se determinaron mediante la técnica de qPCR y las anomalías cromosómicas fueron analizadas mediante técnicas de citogenética convencional. Se encontró que la expresión de los genes Her-2 (40%) y mamoglobina (60%) se encuentra restringida al grupo de pacientes con cáncer de mama. Mientras que, la expresión del gen LMO4 se detectó tanto en el grupo de pacientes con cáncer de mama (65%) como en el grupo de individuos con otros tipos de cáncer (58%). En cuanto a las aberraciones cromosómicas, se identificaron tanto ganancias como pérdidas cromosómicas en una mayor frecuencia en los pacientes con cáncer en comparación con el grupo control de individuos sanos. A su vez se identificó la delección del brazo largo del cromosoma X como potencial biomarcador cromosómico para cáncer de mama.

La expresión de los genes y las aberraciones cromosómicas identificadas en sangre periférica, han sido reportadas anteriormente en tejido tumoral, en el presente estudio las identificamos en muestras de sangre, lo cual puede estar evidenciando la presencia de células tumorales circulantes en el torrente sanguíneo y que pueden ser objeto de análisis moleculares y citogenéticos para la identificación de nuevos biomarcadores en cáncer.

2. INTRODUCCION

El cáncer es un conjunto de enfermedades que representa un problema de salud pública y es ocasionado por un aumento de la tasa de proliferación celular, lo cual es resultado de la acumulación de mutaciones genéticas, que al producir inestabilidad genómica y presentarse un ambiente propicio, conducen al desarrollo de la patología.

En los últimos años, gracias a los avances en las tecnologías moleculares de alto rendimiento para investigación científica, se ha identificado un número significativo de posibles biomarcadores en cáncer, tanto genéticos, como cromosómicos y epigenéticos, los cuales pueden llegar a ser útiles como herramientas de diagnóstico y pronóstico. Antes de ello se deben realizar estudios para evaluar su especificidad y sensibilidad como biomarcadores para cada enfermedad.

En el presente estudio, se analizaron muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer (pulmón, colón, ovario, mama y gástrico) y de individuos sanos, con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de los genes Her-2, LMO4 y Mamoglobina mediante qPCR. A su vez se identificaron anomalías cromosómicas, poniendo especial atención a la identificación de monosomías del cromosoma X,6,7,9,17,19 y 22, poliploidías y endorreduplicaciones a partir de técnicas citogenéticas convencionales. Tanto las anomalías cromosómicas, como los mencionados, han sido postulados como potenciales biomarcadores para cáncer de mama, en estudios previos realizados por el grupo de investigación de ciencias básicas médicas de la Universidad del Rosario, sin embargo; no se han realizado análisis de estos marcadores en otros tipos de cáncer, con el fin de verificar su especificidad para cáncer de mama.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el aumento en la tasa de proliferación de las células en un tejido, producto de una transformación gradual conocida como carcinogénesis. A nivel mundial, en el 2008, esta enfermedad causó el 13% de todas las muertes en el mundo, según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En Colombia, datos suministrados por el ministerio de salud y protección social para el año 2009, indican que el cáncer causó el 17% de las muertes totales ocurridas en el país, con una tasa cruda de 72,6 por cada 100.000 habitantes para la población masculina y 73,3 por cada 100.000 en la población femenina. La incidencia de cáncer

de estómago, pulmón, próstata y colon rectal es mayor en la población adulta masculina, mientras que el cáncer de cuello uterino, mama, estómago y pulmón lo es para la población femenina.

Se ha comprobado que el cáncer es producto de una acumulación de múltiples mutaciones que imprimen al genoma una inestabilidad que aumenta el riesgo de transformación celular. Las regiones genómicas afectadas, pueden contener múltiples genes, cuya expresión o función puede cambiar como consecuencia de mutaciones. En el cáncer de mama, en los últimos años se han hecho avances significativos en la identificación de un número considerable de genes asociados a la enfermedad que han sido postulados como biomarcadores y cuya detección puede usarse como complemento de pruebas para el diagnóstico, pronóstico y respuesta a la terapia. Un ejemplo específico de estos avances, es la existencia de pruebas como la Mammaprint que evalúa la integridad de 70 genes diferentes para el diagnóstico de cáncer de mama. En estudios previos, realizados por el Grupo de Investigación Ciencias Básicas Médicas, en la Universidad del Rosario, se demostró una relación entre la expresión de los genes Her-2, LMO4 y mamoglobina y la presencia de cáncer de mama, los resultados aportaron pruebas de su potencial como biomarcadores de la presencia de la enfermedad. Sin embargo, se requiere más evidencia científica para establecer que estos genes son biomarcadores específicos de este tipo de cáncer, por lo que se decidió hacer parte de las pruebas realizadas en la Universidad del Rosario, en pacientes con otros tipos de cáncer.

Por otra parte, el mismo grupo también reportó la existencia de potenciales biomarcadores cromosómicos para cáncer de mama, a partir de análisis citogenéticos convencionales. Los hallazgos muestran la presencia de monosomías de los cromosomas X, 6,7,8,9,17,19 y 22, poliploidías y endoreduplicación (Carrillo, 2012). Sin embargo, al igual que los genes propuestos como biomarcadores, los resultados del estudio citogenético deben ser evaluados para otros tipos de cáncer. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en el presente estudio se determinó la expresión de los genes Her-2, LMO4 y mamoglobina y se describió las aberraciones cromosómicas en muestras de sangre, en tres grupos de estudio: pacientes con cáncer de mama, pacientes con otros tipos de cáncer diferente a mama e individuos sanos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 El Cáncer

El cáncer representa más de cien enfermedades distintas entre sí, las cuales se catalogan entre las enfermedades genéticas, caracterizada por alteraciones en el genoma que conllevan a una proliferación de tipo clonal (pero con la posibilidad de que se generen múltiples clones), y a una transformación morfológica y fisiológica de las células (Posso Hector, 2004; Wallace, 2012). El cáncer no es el resultado de una sola mutación, sino que surge de la acumulación de varias mutaciones lo que se conoce como “multi-hit”, las células transformadas tienen la capacidad de transferir la enfermedad a nuevas generaciones de células (Hanahan & Weinberg, 2011; Yates & Campbell, 2012).

4.2 Epidemiología

El número de casos de cáncer aumenta continuamente a nivel mundial, con especial prevalencia en adultos mayores. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es una de las enfermedades no transmisibles que recarga los sistemas de salud de los países en desarrollo, ésta misma organización prevé que para 2020, el 60% de todos los casos de cáncer se producirán en los países en vía de desarrollo (Kachroo & Etzel, 2009). En Europa la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), calcula que para el 2030, la carga global del cáncer llegará a 21,4 millones de casos con un número anual de muertes por estas patologías de aproximadamente 13,2 millones en todo el mundo, sin embargo, estas estimaciones son basadas en un crecimiento poblacional sin cambio alguno según el estudio GLOBOCAN 2008. Es probable que esta cifra se vea afectada por cambios en el estilo de vida de los individuos en los países en vía de desarrollo, que pudieran afectar la carga por cáncer en los próximos años (Ferlay et al., 2010; Gyorki, Muyco, Kushner, Brennan, & Kingham, 2012).

Por otro lado, la Sociedad Americana del Cáncer, para el año 2009 reportó una menor incidencia de los cuatro cánceres más comunes (mama, próstata, pulmón, colon y recto) en la población hispana en comparación con la población blanca americana. Mientras que, para la misma fecha, en la población hispana se observó una mayor tasa de incidencia y mortalidad para cáncer de estómago, hígado, cuello uterino y vesícula biliar, lo que podría estar relacionado con una mayor exposición de esta población a agentes cancerígenos

infecciosos. Además, son muchos los estudios que describen una relación de estas patologías con el estilo de vida y hábitos de alimentación y su combinación con factores genéticos presentes en la población hispana (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2012a, 2012b). Los datos suministrados por las diferentes entidades encargadas del estudio epidemiológico del cáncer, muestran que se trata de un problema de salud pública, lo que genera la imperiosa necesidad de crear estrategias con el objetivo de reducir el riesgo de desarrollar cáncer. Adicionalmente la realización de estudios en esta área, aportarán valiosa información que contribuya a mejorar las técnicas de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad y que además aporten información para la planificación y evaluación de programas contra el cáncer a nivel mundial (Ferlay et al., 2010; Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2001).

En Colombia, el cáncer también representa un problema de salud pública que se encuentra en crecimiento, según el ministerio de salud y protección social, para el 2009 se registraron 32.815 defunciones por cáncer, lo que representa el 17% del total de las muertes en el país, de éstas, 16.113 fueron hombres y 16.702 mujeres, lo que corresponde a una tasa de mortalidad de 72,6 por 100.000 habitantes y 73,3 por 100.000, respectivamente (Pineros, Hernández, & Bray, 2004). En adultos, los tipos de cáncer que más afectan a la población masculina son el cáncer de estómago, pulmón, próstata y colon y recto; mientras que en mujeres son: el cáncer de cuello uterino, mama, estómago y pulmón. Además, la tasa de mortalidad de estas patologías se encuentran en incremento, con un comportamiento similar para ambos sexos (Pineros, Ferlay, & Murillo, 2006).

4.3 Factores de riesgo en Cáncer

El cáncer es una enfermedad compleja y multifactorial, por lo que participan tanto factores genéticos como ambientales en su desarrollo (Latham, Sapienza, & Engel, 2012; Yates & Campbell, 2012). Los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, debido a que existen sustancias químicas, agentes biológicos o físicos que dañan el material genético y afectan el buen funcionamiento celular (Ramel, 1992). Estos factores pueden tener un peso diferencial en el momento de contribuir al desarrollo del cáncer, por ejemplo la dieta (consumo de carnes rojas, embutidos) es el factor con el mayor porcentaje atribuible al desarrollo de cáncer, seguido del consumo de cigarrillo, infecciones

(*Helicobacter Pylori*, virus del papiloma, etc), exposición aumentada a radiación solar, consumo de alcohol, exposición ocupacional a sustancias nocivas, exposición a radiación ionizante, contaminantes ambientales y consumo de algunos medicamentos.

El aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad por cáncer en los países en desarrollo, puede ser explicado por cambios culturales de los habitantes de estas regiones, debido a las altas tasas de migración de las zonas rurales hacia los centros urbanos, lo que influye en la modificación de hábitos alimenticios, de exposición a contaminantes ambientales y cambios en las relaciones sociales (Farmer et al., 2010; Haile et al., 2012).

Se ha demostrado que cada tipo de cáncer puede ser causado por factores de riesgo externos particulares, por ejemplo para el cáncer de pulmón el consumo de cigarrillo es el factor externo más relevante asociado al desarrollo de dicha patología, también se caracteriza por afectar en mayor proporción a los hombres que a las mujeres, aunque el reciente aumento del consumo de cigarrillo por parte del género femenino también ha elevado la tasa de incidencia de esta enfermedad en las mujeres (de Groot & Munden, 2012). Por otra parte, se ha puesto en evidencia que la dieta juega un papel importante en el desarrollo de cáncer gástrico (alto consumo de carnes rojas, lácteo, embutido). El cáncer de próstata se ha asociado con alto consumo de carnes rojas, lácteos y embutidos (Niclis, Diaz Mdel, Eynard, Roman, & La Vecchia, 2012). En cáncer de mama, la ingesta de bebidas alcohólicas se ha identificado como factor de riesgo externo asociado a la enfermedad, ya que estos productos contienen acetaldehído, conocido agente carcinógeno (Blot, 1999). Además agentes infecciosos también pueden contribuir al desarrollo de cáncer por ejemplo la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (Correa, 2003; Zhao et al., 2011) aumenta el riesgo a desarrollar cáncer gástrico.

Finalmente se sabe que para todos los tipos de cáncer, la edad juega un papel importante como factor de riesgo, a mayor edad existe un aumento en la probabilidad de desarrollar cáncer. Teniendo en cuenta estos factores de riesgo, se hace inminente la generación de estudios sobre los hábitos de vida, para que junto con estudios genéticos que identifiquen estados de susceptibilidad se propongan estrategias que tengan como objetivo prevenir el desarrollo de la enfermedad y reducir las tasas de incidencia y mortalidad del cáncer (Lazcano-Ponce & Hernandez-Avila, 1997; Wild, Scalbert, & Herceg, 2013).

4.4 Biomarcadores en Cáncer

El término biomarcador es usado por el Instituto Nacional de Salud de E.U (INH), para definir “Una característica que puede ser objetivamente medible y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutico o intervención de la salud” (Atkinson Arthur, 2001). En la actualidad los estudios moleculares del cáncer se encuentran direccionados hacia la búsqueda de biomarcadores específicos para cada patología que puedan ser usados en el diagnóstico, seguimiento, pronóstico y como blancos terapéuticos, además de convertirse en una herramienta para la medicina personalizada (Cho, Jeon, & Kim, 2012).

Aunque los biomarcadores se han descrito desde hace muchos años, gracias al desarrollo tecnológico y creación de técnicas moleculares que soportan el desarrollo de las ciencias ómicas (genómica, proteómica, metabolómica y epigenómica), nuevos biomarcadores se han identificado, y se ha avanzado rápidamente en la mejor comprensión de los procesos patológicos de una manera sistémica (Chiam, Ricciardelli, & Bianco-Miotto, 2012).

En cáncer de mama, el biomarcador clásico es HER-2, cuyo gen se encuentra amplificado en algunos tumores. La determinación de dicha modificación constituye un criterio para prescribir el tratamiento contra la enfermedad. En la Universidad del Rosario, se han realizado estudios para validar la expresión de los genes HER-2, Mamoglobina y LMO4 como posibles biomarcadores de cáncer de mama. Estudios realizados por otros autores incluyen análisis para el gen Ki67 entre otros (Dowsett & Dunbier, 2008).

Por otra parte, se sabe de la presencia de Células Tumorales Circulantes (CTC) en sangre, las cuales se diseminan desde la zona del tumor vía torrente sanguíneo o linfa hacia otros tejidos. Se caracterizan por ser mononucleadas y carecer del marcador de membrana CD45 (Swaby & Cristofanilli, 2011). El estudio de dichas células es una fuente invaluable para la identificación de biomarcadores obteniendo muestras biológicas mediante métodos poco invasivos.

4.5 Genes Implicados en Cáncer

Las mutaciones que ocurren en el genoma de una célula, y cuya acumulación puede promover el desarrollo de una lesión cancerosa son de tres tipos: deleciones, sustituciones y adiciones (Meza-Junco, Montaña-Loza, & Aguayo-González, 2006). Muchas de ellas ocurren en genes que regulan la muerte y la proliferación celular, tales como supresores de tumor y proto-oncogenes. En el primer grupo Rb y P53, son los más frecuentemente mutados en cáncer. El gen Rb fue identificado por Knudson a partir de su trabajo sobre el retinoblastoma familiar y esporádico, hoy se sabe que su función está alterada en cáncer de mama, próstata, pulmón y algunas neoplasias hematopoyéticas (Indovina, Marcelli, Casini, Rizzo, & Giordano, 2013). Adicionalmente el gen p53 se ha encontrado asociado al desarrollo de cáncer de mama, próstata, pulmón y cerebro al ocurrir una pérdida de su función (Meza-Junco et al., 2006; Vogelstein & Kinzler, 1993).

Los proto-oncogenes participan en muchos eventos celulares y particularmente en proliferación y diferenciación, la versión mutada de estos genes se conoce como oncogenes. Algunos codifican para factores de crecimiento, tales como erb-B1, erbB-2, met, c-gmf, kit, trk, ret entre otros. El grupo más grande de oncogenes está conformado por reguladores transcripcionales, como por ejemplo: erbA-1, erbA-2, ets-1, ets-2, fos, jun, myb, c-myc, L-myc, N-myc, rel, ski, HOX11, Lym-10, lym-1, Tal-1, E2A, PBX1, RARa, rhombotin/Ttg-1, rhom-2/Ttg-2. La expresión de gran parte de los proto-oncogenes es regulada por señales que inducen proliferación o diferenciación celular (Hernández & Hernández, 2001).

4.5.1 Gen Her-2

El gen Her-2 también conocido como ErbB2, c-erbB2 o HER-2/neu se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 17 en la región 11.2-12, está constituido por 27 exones y su tamaño es de 4.625 pb. (Tai, Mahato, & Cheng, 2010). Este gen codifica para una proteína de 18KDa, es un receptor de membrana para factores de crecimiento y pertenece a la familia de receptores de factor de crecimiento epidermal (EGFR) o familia HER. La proteína HER-2 está formada por un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa y un dominio extracelular de unión al ligando. HER-2 promueve el crecimiento, la

diferenciación y es fundamental para la supervivencia celular. La principal vía de señalización mediada por HER-2 involucra la activación de la MAPK (mitogen-activated protein kinase 1) y PI3K (phosphoinositide-3-kinase) (Ross et al., 2009). La amplificación del gen y/o sobre-expresión de su proteína puede inducir la transformación celular maligna, incluso otros estudios, han mostrado que la amplificación está asociada con un pobre pronóstico clínico en cáncer de mama, próstata, gástrico, ovario y otros. Lo que, aumenta el interés en usarlo como biomarcador de pronóstico de la enfermedad (Gutierrez & Schiff, 2011; Tai et al., 2010).

4.5.2 Gen LMO4

El gen LMO4 se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 11 (11p22.3), está conformado por 20.456 pb, codifica para una proteína de 17KDa. Este gen es miembro de la familia LMO, y es un factor de transcripción, que actúa como adaptador en el ensamble de complejos multiproteicos de unión al ADN (Murphy et al., 2008). LMO4 regula el ciclo celular, particularmente en el paso de la fase G2/M. Finalmente, estudios de asociación en cáncer de mama, han mostrado que la sobreexpresión del gen LMO4 se asocia con una pobre supervivencia (Montanez-Wiscovich et al., 2009; Visvader et al., 2001). A partir de esta evidencia se postula este gen como potencial biomarcador de mal pronóstico en cáncer de mama.

4.5.3 Gen Mamoglobina

El gen de la mamoglobina se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 11 (11q12.2), está conformado por 4.500 pb y codifica para una proteína de 93 aminoácidos con un peso molecular de 8.48 KDa, es miembro de la familia de las secretoglobinas, aunque su función no está claramente definida se relaciona con la generación de complejos proteicos que participan en la regulación del metabolismo de los esteroides y algunas funciones inmunes (Galvis-Jimenez, Curtidor, Patarroyo, Monterrey, & Ramirez-Clavijo, 2013). Esta proteína es considerada como un marcador específico de tejido mamario. Estudios de análisis de expresión del gen mamoglobina pone en evidencia un aumento en los niveles de la proteína tanto en tejido tumoral como en suero. Varios autores han postulado este gen como potencial biomarcador de diagnóstico temprano y

pronóstico del cáncer de mama (Menelaos Zafrakas & Glen Kristiansen, 2006; Ntoulia et al., 2006).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar el perfil de expresión de los genes Her-2, LMO4 y mamoglobina y la presencia de aberraciones cromosómicas en sangre periférica de un grupo de pacientes con cáncer.

5.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar si hay expresión de los genes Her-2, LMO4 y mamoglobina en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer.
- ✓ Identificar la presencia y frecuencia de anomalías cromosómicas en muestras de sangre periférica en un grupo de pacientes con cáncer

6. METODOLOGÍA

6.1 Muestra Poblacional

Los pacientes fueron contactados en el hospital Mayor Méderi en la ciudad de Bogotá, en los departamentos de oncología y la unidad de extensión hospitalaria y una vez se confirmó que cumplían con los criterios de inclusión para la vinculación al proyecto, se les explicó los objetivos y alcances de la investigación. Previa firma del consentimiento informado, se procedió a la toma de las muestra de sangre por venopunción, haciendo uso del mismo catéter que los pacientes tenían para la administración del medicamento. Se tomó muestras de sangre periférica en tubo con EDTA (3 ml c/u) para la extracción de ARN, el cual fue usado para los análisis moleculares; a su vez también se tomó una muestra de sangre en tubo con heparina para la obtención del cultivo celular y posterior análisis citogenético.

El grupo de casos estuvo conformado por 20 pacientes con cáncer de mama y 19 pacientes con otros tipos de cáncer, éste último estuvo constituido de la siguiente manera: cinco individuos con cáncer de pulmón, cinco con cáncer de colon, cinco con cáncer de ovario y cuatro con cáncer gástrico. Finalmente el grupo control estuvo conformado por 20 individuos sanos que aceptaron voluntariamente participar en el estudio.

6.1.1 Definición de casos y controles

Casos: Individuos con diagnóstico de cáncer confirmado

Controles: Individuos sanos sin antecedentes familiares de cualquier tipo de cáncer.

6.1.1.1 Criterios de Inclusión

Grupo de Casos:

- ✓ Individuos mayores de 18 años o más que desearon voluntariamente participar en el estudio.
- ✓ Individuos con diagnóstico clínico confirmado de cáncer
- ✓ Firma del consentimiento informado.

Grupo de Controles:

- ✓ Individuos mayores de 18 años o más que desearon participar voluntariamente en el estudio.
- ✓ No presentar ni haber presentado cáncer.
- ✓ Firma del consentimiento informado (ANEXO 1).

6.1.1.2 Criterios de Exclusión

Grupo Casos

- ✓ Individuos con tumores benignos.
- ✓ Individuos menores de 18 años.

Grupo Control

- ✓ Personas menores de 18 años

6.2 Obtención de datos

Los datos demográficos fueron obtenidos a partir de la realización de encuestas con el objetivo de obtener la información socioeconómica, clinicopatológica y de tratamiento de la enfermedad (ANEXO 2).

6.3 Análisis Estadístico

El presente trabajo, se caracterizó por ser un estudio piloto descriptivo de casos y controles, en dónde se describe si hubo expresión o no de los genes a estudiar y las frecuencias de las aberraciones cromosómicas identificadas. Para analizar si existían diferencias en la expresión de los genes Her-2, LMO4 y mamoglobina se aplicó la prueba de chi-cuadrado por medio del paquete estadístico SPSS versión 19.

6.4 Determinación de niveles de expresión génica

✓ Extracción de ARN a partir de sangre periférica

La extracción de ARN total se realizó a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas por gradiente de Ficoll, el aislamiento del ARN se realizó mediante el uso de Trizol-Cloroformo (Invitrogen); posterior precipitación con Isopropanol frío y realización de tres lavados con etanol al 75%, finalmente las muestras se resuspendieron en agua DEPC libre de RNasas, siguiendo las especificaciones del fabricante.

✓ Análisis de expresión génica por qRT-PCR

La determinación de la expresión génica de Her-2, LMO4 y Mamoglobina se realizó mediante la retrotranscripción del ARNm aislado, utilizando la SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), la obtención del ADNc y posterior amplificación por PCR. La PCR se llevó a cabo en un equipo de tiempo real Opticon II MJ Research, haciendo uso del fluorocromo SYBR Green ITM (Invitrogen) y los primers específicos para los genes HER-2, LMO4 y Mamoglobina. Se usaron los genes housekeeping GAPDH y 36B4. En la tabla 1 se presentan las secuencias de los primers utilizados.

Tabla 1. Secuencia de los primer para medir la expresión de los genes mamoglobina, Her-2, LMO4, GAPDH y 36B4

PRIMER	DIRECCION	SECUENCIA
MAG2-F	Sentido	5' TGGCTGCCCTTATTGGA 3'
MAG2-R	Antisentido	5' GCATTTGTAGTGGCATTGTCTG 3'
HER-2-F	Sentido	5' TGCTGGAGGACGATGACATG 3'
HER-2-R	Antisentido	5' CTGGACAGAAGAAGCCCTGC 3'
GAPDH-F	Sentido	5' GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG 3'
GAPDH-R	Antisentido	5' TGAGCCCCAGCCTTCTCCAT 3'
LMO4-F	Sentido	5' GGACCGCTTTCTGCTCTATG 3'
LMO4-R	Antisentido	5' AAGGATCATGCCACTTTTGG3'
36B4-F	Sentido	5' CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA3'
36B4-R	Antisentido	5' CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC 3'

Todas las reacciones de PCR se realizaron bajo las mismas condiciones de concentración de los reactivos (Tabla 2) y programa de amplificación (Tabla 3). La temperatura de anillaje para cada par de primer se estandarizó tomando como referencia los TM sugeridos por la compañía proveedora.

Tabla 2. Concentración de reactivos para PCR cuantitativa.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN FINAL
SYBR Green Master Mix	1X	10 ul
RoxDye	0.5 uM	0,5 ul
Primer Forward	1 uM	1 ul
Primer Reverse	1 uM	1 ul
Agua	-----	5,5 ul

Tabla 3. Programa para las reacciones de amplificación

PASO	PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Incubación UDG	50°C	3 min
2	Denaturación Inicial	94°C	10 min
3	Denaturación Parcial	95°C	15 seg
4	Anillaje de primers		40 seg
5	Extensión	72°C	30 seg
6	Repetir del paso 3 por 29 veces		
7	Extensión Final	72°C	5 min
8	Análisis de Melting Curve entre 50°C y 100°C		

El análisis descriptivo de las pruebas moleculares se realizó considerando los siguientes parámetros:

- ✓ CT obtenidos durante la RT-PCR para cada gen analizado tanto en pacientes como en controles.

6.5 Identificación de Aberraciones cromosómicas

- ✓ **Cultivos celulares**

Un volumen de 300µl de sangre fue sembrado en 4 ml de PB-MAX (PB-MAX-Karyotyping Medium. Invitrogen), los tubos se incubaron por 72 horas a 37°C y en presencia 5% de CO₂.

✓ **Procesamiento del Cultivo**

Después de 72 horas de incubación, se agregó 100 µl de colchicina a cada tubo, luego se incubó por 20 minutos a 37°C en presencia 5% de CO₂. Posteriormente se centrifugó a 2.500 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, se homogenizó el botón celular y se agregó 6 ml de solución hipotónica (cloruro de potasio KCL al 0.075 M), se mezcló 30 veces con pipeta pasteur estéril y se incubó por 20 minutos a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Luego se agregó 2 ml de solución de carnoy o fijador (3:1, 3 ml de metanol y 1 ml de ácido acético glacial) conservado a -20°C, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se mezcló por inmersión, luego se centrifugó a 2.500 rpm por 10 minutos. Al cabo de este tiempo se descartó el sobrenadante y se homogenizó el botón celular, se agregó 6 ml de fijador frío y se mezcló con pipeta pasteur 20 veces. Se llevó a -20°C por 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 2.500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se homogenizó el botón celular, se agregaron 3 ml de fijador frío y se centrifugó nuevamente a 2.500 rpm por 10 minutos, este último paso se repitió dos veces. El botón celular obtenido se resuspendió en 800 µl de Fijador, luego se goteó sobre las láminas a una altura de 1.6 m para su posterior tinción con Wright y obtención de bandas G.

✓ **Coloración de Bandas G**

Las láminas extendidas fueron incubadas por 24 horas a temperatura ambiente, luego se incubaron a 80°C por una hora, posteriormente se colocaron en solución 1XSSC por 10 minutos a 60°C, finalmente se lavó con abundante agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego las láminas fueron teñidas con 2 ml de colorante Wright (MERCK) e incubadas por 10 min a temperatura ambiente, pasado este tiempo las láminas fueron lavadas con abundante agua y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las láminas fueron observadas al microscopio y se procedió a examinar 25 metafases, el reporte de los hallazgos se hizo de acuerdo a la nomenclatura del ISCN (Internacional System for human Cytogenetic Nomenclature).

Las aberraciones cromosómicas fueron registradas en un formato, en el que se coloca el número de metafases leídas, el código del paciente, el tipo de anomalía identificada de acuerdo a la nomenclatura del ISCN.

Para el análisis descriptivo de las aberraciones cromosómicas, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros.

- ✓ Anomalías numéricas encontradas de acuerdo con la frecuencia que aparecieron.
- ✓ Anomalías estructurales encontradas de acuerdo con la frecuencia que aparecieron.
- ✓ Fragilidades y roturas encontradas de acuerdo con las frecuencias de las mismas, así como de los cromosomas afectados.

7. RESULTADOS

Los pacientes fueron contactados entre los meses de Febrero y Mayo de 2013 en el departamento de oncología y la unidad de extensión hospitalario del hospital Mayor Méderi en la ciudad de Bogotá. Las muestras de los controles fueron aportadas voluntariamente por el personal del área de oncología del hospital Méderi.

7.1 GRUPO DE PACIENTES

Se analizaron 20 muestras de mujeres con cáncer de mama, mujeres entre 19 y 70 años de edad (55,45 +/- 12.60). Entre el grupo de pacientes con cáncer de mama 18 pacientes tuvieron carcinoma ductal infiltrante, un paciente presentó diagnóstico de cistisarcoma philloide y un paciente tuvo carcinoma in situ (5%) Tabla 4.

Tabla 4. Características clínico patológicas de los pacientes con cáncer de mama.

CÓDIGO	EDAD	DIAGNÓSTICO	ESTADIO
BIOM 40	50	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 41	49	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 42	45	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 43	50	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 44	61	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 45	19	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 46	48	Carcinoma ductal Infiltrante	III

BIOM 47	47	Carcinoma ductal in situ	I
BIOM 49	42	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 50	64	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 51	51	Cistisarcoma Philloides	II
BIOM 52	69	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 53	66	Carcinoma ductal Infiltrante	II/III
BIOM 55	70	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 56	66	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 57	66	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 58	55	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 59	68	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 61	68	Carcinoma ductal Infiltrante	III
BIOM 62	55	Carcinoma ductal Infiltrante	II

Por otra parte se analizaron muestras de 19 individuos con diferentes tipos cáncer, este grupo estuvo conformado por: cinco pacientes con cáncer de colon, cuatro pacientes con cáncer gástrico, cinco pacientes con cáncer de pulmón y cinco pacientes con cáncer de ovario. La edad de los pacientes de este grupo estuvo entre 36 y 80 años (63,5 +/- 10,23).

Tabla 5.

Tabla 5. Características clinicopatológicas de los pacientes con diferentes tipos de cáncer.

CÓDIGO	EDAD	DIAGNÓSTICO	ESTADIO
BIOMCO 07	80	Adenocarcinoma de Colón	Ila
BIOMCO 18	78	Adenocarcinoma de patrón clásico	IV
BIOMCO 19	68	Adenocarcinoma de Colon	IV
BIOMCO 41	62	Adenocarcinoma de Colon	IV
BIOMCO 22	75	Adenocarcinoma de Colón	IV
BIOMCO 32	62	Adenocarcinoma pulmonar	IV
BIOMCO 35	55	Adenocarcinoma pulmonar	IV
BIOMCO 15	59	Adenocarcinoma pulmonar	IV
BIOMCO 4	59	Adenocarcinoma pulmonar	sin dato
BIOMCO 2	70	Adenocarcinoma pulmonar	sin dato
BIOMCO 01	56	Cistoadenocarcinoma micropapilar	III
BIOMCO 10	77	Carcinoma de Ovario	sin dato
BIOMCO 34	63	Carcinoma de Ovario	sin dato
BIOMCO 36	63	Carcinoma de Ovario	sin dato
BIOMCO 31	36	Carcinoma de Ovario	sin dato
BIOMCO 42	56	Cáncer Gástricos	IV
BIOMCO 16	66	Neoplasia Gástrica Bormann 4/Adenocarcinoma difuso	IV
BIOMCO 28	64	Adenocarcinoma vesicular	II
BIOMCO 40	58	Cáncer Gástrico	sin dato

7.2 GRUPO CONTROL

El grupo control estuvo constituido por 20 individuos sanos entre los 28 y 75 de edad (48,9 +/-11,27), a los cuales se les realizaron análisis de expresión génica y citogenética en muestras de sangre periférica.

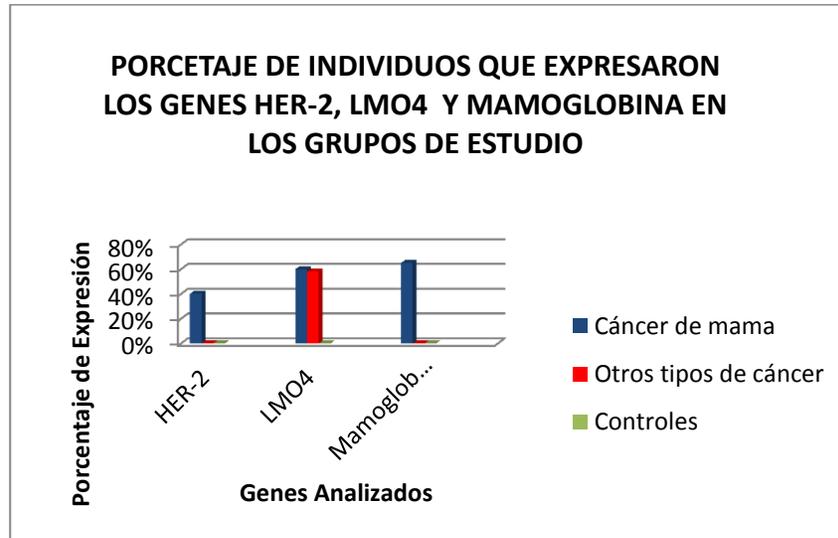
7.3 EVALUACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES HER-2, LMO4 Y MAMOGLOBINA

La frecuencia de expresión de los genes en los pacientes con cáncer de mama fue: 40% expresó Her-2, 60% LMO4 y 65% mamoglobina. En el grupo de pacientes con otros tipos de cáncer, el 58% de los individuos expresó LMO4, ninguno expresó Her-2 ni mamoglobina. En el grupo control, no se detectó expresión de los genes analizados. (Tabla 6, Figura 1).

Tabla 6. Porcentaje de expresión génica en los grupos de individuos analizados.

GEN	Cáncer de mama	Otros tipos de cáncer	Controles
HER-2	40%	0%	0%
LMO4	60%	58%	0%
Mamoglobina	65%	0%	0%

Figura 1. Comparación de los porcentajes de expresión génica entre los grupos de individuos estudiados



El análisis de expresión entre grupos, de los genes Her-2, LMO4 y mamoglobina se realizó mediante prueba de chi-cuadrado por medio del paquete estadístico SPSS versión 19. Para la realización de este análisis se plantearon varias hipótesis:

Cáncer de mama vs otros tipos de cáncer

H0= No hay diferencia en la expresión de los genes Her-2, mamoglobina y LMO4 entre individuos con cáncer de mama e individuos con otros tipos de cáncer.

H1= Existe diferencia en la expresión de los genes Her-2, mamoglobina y LMO4 entre individuos con cáncer de mama e individuos con otros tipos de cáncer.

La aplicación de la prueba chi-cuadrado, arrojó un valor de $p=0,002$ para la expresión de Her-2, un valor de $p=0,000$ para la expresión de mamoglobina y un valor de $p=0,894$ para LMO4. Esto indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de los genes Her-2 y Mamoglobina entre el grupo de pacientes con cáncer de mama con respecto al grupo de pacientes con otros tipos de cáncer ($p\leq 0,05$). No se evidencia diferencias en la expresión de LMO4 para los grupos evaluados.

Cáncer de mama vs controles sin cáncer

H₀= No hay diferencia en la expresión de los genes Her-2, mamoglobina y LMO4 entre individuos con cáncer de mama y el grupo control.

H₁= Existe diferencia en la expresión de los genes Her-2, mamoglobina y LMO4 entre individuos con cáncer de mama y el grupo control.

La prueba de chi-cuadrado, arrojó un valor de $p=0,002$ para la expresión de Her-2, un valor de $p=0,000$ para la expresión de mamoglobina y LMO4. Lo que indica que existe diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con cáncer de mama con respecto al grupo control ($p\leq 0,05$).

Otros tipos de cáncer vs controles sin cáncer

H₀= No hay diferencia en la expresión del gen LMO4 entre individuos con otros tipos de cáncer y el grupo control.

H₁= Existe diferencia en la expresión del LMO4 entre individuos con otros tipos de cáncer y el grupo control.

La prueba de chi-cuadrado, arrojó un valor $p=0,00$. Indicando de esta manera que existen diferencias significativas entre el grupo con otros tipos de cáncer respecto al grupo control ($p\leq 0,05$).

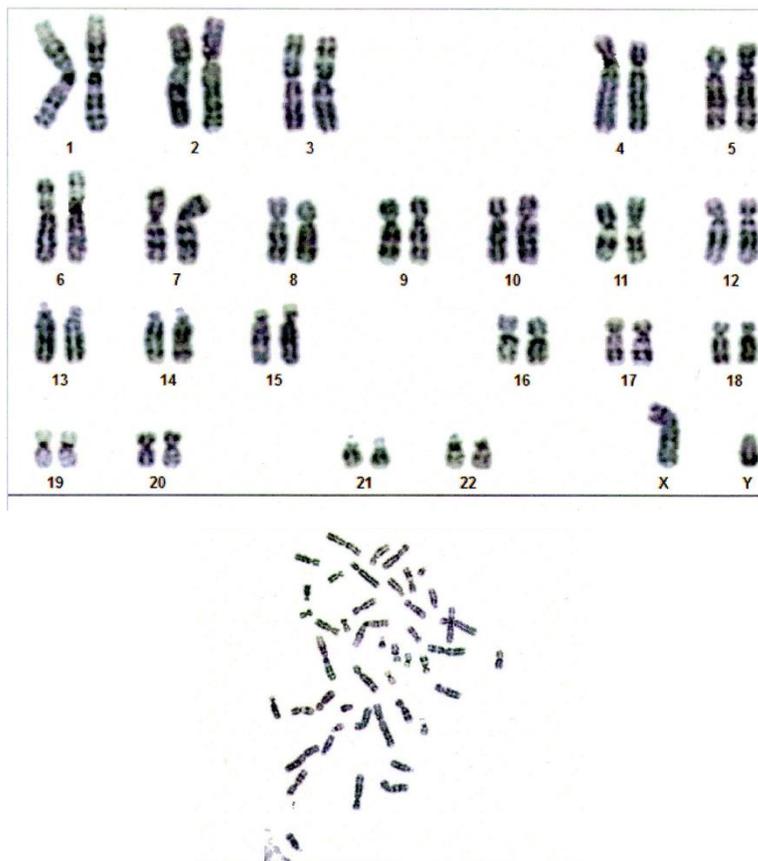
7.4 ESTUDIO DE LAS ANOMALIAS CROMOSÓMICAS

El análisis citogenético fue trabajado bajo los parámetros establecidos por el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), basados en el American College Medical Genetics. Los cuales recomiendan leer entre 25 a 30 metafases por paciente. En el presente estudio se realizó la lectura de 25 metafases por cada individuo, y cuando hubo más de tres pérdidas o

dos ganancias del mismo cromosoma la lectura fue ampliada a 100 metafases, en seguimiento a lo establecido por el sistema Internacional de nomenclatura citogenética (ISCN) 2009 en el capítulo de neoplasias.

En todos los grupos de estudio, la mayoría de metafases tuvieron un cariotipo normal (46; XX) (Figura 2). En el grupo de los casos tanto de pacientes con cáncer de mama como el grupo conformado por los pacientes con cuatro de tipos de cáncer distintos, se observó la presencia de alteraciones numéricas (pérdidas y ganancias), estructurales y la presencia de fragilidades en 975 metafases analizadas. En el grupo control se analizaron 500 metafases, y se encontró solo alteraciones numéricas (pérdidas y ganancias), y un individuo presentó los dos eventos (pérdidas y ganancias).

Figura 2. Cariotipo cromosómico masculino normal



Representación esquemática de cariotipo y metafase masculino normal (46; XY)

✓ Ganancias de cromosomas

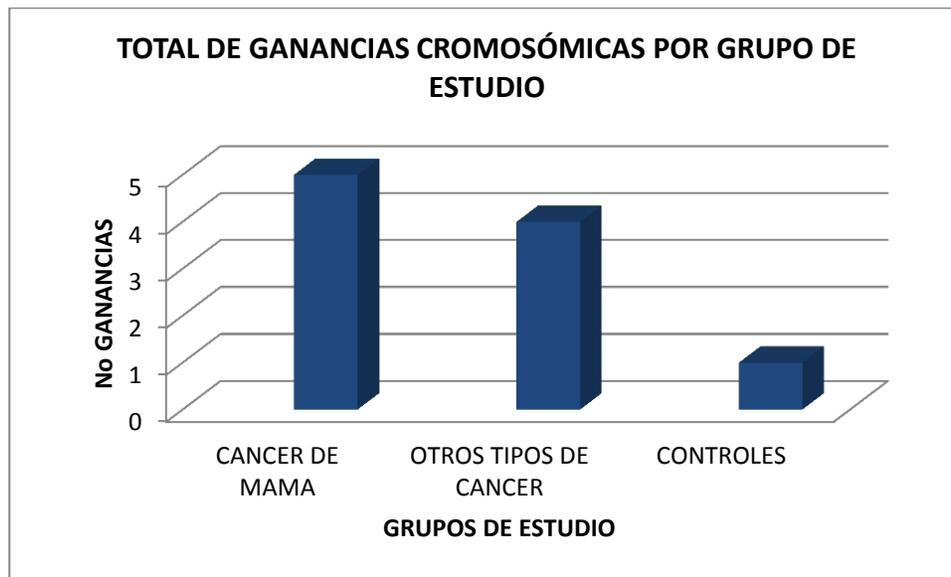
Se encontró un total de cinco metafases con ganancias en cinco pacientes diferentes con cáncer de mama, estas fueron: ganancia del cromosoma 22 (47, XX,+22), ganancia del cromosoma 18 (47, XX,+18), ganancia del cromosoma 5 (47, XX,+5), ganancia del cromosoma 20 (47, XX+20 y también se identificó la ganancia de un cromosoma marcador extra (47,XX,+mar).

En cuanto al grupo de individuos con cáncer de pulmón, colon, gástrico y ovario, se encontró en tres individuos diferentes un total de cuatro metafases con ganancias, estas ganancias correspondían a: presencia de un cromosoma marcador extra (47, XX, +mar), ganancia del cromosoma 9 (47, XY, +9) ganancia del cromosoma 12 (47,XY, +12) y también ganancia de los cromosomas 5 y 8 y un cromosoma marcador (47,XX,+5,+8,+mar) en un paciente. En la Tabla 7 y la figura 3 se muestra los hallazgos en los tres grupos de estudio.

Tabla 7. Ganancia de cromosomas en los grupos de estudio.

ANOMALÍA	CÁNCER DE MAMA	OTROS TIPOS DE CÁNCER	CONTROLES
47,XX,+22	1	0	0
47,XX,+18	1	0	0
47,XX,+5	1	0	0
47,XX,+mar	1	1	0
47,XX,+20	1	0	0
47,XX,+5,+8,+mar	0	1	0
47,XY, +9	0	1	0
47, XX.+12	0	1	0
47,XXX	0	0	1
TOTAL	5	4	1

Figura 3. Ganancia de cromosomas por grupo de estudio



✓ Pérdidas de cromosomas

En el grupo de individuos con cáncer de mama se identificó un total de 32 metafases con monosomías, entre ellas fueron más frecuentes: la pérdida del cromosoma 21 y 22 (44,XX,-21,-22) observada en cuatro pacientes, seguido de la pérdida del cromosoma 15 (45,XX,-15) en tres pacientes y la pérdida de los cromosomas 9 (45,XX-9), 20 (45,XX,-20), 1 (45,XX,-1) y 6 (45,XX,-6) en dos pacientes.

En el grupo de pacientes con cáncer de pulmón, colon, gástrico y ovario, se identificaron 24 metafases con pérdidas, la más frecuente fue la pérdida del cromosoma 22 (45,XX,-22) identificada en tres pacientes, seguido de la pérdida del cromosoma 15 (45,XX,-15) identificada en tres pacientes. En la figura 4 y la tabla 8 se muestra la comparación entre los grupos de casos y controles.

Tabla 8. Pérdidas de cromosomas en los grupos de estudio

ANOMALÍAS	CÁNCER DE MAMA	OTROS TIPOS DE CÁNCER	CONTROLES
45,XX,-10	2	0	0
45,XX,-1	2	0	0
45,XX,-6	2	1	0
45,XX,-20	2	1	0
45,XX,-15	3	2	0
44,XX,-21,-22	4	0	1
45,X	1	3	0
45,XX,-22	0	3	1
45,XX,-9	1	1	1
45,XX,-21	1	0	0
45,XX,-2	1	0	1
45,XX,-7	1	1	0
44,XX,-20,-22	1	0	0
45,XX,-8	1	1	0
44,XX,-15-18	1	0	0
45,XX,-5	1	1	0
44,XX,-11,-13	1	0	0
45,XX,-3	1	0	1
44,XX,-18-20	1	0	0
4,XX,-14,-16	1	0	0
45,XX,-14	1	0	0
44,XX,-3,-4	1	0	0
44,XX,-1,-2	1	0	0
44,X,-14,-X	1	0	0
45,XX,-18	0	1	1
47,XX,-7,-9	0	1	0
45xx, t(9;13),-20	0	1	0
44,xy,-19,-22, fra 1q	0	1	0
44,x,-9	0	1	0
44,xx,-6,-15	0	1	0
44,xx,-5-11	0	1	0
44,xy, -6,-7	0	1	0
44, x,-11,-16,+	0	1	0
43,xy,-5,-17,-21	0	1	0
45,XX,-4	0	0	1
45,XX,-22	0	0	1
45,XX,-13	0	0	1
45,XX,-11	0	0	1
TOTAL	32	24	10

Figura 4. Pérdidas cromosómicas en los grupos de estudio.

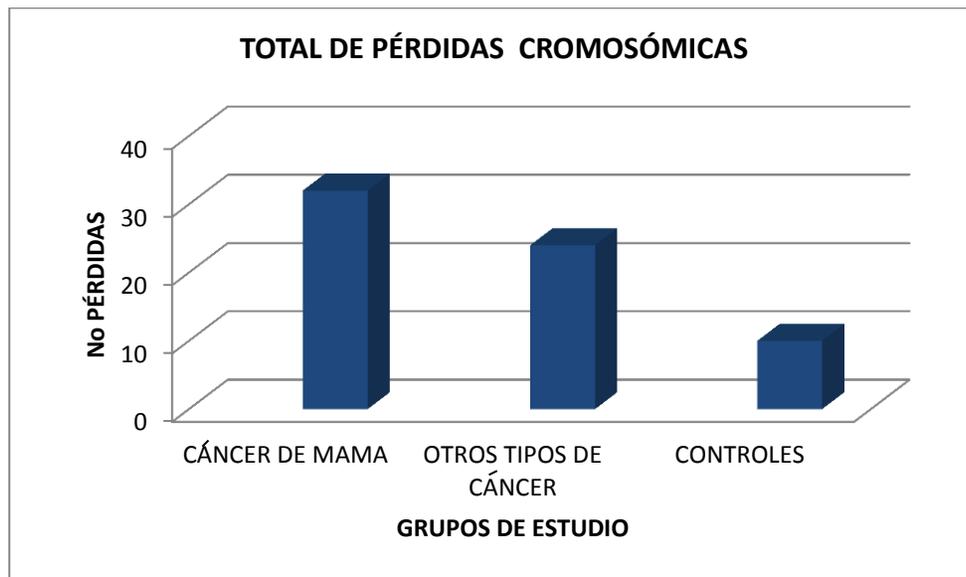
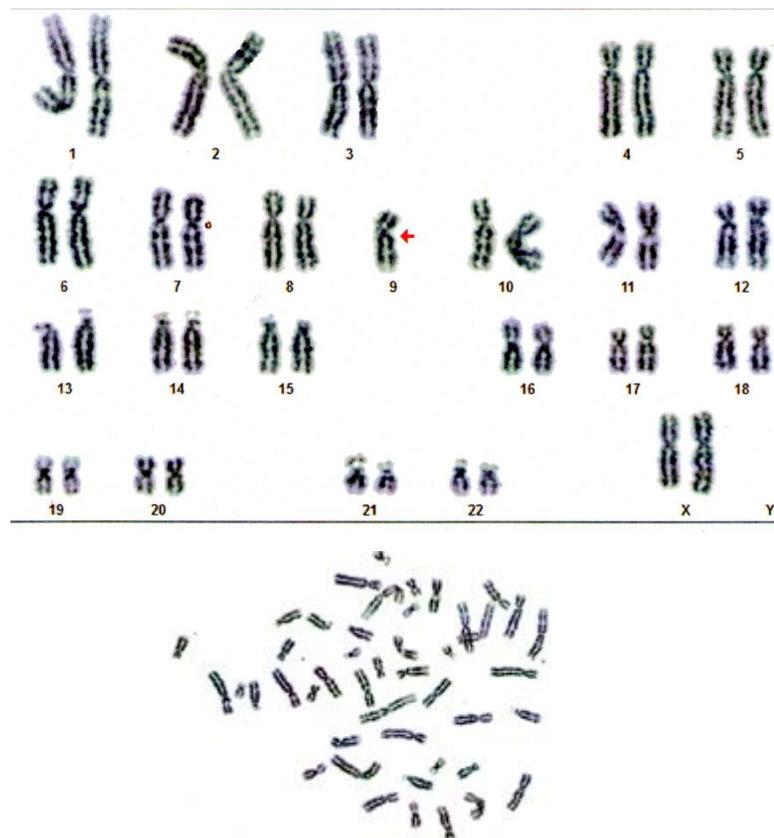


Figura 5. Cariotipo femenino con pérdida del cromosoma 9



Representación esquemática de un cariotipo y la metafase femenina con pérdida del cromosoma 9 (XX,45,-9)

✓ Fragilidades de los Cromosomas

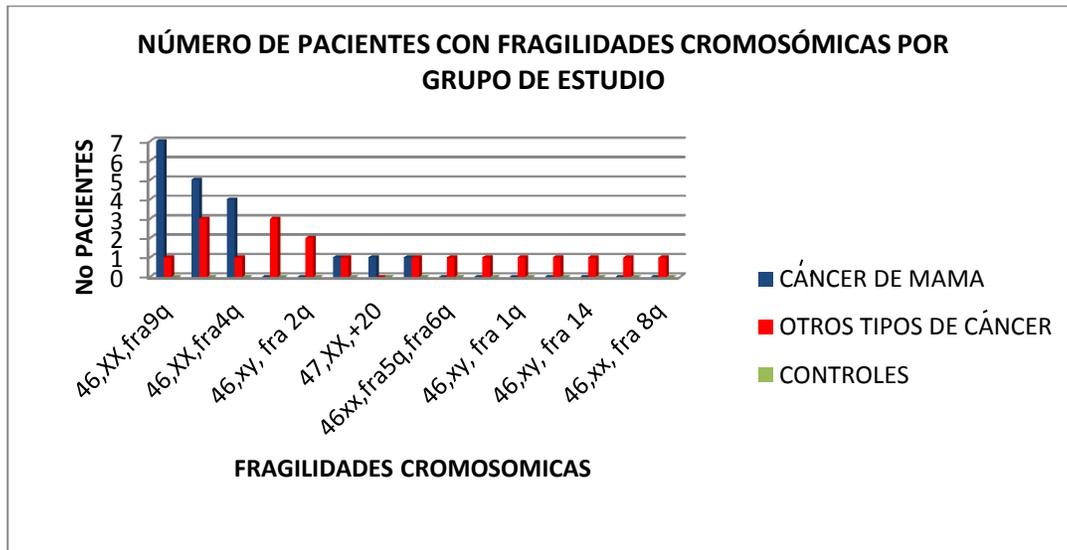
En el grupo de pacientes con cáncer de mama 18 metafases presentaron fragilidades en uno o más cromosomas, la más frecuente fue una en el brazo largo del cromosoma 9 (46,XX, fra9q) identificada en siete pacientes, seguida de una en el brazo largo del cromosoma 5 (46,XX, fra5q) identificada en cinco pacientes, y la del brazo largo del cromosoma 4 (46,XX, fra4q), reportada en cuatro pacientes, finalmente se observó fragilidad del brazo largo del cromosoma X (46,XX, fraXq) en un paciente.

En cuanto al grupo de pacientes con cáncer de pulmón, colon, gástrico y ovario, se identificó fragilidades en 15 metafases, la más frecuente fue la fragilidad del brazo largo del cromosoma 5 (46,XX, fra5q) identificada en tres pacientes, luego la fragilidad del brazo largo del cromosoma 6 (46,XY, fra6q) que fue observada en tres pacientes, y la fragilidad del brazo largo del cromosoma 2 (46,XY, fra2q) reportada en dos pacientes. En la figura 6 y la tabla 9 se muestra los hallazgos para los grupos de casos y controles.

Tabla 9. Fragilidades cromosómicas en los grupos de estudio.

FRAGILIDAD	CÁNCER DE MAMA	OTROS TIPOS DE CÁNCER	CONTROLES
46,XX, fra9q	7	1	0
46,XX, fra5q	5	3	0
46,XX, fra4q	4	1	0
46,xy, fra 6q	0	3	0
46,xy, fra 2q	0	2	0
46,XX, fraXq	1	1	0
46,XX, fra15q	1	1	0
46xx, fra5q, fra6q	0	1	0
44,xy, -19, -22, fra 1q	0	1	0
46,xy, fra 1q	0	1	0
46,xy, fra 4p	0	1	0
46,xy, fra 14	0	1	0
46,xy, fra 7q	0	1	0
46,xx, fra 8q	0	1	0
TOTAL	18	15	0

Figura 6. Distribución de las fragilidades cromosómicas por grupo de estudio.



✓ Alteraciones Estructurales de los cromosomas

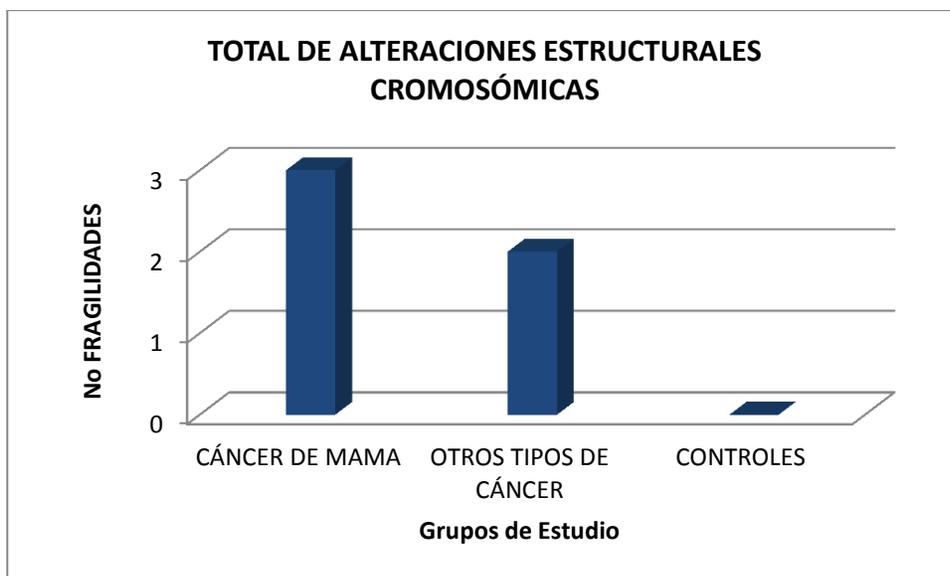
A partir del análisis de los cariotipos, en el grupo de pacientes con cáncer de mama se identificó un total de 3 metafases con alteraciones estructurales así: en una misma metafase de un paciente con cáncer de mama se detectó una deleción del brazo largo del cromosoma 12, adición de material desconocido de brazo largo del cromosoma 16 y deleción del brazo largo del cromosoma X, (46,XX,delX,del12,add16). También se evidenció una deleción del brazo largo del cromosoma 3 (46,XX,del3) en un paciente y una deleción del brazo largo del cromosoma 5 (46,XX,del5q) en una célula de otro paciente.

Para el grupo conformado por los pacientes con cáncer de pulmón, colon, gástrico y ovario, solo se identificó una deleción en el brazo corto del cromosoma 16 (46,XX,del16p) en una célula de un paciente. En la tabla 10 y figura 7 se presentan las alteraciones estructurales observadas entre los grupos de estudio.

Tabla 10. Alteraciones estructurales presentes en los grupos de estudio

ALTERACIÓN	CANCER DE MAMA	OTROS TIPOS DE CANCER	CONTROLES
46,XX,del3	1	0	0
46,XX,del5q	1	0	0
46,XX,delX,del12,add16	1	0	0
46,XX,add20p	0	1	0
46,xx,del16p	0	1	0
TOTAL	3	2	0

Figura 7. Alteraciones estructurales en el grupo de estudio



8. DISCUSIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial, producto de la suma de factores genéticos y ambientales que alteran diferentes procesos biológicos celulares. En las últimas décadas se ha generado conocimiento acerca de los procesos biológicos alterados y se ha identificado multitud de moléculas como biomarcadores de la enfermedad en diversas etapas de su desarrollo, muchos de estos estudios se han realizado en muestras de tejido tumoral. Algunos de estos biomarcadores han sido útiles para generar nuevas clasificaciones en cáncer, un ejemplo claro es la clasificación molecular propuesta para

cáncer de seno por Malhotra et al. en el 2010, sin embargo; otra gran parte de moléculas propuestas aún son objeto de validación.

Entre los biomarcadores moleculares validados para cáncer de mama, se encuentra la proteína HER-2, esta proteína ha sido objeto de estudio a partir de muestras de tejido tumoral, actualmente es un biomarcador de mal pronóstico en cáncer de mama, y la información acerca de su estado de amplificación es relevante para la toma de decisiones acerca del tratamiento a prescribir a los pacientes, con el objetivo de aumentar la tasa de supervivencia de los individuos, particularmente en los países en vía de desarrollo (Zubeda et al., 2013). Sin embargo, los exámenes a partir de tejido tumoral implican altos costos debido a los procedimientos quirúrgicos requeridos para la obtención de la muestra; por tal motivo se ha recomendado detectar la expresión del gen mediante la técnica de qPCR o de la proteína por la técnica ELISA. (Moelans, de Weger, Van der Wall, & van Diest, 2011). En el presente estudio, se analizaron muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, los cuales expresaron el gen Her-2 en un 40%. En cuanto a los otros tipos de cáncer analizados (pulmón, gástrico, ovario y colon), no se observó expresión de este, como tampoco ocurrió en el grupo control. Lo anterior aumenta la evidencia científica que relaciona la expresión de Her-2 con presencia de cáncer de mama y la existencia de células tumorales circulantes en los pacientes con cáncer de mama en estadio II/III. Apostolaki y colaboradores (2009) descubrieron que los niveles de expresión de Her-2 en células circulantes se encuentran asociados con una supervivencia reducida; dicho comportamiento de expresión se encuentra con mayor frecuencia en los pacientes cuya enfermedad está en estadio II/III (Apostolaki et al., 2009).

El gen mamoglobina ha sido postulado en diferentes estudios como un potencial biomarcador en la detección de células circulantes en sangre periférica en pacientes con cáncer de mama (Chia et al., 2010; Janku et al., 2004; Zach, Kasparu, Wagner, Krieger, & Lutz, 2000; Zach, Wagner, Kasparu, Krieger, & Lutz, 2001). No obstante, la mamoglobina no se expresa universalmente en todos los tumores de cáncer de mama, esta afirmación se basa en los descubrimientos de Zach y colaboradores, quienes encontraron por qPCR que solo 35 tumores de los 85 casos analizados con cáncer

metastásico expresaban el gen, lo cual correspondía al 43% de la muestra estudiada (Zach et al., 2001). En el presente estudio se analizaron muestras de sangre periférica de 20 individuos con cáncer de mama en estadio II y III, de los cuales 13 pacientes expresaron mamoglobina, lo cual corresponde a un 65% de la muestra de estudio, mientras que las muestras del grupo conformado por cinco tipos de cáncer distintos (pulmón, ovario, gástrico, colon) y las muestras del grupo control no expresaron este gen, comportamiento también observado en otras investigaciones (Ceballos et al., 2011; Ferro et al., 2010; Roncella et al., 2005). Aunque la detección de la expresión de la mamoglobina ha sido asociada a estadios tempranos de la enfermedad (I y II) en el presente estudio se evidenció que hay expresión del gen en estadios intermedios (II y III) (Bossolasco et al., 2002).

La expresión de LMO4 ha sido descrita en diferentes tipos de cáncer y ha sido asociada con estadios avanzados de la enfermedad, por tener un papel en el proceso de tumorigénesis (Karachaliou et al., 2013). Se ha detectado expresión de este gen en cáncer de mama, pulmón, gástrico, colon y garganta en muestras de tejido tumoral y se ha sido postulado como un biomarcador de mal pronóstico en cáncer (Kwong et al., 2011; Murphy et al., 2008). En el presente estudio el porcentaje de individuos que expresaron LMO4 fue similar 58% y 60% en el grupo de cáncer de mama y grupo con otros tipos de cáncer, respectivamente. En el grupo de individuos sanos no se detectó expresión de este gen, lo que está en concordancia con los reportes publicados por diferentes investigadores que detectaron la expresión de este gen limitada a individuos con cáncer en estadios avanzados (Mizunuma, Miyazawa, Sanada, & Imai, 2003).

En cuanto a las anomalías cromosómicas como biomarcadores de cáncer, en muchos estudios se han identificado translocaciones cromosómicas en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo en las leucemias. Particularmente, para cáncer de mama, se ha logrado evidenciar que los reordenamientos cromosómicos son en mayor número de tipo intracromosomal. Estos involucran secciones moderadas de ADN y también pueden afectar brazos completos de los cromosomas, sugiriendo así la existencia de alteraciones en los procesos de mantenimiento de la integridad del ADN, aunque se desconoce su rol. En cáncer de mama, los reordenamientos cromosómicos identificados

han servido para proponer tanto nuevas clasificaciones de este tipo de cáncer, (basadas en el tipo de anomalías cromosómicas presentes en el tumor) como nuevos genes candidatos a biomarcadores entre los que se encuentran ubicados en las regiones involucradas en los reordenamientos. El presente estudio aporta información acerca de reordenamientos cromosómicos existentes en muestras de sangre de pacientes con diferentes tipos de cáncer, que contribuirá a la creación de un catálogo de las clases de aberraciones cromosómicas propias de cada tipo de cáncer. (Stephens et al., 2009).

Diferentes estudios han identificado múltiples biomarcadores cromosómicos en muestras tumorales, sin embargo no se ha validado el análisis de estos marcadores en muestras de sangre periférica, para establecer si existe el mismo comportamiento biológico en los dos tipos de muestra, y de esta manera acercarse a su validación clínica. (Kwei, Kung, Salari, Holcomb, & Pollack, 2010; Tonnies et al., 2001). Por tal razón, en el presente estudio se evaluaron muestras de sangre que casi con seguridad contienen células tumorales circulantes. Esto se apoya en el hecho, de que en el grupo de pacientes con cáncer de mama y otros tipos de cáncer las aberraciones cromosómicas estuvieron presentes en frecuencias muy por encima de las encontradas en los individuos sanos del grupo control. Sin embargo, la presencia de células tumorales en sangre debe ser confirmada mediante el uso de otras técnicas como por ejemplo la citometría de flujo.

En el grupo de pacientes con cáncer de mama, las pérdidas cromosómicas más frecuentes (cromosomas 1,3, 6, 9,15, 18, 20, 21,22, X) también fueron reportadas en tejido tumoral en otros estudios, particularmente las monosomías de los cromosomas 3 y 22 (Benetti et al., 2002). En otro estudio donde se analizaron 31 muestras tumorales se encontró un caso con una trisomía del cromosoma X (47,XXX) y tres células con monosomías del X (45,X) (Benetti et al., 2002), tanto la trisomía como la monosomías del X, fueron halladas en el presente estudio. En cuanto a las pérdidas cromosómicas, en el grupo de pacientes con cáncer diferente de cáncer de mama, se encontró en mayor frecuencia de pérdida de los cromosomas 9, 15, 22, X, y no se evidenció la pérdida del cromosoma 3, el cual ha sido descrito como potencial biomarcador cromosómico específico para cáncer de mama.

Las ganancias cromosómicas que fueron observadas en el grupo de pacientes con cáncer de mama se encontraron en forma de trisomía de los cromosomas 5, 8, 18, 20, 22, X y de un cromosoma marcador. Las ganancias de los cromosomas 5, 8 y 20 fueron las más frecuentes en nuestro estudio. Otros estudios, donde analizaron 43 muestras de tejido tumoral de tipo carcinoma ductal, evidenciaron ganancias de los cromosomas 5, 8 y 20 las cuales fueron confirmadas por Comparative Genomic Hybridization (CGH) (Molist et al., 2005). Los hallazgos en cuanto a ganancias cromosómicas realizadas en sangre son muy similares a los reportados en tejido tumoral por Molist (2005), lo cual constituye otro argumento adicional que soporta la idea de que hay células tumorales circulantes en la sangre periférica de los pacientes con cáncer. En cuanto a los pacientes del grupo conformado por cinco tipos de cáncer distintos, se observó ganancia de los cromosomas 9, 12 y 8. Las aberraciones cromosómicas del cromosoma 8 han sido reportadas en varios tumores sólidos, tales como próstata, ovario y riñón; y estudios clínicos han mostrado su asociación con algunos factores clínico-patológicos y baja supervivencia (Rummukainen et al., 2001; Tirkkonen et al., 1998). Los resultados del presente estudio también señalan al cromosoma 8 como biomarcador en sangre de la presencia de cáncer.

En cuanto a las anomalías estructurales, nosotros observamos una deleción en el brazo largo del cromosoma X (46,XX,delX), esta anomalía fue inicialmente identificada en 16 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, mediante la técnica de CGH (Yu, Kanaan, Bae, & Gabrielson, 2009). También en otros estudios se ha reportado la existencia de alteraciones tanto estructurales como numéricas del cromosoma X en pacientes con cáncer de mama (Rondón M, 2007), lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Se puede afirmar que células tumorales presentes en sangre, pueden ser estudiadas por citogenética convencional, aunque es necesario confirmar su presencia con la ayuda de otras técnicas. Los estudios citogenéticos aportan información acerca de lo que puede estar ocurriendo en el tejido tumoral, y cuando se tenga un catálogo más completo de todas las alteraciones cromosómicas de los diferentes tipos de cáncer, se podrá tener un conocimiento más amplio acerca de las diferentes neoplasias y su comportamiento

frente a los diversos tratamientos y a la evolución misma de la enfermedad, incluso podrían formar parte de estrategias para implementar pruebas de tamizaje que se empleen en la detección temprana de la enfermedad.

Los resultados obtenidos sobre los niveles de expresión génica en el presente trabajo, aportan evidencia acerca de la especificidad de los genes Her2 y mamoglobina como indicadores de la presencia de cáncer de mama, mientras que el gen LMO4, mostró ser un gen indicador no específico de la presencia de cáncer.

LITERATURA CITADA

- Apostolaki, S., Perraki, M., Kallergi, G., Kafousi, M., Papadopoulos, S., Kotsakis, A., . . . Mavroudis, D. (2009). Detection of occult HER2 mRNA-positive tumor cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic relevance. *Breast Cancer Res Treat*, 117(3), 525-534. doi: 10.1007/s10549-008-0239-3
- Atkinson Arthur, C. W., Victor G. DeGruttola, David L. DeMets, Gregory J. Downing, Daniel F. Hoth, John A. Oates, Carl C. Peck, Robert T. Schooley, Bert A. Spilker, Janet Woodcock and Scott L. Zeger. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework *Clin Pharmacol Ther* (Vol. 69, pp. 89-95). United States.
- Benetti, M. R., Kessler, R. G., Bittelbrunn, A. C., Frantz, B., Biazus, J. V., & Giugliani, R. (2002). Chromosome analysis in 31 cases of benign and malignant breast tumors: a study in Brazil *Hereditas* (Vol. 137, pp. 57-64). Sweden.
- Blot, W. J. (1999). Invited commentary: more evidence of increased risks of cancer among alcohol drinkers. *Am J Epidemiol*, 150(11), 1138-1140; discussion 1141.
- Bossolasco, P., Ricci, C., Farina, G., Soligo, D., Pedretti, D., Scanni, A., & Deliliers, G. L. (2002). Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-pCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detect Prev*, 26(1), 60-63.
- Carrillo, Y. (2012). *Caracterización Citogenética y Molecular de un Grupo de Pacientes con Cáncer de Seno*. (Maestría en Ciencias Biológicas), Pontificia Universidad Javeriana.
- Ceballos, M. P., Zumoffen, C., Massa, E., Cipulli, G., Funes, C. C., Gil, A. B., . . . Matous, B. (2011). Detection of mammaglobin A in blood from breast cancer patients, before and after treatment, using a one-tube nested PCR protocol. Association with the absence of tumor estrogen receptors. *Clin Biochem* (Vol. 44, pp. 1429-1433). United States, Netherlands, Italy, Slovakia: 2011 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc, 2010 Elsevier Ltd.
- Chia, S. Y., Thike, A. A., Cheok, P. Y., Tan, P. H., Mostert, B., Sleijfer, S., . . . Lutz, D. (2010). Utility of mammaglobin and gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15) in confirming a breast origin for recurrent tumors *Breast* (Vol. 19, pp. 355-359). Netherlands, Italy, Slovakia, Austria: 2010 Elsevier Ltd.
- Chiam, K., Ricciardelli, C., & Bianco-Miotto, T. (2012). Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. *Cancer Letters*(0). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.011>
- Cho, S. H., Jeon, J., & Kim, S. I. (2012). Personalized medicine in breast cancer: a systematic review. *J Breast Cancer*, 15(3), 265-272.
- Correa, P. (2003). Bacterial infections as a cause of cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95(7), E3.
- de Groot, P., & Munden, R. F. (2012). Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am*, 50(5), 863-876. doi: 10.1016/j.rcl.2012.06.006
- Dowsett, M., & Dunbier, A. K. (2008). Emerging biomarkers and new understanding of traditional markers in personalized therapy for breast cancer *Clin Cancer Res* (Vol. 14, pp. 8019-8026). United States.

- Farmer, P., Frenk, J., Knaul, F. M., Shulman, L. N., Alleyne, G., Armstrong, L., . . . Seffrin, J. R. (2010). Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action *Lancet* (Vol. 376, pp. 1186-1193). England: 2010 Elsevier Ltd.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, *127*(12), 2893-2917. doi: 10.1002/ijc.25516
- Ferro, P., Franceschini, M. C., Bacigalupo, B., Dessanti, P., Falco, E., Fontana, V., . . . Roncella, S. (2010). Detection of circulating tumour cells in breast cancer patients using human mammaglobin RT-PCR: association with clinical prognostic factors *Anticancer Res* (Vol. 30, pp. 2377-2382). Greece.
- Galvis-Jimenez, J. M., Curtidor, H., Patarroyo, M. A., Monterrey, P., & Ramirez-Clavijo, S. R. (2013). Mammaglobin peptide as a novel biomarker for breast cancer detection. *Cancer Biol Ther*, *14*(4), 327-332. doi: 10.4161/cbt.23614
- Gutierrez, C., & Schiff, R. (2011). HER2: biology, detection, and clinical implications *Arch Pathol Lab Med* (Vol. 135, pp. 55-62). United States.
- Gyorki, D. E., Muiyco, A., Kushner, A. L., Brennan, M. F., & Kingham, T. P. (2012). Cancer surgery in low-income countries: an unmet need *Arch Surg* (Vol. 147, pp. 1135-1140). United States.
- Haile, R. W., John, E. M., Levine, A. J., Cortessis, V. K., Unger, J. B., Gonzales, M., . . . Boffetta, P. (2012). A review of cancer in U.S. Hispanic populations *Cancer Prev Res (Phila)* (Vol. 5, pp. 150-163). United States: 2011 Aacr.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation *Cell* (Vol. 144, pp. 646-674). United States: 2011 Elsevier Inc.
- Hernández, M., & Hernández, M. (2001). LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES Y EL CÁNCER. *Rev Cubana Oncol*, *17*(1), 65-71.
- Indovina, P., Marcelli, E., Casini, N., Rizzo, V., & Giordano, A. (2013). Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression. *J Cell Physiol*, *228*(3), 525-535. doi: 10.1002/jcp.24170
- Janku, F., Kleibl, Z., Novotny, J., Tesarova, P., Petruzalka, L., & Matous, B. (2004). Mammaglobin A, a novel marker of minimal residual disease in early stages breast cancer. *Neoplasma*, *51*(3), 204-208.
- Kachroo, S., & Etzel, C. J. (2009). Decreasing the cancer burden in developing countries: concerns and recommendations *Eur J Cancer Care (Engl)* (Vol. 18, pp. 18-21). England.
- Karachaliou, N., Costa, C., Gimenez-Capitan, A., Molina-Vila, M. A., Bertran-Alamillo, J., Mayo, C., . . . Lutz, D. (2013). BRCA1, LMO4, and CtIP mRNA expression in erlotinib-treated non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations *J Thorac Oncol* (Vol. 8, pp. 295-300). United States.
- Kwei, K. A., Kung, Y., Salari, K., Holcomb, I. N., & Pollack, J. R. (2010). Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol*, *4*(3), 255-266.
- Kwong, R. A., Scarlett, C. J., Kalish, L. H., Cole, I. E., Kench, J. G., Sum, E. Y., . . . Imai, K. (2011). LMO4 expression in squamous cell carcinoma of the anterior tongue

- The LIM-only protein, LMO4, and the LIM domain-binding protein, LDB1, expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Histopathology*, 58(3), 477-480. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03765.x
- Latham, K. E., Sapienza, C., & Engel, N. (2012). The epigenetic lora: gene-environment interactions in human health. *Epigenomics*, 4(4), 383-402. doi: 10.2217/epi.12.31
- Lazcano-Ponce, E. C., & Hernandez-Avila, M. (1997). [Cancer: frequency, risk factors and preventive measures]. *Salud Publica Mex*, 39(4), 251-252.
- Menelaos Zafrakas, B. P., Andreas Donner, Florian Fritzsche,, & Glen Kristiansen, R. K. a. E. D. (2006). Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies *BMC Cancer*, 6(88), 1-13.
- Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., & Aguayo-González, Á. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de Investigación Clínica*, 58(1), 56-70.
- Mizunuma, H., Miyazawa, J., Sanada, K., & Imai, K. (2003). The LIM-only protein, LMO4, and the LIM domain-binding protein, LDB1, expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Br J Cancer*, 88(10), 1543-1548.
- Moelans, C. B., de Weger, R. A., Van der Wall, E., & van Diest, P. J. (2011). Current technologies for HER2 testing in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 80(3), 380-392. doi: 10.1016/j.critrevonc.2010.12.005
- Molist, R., Gerbault-Seureau, M., Sastre-Garau, X., Sigal-Zafrani, B., Dutrillaux, B., Muleris, M., . . . Imai, K. (2005). Ductal breast carcinoma develops through different patterns of chromosomal evolution *Genes Chromosomes Cancer* (Vol. 43, pp. 147-154). United States
England: 2005 Wiley-Liss, Inc.
- Montanez-Wiscovich, M. E., Seachrist, D. D., Landis, M. D., Visvader, J., Andersen, B., & Keri, R. A. (2009). LMO4 is an essential mediator of ErbB2/HER2/Neu-induced breast cancer cell cycle progression *Oncogene* (Vol. 28, pp. 3608-3618). England.
- Murphy, N. C., Scarlett, C. J., Kench, J. G., Sum, E. Y., Segara, D., Colvin, E. K., . . . Biankin, A. V. (2008). Expression of LMO4 and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma *Br J Cancer* (Vol. 98, pp. 537-541). England.
- Niclis, C., Diaz Mdel, P., Eynard, A. R., Roman, M. D., & La Vecchia, C. (2012). Dietary habits and prostate cancer prevention: a review of observational studies by focusing on South America. *Nutr Cancer*, 64(1), 23-33. doi: 10.1080/01635581.2012.630163
- Ntoulia, M., Stathopoulou, A., Ignatiadis, M., Malamos, N., Mavroudis, D., Georgoulas, V., & Lianidou, E. S. (2006). Detection of Mammaglobin A-mRNA-positive circulating tumor cells in peripheral blood of patients with operable breast cancer with nested RT-PCR. *Clinical Biochemistry*, 39(9), 879-887. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.06.009>
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 *Int J Cancer* (Vol. 94, pp. 153-156). United States.
- Pineros, M., Ferlay, J., & Murillo, R. (2006). Cancer incidence estimates at the national and district levels in Colombia *Salud Publica Mex* (Vol. 48, pp. 455-465). Mexico.

- Pineros, M., Hernandez, G., & Bray, F. (2004). Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: an emerging problem. *Cancer*, *101*(10), 2285-2292. doi: 10.1002/cncr.20607
- Posso Hector, L. S., Perry Perry Fernando, Palacios Betancurt Diego. (2004). El Cáncer. Aspectos Básicos sobre su Biología, Clínica, Prevención, Diagnostico y Tratamiento. In M. d. I. P. Social & I. N. d. C. E.S.E. (Eds.), (Vol. Vol. 1, pp. 1-67).
- Ramel, C. (1992). Genotoxic and nongenotoxic carcinogens: mechanisms of action and testing strategies. *IARC Sci Publ*(116), 195-209.
- Roncella, S., Ferro, P., Bacigalupo, B., Pronzato, P., Tognoni, A., Falco, E., . . . Fedeli, F. (2005). Human mammaglobin mRNA is a reliable molecular marker for detecting occult breast cancer cells in peripheral blood. *J Exp Clin Cancer Res*, *24*(2), 265-271.
- Rondón M, C. J. R. J. (2007). Determinación de anomalías cromosómicas y secuencias de ADN amplificadas en cáncer de mama. *Rev. Ciencias*, *4*, 7-22.
- Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Puztai, L., Ravdin, P. M., & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine *Oncologist* (Vol. 14, pp. 320-368). United States.
- Rummukainen, J., Kytola, S., Karhu, R., Farnebo, F., Larsson, C., & Isola, J. J. (2001). Aberrations of chromosome 8 in 16 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet*, *126*(1), 1-7.
- Salamanca-Gomez, F. (1995). ALTERACIONES CROMOSOMICAS EN EL CANCER HUMANO *Salud Pública Méx* *37*(2), 162-170.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2012a). Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012. *CA Cancer J Clin*, *62*(5), 283-298. doi: 10.3322/caac.21153
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2012b). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, *62*(1), 10-29. doi: 10.3322/caac.20138
- Stephens, P. J., McBride, D. J., Lin, M. L., Varela, I., Pleasance, E. D., Simpson, J. T., . . . Stratton, M. R. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes *Nature* (Vol. 462, pp. 1005-1010). England.
- Swaby, R. F., & Cristofanilli, M. (2011). Circulating tumor cells in breast cancer: a tool whose time has come of age *BMC Med* (Vol. 9, pp. 43). England.
- Tai, W., Mahato, R., & Cheng, K. (2010). The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery *J Control Release* (Vol. 146, pp. 264-275). Netherlands: 2010 Elsevier B.V.
- Tirkkonen, M., Tanner, M., Karhu, R., Kallioniemi, A., Isola, J., & Kallioniemi, O. P. (1998). Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*, *21*(3), 177-184.
- Tonnies, H., Stumm, M., Wegner, R. D., Chudoba, I., Kalscheuer, V., & Neitzel, H. (2001). Comparative genomic hybridization based strategy for the analysis of different chromosome imbalances detected in conventional cytogenetic diagnostics *Cytogenet Cell Genet* (Vol. 93, pp. 188-194). Switzerland: 2001 S. Karger AG, Basel.
- Visvader, J. E., Venter, D., Hahm, K., Santamaria, M., Sum, E. Y., O'Reilly, L., . . . Lindeman, G. J. (2001). The LIM domain gene LMO4 inhibits differentiation of mammary

- epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer *Proc Natl Acad Sci U S A* (Vol. 98, pp. 14452-14457). United States.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer *Trends Genet* (Vol. 9, pp. 138-141). England.
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer *Nat Rev Cancer* (Vol. 12, pp. 685-698). England.
- Wild, C. P., Scalbert, A., & Herceg, Z. (2013). Measuring the exposome: A powerful basis for evaluating environmental exposures and cancer risk. *Environ Mol Mutagen*. doi: 10.1002/em.21777
- Yates, L. R., & Campbell, P. J. (2012). Evolution of the cancer genome *Nat Rev Genet* (Vol. 13, pp. 795-806). England.
- Yu, W., Kanaan, Y., Bae, Y. K., & Gabrielson, E. (2009). Chromosomal changes in aggressive breast cancers with basal-like features. *Cancer Genet Cytogenet*, 193(1), 29-37. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2009.03.017
- Zach, O., Kasparu, H., Wagner, H., Krieger, O., & Lutz, D. (2000). [Detection of mammaglobin mRNA as a marker for circulating tumor cells in breast carcinoma]. *Acta Med Austriaca Suppl*, 52, 13-15.
- Zach, O., Wagner, H., Kasparu, H., Krieger, O., & Lutz, D. (2001). Statistical validation of the mammaglobin-nested RT-PCR assay for tumor cell detection in blood of breast cancer patients. *Biotechniques*, 31(6), 1358-1362.
- Zhao, D. L., Chen, W. Q., Yu, T. T., He, Y. T., Chen, Z. F., Wen, D. G., . . . Wang, L. N. (2011). [A population-based matched case-control study on the risk factors of gastric cardia cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 33(10), 775-778.
- Zubeda, S., Kaipa, P. R., Shaik, N. A., Mohiuddin, M. K., Vaidya, S., Pavani, B., . . . Mavroudis, D. (2013). HER-2/neu Status: A Neglected Marker of Prognostication and Management of Breast Cancer Patients in India *Asian Pac J Cancer Prev* (Vol. 14, pp. 2231-2235). Netherlands: Crown 2011. Published by Elsevier Ireland Ltd.

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nº: _____



**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS**

LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

Estudio: “*Expresión de biomarcadores asociados con cáncer de seno en una población colombiana*”

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el grupo de investigación Ciencias Básicas Médicas de la Universidad del Rosario con la participación de:

Sandra Milena Rondón Lagos, Sandra Ramírez Clavijo, 312 5883208

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica.
- c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.
- d) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la universidad del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los Resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos y permanecerán en el anonimato.
- e) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Dras. Sandra Ramírez y Sandra Milena Rondón Lagos. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Tel (57-1) 3474570 (Ext 572)

Dr. Alberto Vélez Van Meerbeke. Presidente Comité de Ética. Tel (57-1) 3474570 (Ext 236)



COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR

“Expresión de biomarcadores asociados con cáncer de seno en una población colombiana”

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO

OBJETIVO: El cáncer de seno es la tercera causa de muerte por cáncer en nuestro país y aproximadamente el 60% de los cánceres de seno diagnosticados corresponden a estadios tardíos, en donde la mortalidad es mucho más alta. Este estudio busca determinar anomalías cromosómicas, el estado y la expresión de los genes ERBb2, LMO4 y mamoglobina, asociadas a cáncer de seno mediante técnicas de citogenética convencional, citogenética molecular (FISH) y biología molecular (qRT-PCR) que contribuyan a un mayor conocimiento de esta entidad patológica y sean un apoyo para el diagnóstico y pronóstico

PROCEDIMIENTO: Se realizará una entrevista clínica con usted y se tomará una muestra de aproximadamente 5 ml de sangre mediante punción en vena periférica, adicionalmente se utilizará un fragmento de tejido proveniente de la biopsia que el cirujano le realizará, si es el caso. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio de Biología Celular y Molecular.

RIESGOS E INCOMODIDADES: La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y los efectos adversos estarán representados por molestias como hematomas, enrojecimiento y/o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se realice la punción venosa. Adicionalmente si es el caso, están contempladas las molestias post-quirúrgicas generadas por la remoción del tejido fresco por parte del cirujano, las cuales serán de manera transitoria.

RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES: Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

- a) **El riesgo existente en una toma de muestra de sangre periférica es muy bajo y el tejido fresco requerido para el estudio es solo un fragmento del que el cirujano le extraerá en el quirófano, por lo tanto no reviste riesgo para su salud.**
- b) **Es su responsabilidad seguir las indicaciones y tratamientos de su médico tratante.**

CLAUSULA DE EXCLUSIÓN: Los investigadores **no somos responsables** de cualquier consecuencia que presente la paciente antes, durante o posterior a la intervención quirúrgica, por cuanto nuestra labor se limita a recibir del cirujano una muestra del tejido tumoral fresco extraído, sin que de nuestra parte exista el más mínimo contacto con la paciente durante la cirugía.

MANEJO DE RESULTADOS: Los resultados que se obtengan de la investigación sólo tendrán sentido si son tomados en forma conjunta y no tendrán validez en forma individual. Sin embargo, una vez finalizado el estudio, los resultados serán entregados directamente al médico tratante para que él le informe a usted en el momento de la consulta.



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

“Expresión de biomarcadores asociados con cáncer de seno en una población colombiana”

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

AUTORIZACION: La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio. Si No

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio , en las situaciones señaladas a continuación: Si No

a) En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, enviando la muestra al exterior a el(los) laboratorio(s) de el(los) instituto(s) antes mencionado(s). Si No

b) En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia. Si No

c) En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación. Si No

d) En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación. Si No

e) En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación. Si No

AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:
“Expresión de biomarcadores asociados con cáncer de seno en una población colombiana”

Habiendo sido enterada(o) del contenido del presente estudio, informada(o) que no tendré ningún beneficio directo en el mismo y que se han resuelto todas mis dudas acerca de la investigación Yo, _____ con documento de identificación número: _____ de _____, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre y de tejido tumoral fresco, con el fin de realizar el análisis Citogenético Convencional y Molecular asociados con cáncer de seno. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

“Expresión de biomarcadores asociados con cáncer de seno en una población colombiana”

		Fecha:

Firma Paciente o Acudiente / Representante legal		
Nombre _____		Nombre _____
Dirección _____		Dirección _____
Teléfono _____		Teléfono _____
Parentesco _____		Parentesco _____
Firma _____		Firma _____
CC.		CC.
Testigo 1		Testigo 2

		Investigador

ANEXO 2: ENCUESTA

HOJA DE REGISTRO

Expresión de biomarcadores asociados con cáncer de seno en una población colombiana
Nº _____

Nombre: _____ Apellidos _____
Sexo: Masculino _____ Femenino _____
Dirección: _____ Estrato 1_ 2_ 3_ 4_ 5_ 6_
Teléfono: _____ cc. _____ HC _____

1- Datos Sociodemográficos

1.1 Fecha de nacimiento (D/M/A) _____ Municipio _____ Dpto. _____

1.2 ¿Cuál es su edad, años cumplidos? _____

1.3 ¿Ciudad en la que reside actualmente? _____ Dpto. _____

1.4 ¿Estado civil actual? Soltero/a(1)___ Casado/a(2)___ Unión Libre(3)___ Viudo/a(4)

1.5 ¿Cuál es su nivel educativo?

Primaria(1)___ Secundaria(2)___ Técnico(3)___ Universitario(4)___ Postgrado(5)___

1.6 ¿Principal ocupación en los últimos cinco años? _____

1.7 ¿Peso actual?(Kg.) _____

1.8 Estatura (Mts.): _____ IMC _____

2- Antecedentes Clínicos:

2.1 ¿Principales enfermedades que ha sufrido?

2.2 ¿Consumo algún tipo de medicamento actualmente? SI(1)___ NO(2)___

¿Cuál? _____

2.3 ¿Presenta algún tipo de reacción alérgica? _____

2.4 Antecedentes Gineco-obstétricos:

a. ¿Edad a la que presentó su primera menstruación? _____

b. Número de Gestaciones (1) _____, Partos (2) _____, Abortos (3) _____

c. ¿Edad del primer embarazo? _____

d. ¿Utilizó o utiliza algún método anticonceptivo? SI(1)___ NO(2)___

e. ¿Método utilizado para planificar? DIU(1)___ Anticonceptivos Hormonales(2)___

f. ¿Tiempo de uso?(Meses) _____

g. ¿Uso de terapia Hormonal? SI (1)___ NO(2)___ Cual? _____

¿Tiempo de uso? _____

h. ¿Cuál fue la fecha de su última menstruación? _____

3. Antecedentes de Hábitos

3.1 ¿Fuma? SI (1)___ NO(2)___

Nunca___ A veces___ Siempre___

3.2 ¿Consumo carnes ahumadas o asadas? SI (1)___ NO (2)___

1 vez por semana___ menos de 1 vez a la semana___ menos de 1 vez al mes___

3.3 ¿Consumo Enlatados? SI (1)___ NO (2)___

1 vez por semana___ menos de 1 vez a la semana___ menos de 1 vez al mes___

3.4 ¿Consume Café? SI (1) _____ NO (2) _____

1 vez al día _____ más de 1 vez al día _____

3.5 ¿Consume Embutidos? SI (1) _____ NO (2) _____

1 vez por semana _____ menos de 1 vez a la semana _____ menos de 1 vez al mes _____

3.6 ¿Ingiere Alcohol? SI (1) _____ NO (2) _____

Nunca _____ a veces _____ Siempre _____

4- Antecedentes Familiares de Cáncer:

4.1. ¿Alguno de sus familiares, en primer o segundo grado, sufre o ha sufrido de cáncer?

SI (1) _____ NO (2) _____ Parentesco: _____

4.2. ¿Qué tipo de Cáncer?

Seno (1) _____ Cuello Uterino (2) _____ Gástrico (3) _____ Piel (4) _____ Otro: SI _____ NO _____

¿Cuál? _____

5- Historia de la Enfermedad: Tipo de Cáncer _____:

5.1. ¿Fecha de Diagnóstico? (D/M/A) _____

5.2. ¿Tipo de Cáncer de Seno?

Carcinoma lobular in situ (1) _____ Carcinoma ductal in situ (2) _____ Carcinoma lobular invasivo (3) _____ Carcinoma ductal invasivo (4) _____ Otro _____

5.3. Progestágenos _____

5.4. Estrógenos _____

5.5. ERBB2 _____

6. Historia de tratamientos recibidos

6.1 Cirugía.

Cuadractomía () Mastectomía ()

Otra _____

6.2 Radioterapia

Externa () Interna () Braquiterapia () MammoSite-T ()

Número de dosis _____ Duración _____

6.3 Terapia hormonal

Tamoxifeno () Leuprorelina y la Goserelina () anastrozol y el letrozol () Otro ()

Cuál?: _____

Número de dosis _____ Duración _____

6.4 Quimioterapia:

Adriamicina () Taxanos () Otro ()

Cuál?: _____

Número de dosis _____ Duración _____

6.5 Terapia dirigida

Herceptina () Erbitux () otro () Cual: _____

Número de dosis _____ Duración _____

6.6 Otros tratamientos (). Cual: _____