



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TEMA: "ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE
NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN EL GEN AKT1 EN
PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL HOSPITAL SOLCA
NÚCLEO QUITO Y EN UN GRUPO CONTROL DE MUJERES
SANAS."**

Previa la obtención del Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: BYRON PATRICIO FREIRE PASPUEL

DIRECTOR: MARCELO GRIJALVA, Ph.D.

CODIRECTOR: FRANCISCO JAVIER CAMACHO, Ph.D.

SANGOLQUÍ, AGOSTO DEL 2015

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CERTIFICADO

Marcelo Grijalva, Ph.D.

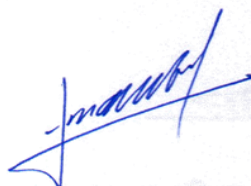
Francisco Javier Camacho, Ph.D.

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado: "ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN EL GEN AKT1 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL HOSPITAL SOLCA NÚCLEO QUITO Y EN UN GRUPO CONTROL DE MUJERES SANAS.", realizado por el Sr. BYRON PATRICIO FREIRE PASPUEL, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

El mencionado trabajo consta de dos documentos empastados y dos discos compactos los cuales contienen en formato portátil de Acrobat Reader (PDF), autorizan a BYRON PATRICIO FREIRE PASPUEL que lo entregue a MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ, M.Sc., en su calidad de Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

Sangolquí, Agosto del 2015



MARCELO GRIJALVA, PH.D.

DIRECTOR

JAVIER CAMACHO, PH.D.

CO-DIRECTOR

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA****DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD****BYRON PATRICIO FREIRE PASPUEL****DECLARO QUE:**

El proyecto de grado titulado: "ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN EL GEN AKT1 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL HOSPITAL SOLCA NÚCLEO QUITO Y EN UN GRUPO CONTROL DE MUJERES SANAS.", ha sido realizado en base a una investigación exhaustiva, respetando los derechos intelectuales de terceros, los cuales han sido incorporados en la bibliografía. Por ende este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del presente proyecto de grado.

Sangolquí, 12 de Agosto del 2015



Byron Patricio Freire Paspuel

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

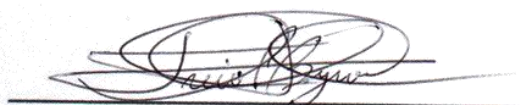
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

AUTORIZACIÓN

BYRON PATRICIO FREIRE PASPUEL

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la institución, del proyecto de grado titulado: "ANÁLISIS DE FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP) EN EL GEN AKT1 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL HOSPITAL SOLCA NÚCLEO QUITO Y EN UN GRUPO CONTROL DE MUJERES SANAS", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 12 de Agosto del 2015



Byron Patricio Freire Paspuel

DEDICATORIA

Este proyecto está dedicado a mis padres, Lidia y Patricio, por haberme brindado siempre el apoyo incondicional y el ejemplo del trabajo y esfuerzo.

A mis abuelos Segundo y María Dolores por confiar en mí y en Dios para que guíe mi camino.

A mis amigos y compañeros de la facultad, porque juntos empezamos esta gran aventura y compartimos momentos inolvidables.

AGRADECIMIENTO

A Andrés López, Carolina Salazar y Germán Burgos por haberme apoyado con su conocimiento y ánimo en el desarrollo de mi proyecto.

A los tesistas y becarios del Instituto de Investigaciones Biomédicas, especialmente a Nathaly Arcos, por acompañarme en el año más emocionante de mi vida.

A César Paz y Miño por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi proyecto de tesis en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad." Albert Einstein

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
NOMENCLATURA.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	1
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4. MARCO TEÓRICO	4
1.4.1. CÁNCER.....	4
1.4.1.1. ANGIOGÉNESIS.....	4
1.4.1.2. METÁSTASIS.....	5
1.4.1.3. GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER.....	6
1.4.1.4. PROTOONCOGENES Y ONCOGENES.....	6
1.4.1.5. GENES SUPRESORES DE TUMORES	9
1.4.2. CÁNCER DE MAMA.....	9
1.4.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA.....	9
1.4.2.2. ESTADIAJE DEL CÁNCER DE MAMA	12
1.4.2.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR.....	16
1.4.2.4. FACTORES DE RIESGO	20

	vii
1.4.2.5. GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA	23
1.4.3. RUTA PI3K/AKT1/mTOR.....	27
1.4.3.1. Gen AKT1.....	29
1.4.3.2. PROTEÍNA AKT1	30
1.4.3.3. ALTERACIONES EN EL AKT1.....	30
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	32
2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS TUMORALES Y CONTROLES	32
2.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN.....	33
2.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA	33
2.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN DE TUMORES FIJADOS EN PARAFINA	33
2.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN	34
2.4. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE	35
2.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	35
2.6. ELECTROFORESIS	38
2.7. SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS	38
2.7.1. PURIFICACIÓN DE AMPLIFICADOS.....	38
2.7.2. PCR DE SECUENCIACIÓN	39
2.7.3. PURIFICACIÓN DE PCR DE SECUENCIACIÓN.....	40
2.7.4. ELECTROFORESIS CAPILAR.....	41
2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	44
3.1. EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE MUESTRAS DE ADN.....	44
3.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	44
3.3. IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS.....	48
3.3.1. POLIMORFISMO E319G.....	49
3.3.2. POLIMORFISMO P388T	50
3.3.3. POLIMORFISMO rs3803304.....	50

	viii
3.3.4. POLIMORFISMO rs2494732	51
3.4. ANÁLISIS DE FRECUENCIAS	52
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	62
4.1. HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	62
4.2. VARIANTES GENÉTICAS EN EL GEN AKT1	65
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	69
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	70
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Angiogénesis en el desarrollo del tumor.....	5
Figura 2. Transformación de una célula carcinogénica.....	6
Figura 3. Circos plot de alteraciones genéticas en cáncer de mama.....	8
Figura 4. Carcinoma ductal in situ.....	10
Figura 5. Carcinoma ductal infiltrante.....	11
Figura 6. Carcinoma lobulillar in situ.....	11
Figura 7. Micrografía de carcinoma lobular invasivo.....	12
Figura 8. Cáncer de mama en estadio IA y IB.....	13
Figura 9. Cáncer de mama en estadio II.....	14
Figura 10. Cáncer de mama en estadio IIIA y IIIB.....	14
Figura 11. Cáncer de mama en estadio IIIC.....	15
Figura 12. Cáncer de mama en estadio IV.....	16
Figura 13. Relación del epitelio con los subtipos de cáncer.....	20
Figura 14. Ilustración de la ruta PI3K/Akt/mTOR.....	29
Figura 15. Esquema de exones del gen AKT1 humano.....	29
Figura 16. Mutaciones en la proteína AKT1 en cáncer de mama.....	31
Figura 17. Pre visualización de los cebadores del SNP E319G.....	36
Figura 18. Pre visualización de los cebadores del SNP P388T.....	36
Figura 19. Electroforesis de ADN genómico.....	44
Figura 20. Gradiente de Temperatura para el fragmento del SNP E319G.....	45
Figura 21. Gradiente de MgCl ₂ y BSA en MasterMix.....	45
Figura 22. Electroforesis de E319G en ADN de controles.....	46
Figura 23. Electroforesis de E319G en ADN de casos.....	47
Figura 24. Electroforesis de P388T en ADN de controles.....	47
Figura 25. Electroforesis de P388T en ADN de casos.....	48
Figura 26. BLAST del fragmento E319G.....	49
Figura 27. BLAST del fragmento P388T.....	49
Figura 28. Electroferograma del SNP E319G homocigoto AA.....	50
Figura 29. Electroferograma del SNP P388T homocigoto CC.....	50
Figura 30. Electroferograma del SNP rs3803304 homocigoto CC.....	51
Figura 31. Electroferograma del SNP rs3803304 heterocigoto CG.....	51
Figura 32. Electroferograma del SNP rs3803304 homocigoto GG.....	51

	x
Figura 33. Electroferograma del SNP rs2494732 homocigoto GG.	52
Figura 34. Electroferograma del SNP rs2494732 heterocigoto GA.....	52
Figura 35. Electroferograma del SNP rs2494732 homocigoto AA.	52
Figura 36. Distribución de casos por rango de edad.....	54
Figura 37. Tendencia de los subtipos en función de la edad.	55
Figura 38. Tendencia de casos ER- y ER+ en función de la edad.....	56
Figura 39. Distribución de subtipos en los casos estudiados.....	57
Figura 40. Frecuencias del polimorfismo rs3803304.	58
Figura 41. Frecuencias del polimorfismo rs2494732.	59
Figura 42. Predicción de lugares de corte y empalme del intrón 13.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama.....	17
Tabla 2. Oncogenes involucrados en el cáncer de mama.	23
Tabla 3. Genes Supresores de Tumores en cáncer de mama.	26
Tabla 4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.	32
Tabla 5. Polimorfismo de nucleótido simple en el gen AKT1.	35
Tabla 6. Secuencias de Cebadores.	35
Tabla 7. Conformación de la MasterMix para la PCR.	36
Tabla 8. Condiciones generadas por el termociclador para la PCR.....	37
Tabla 9. Conformación de la MasterMix para PCR de secuenciación.	40
Tabla 10. Variables analizadas en el grupo de estudio.....	42
Tabla 11. Distribución de características histopatológicas.....	53
Tabla 12. Frecuencia de variantes polimórficas en subtipos de cáncer.....	56
Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos.	57
Tabla 14. Asociación entre genotipos y características histopatológicas.....	59
Tabla 15. Asociación entre los polimorfismos riesgo de cáncer de mama...	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Indicadores epidemiológicos del cáncer de mama.	81
Anexo 2. Tasa de incidencia de cáncer de mama por edad.	82

NOMENCLATURA

ADN	Ácido Desoxirribo Nucleico
AKT1	Proteína Cinasa B alfa
ARN	Ácido Ribo Nucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleótidos trifosfato
ER	Receptor de Estrógeno
IIB	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Kb	Kilobases
mM	milimolar
ml	mililitro
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Simple
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PKB α	Proteína Cinasa B alfa
pb	Par de bases
PgR	Receptor de Progesterona
RT	Temperatura ambiente
rpm	Revoluciones por minuto
TBE	Solución tampón Tris/Borato/EDTA
Tm	Temperatura de Melting
TSG	Gen Supresor de Tumores
μ l	microlitro
μ M	micromolar
x g	Fuerzas de gravedad

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina de Ecuador. Uno de los factores que influyen en el desarrollo de cáncer de mama es la presencia de alteraciones en los genes que intervienen en el metabolismo celular como la proteína AKT1, la cual regula procesos de proliferación, crecimiento y supervivencia celular. En esta investigación se determinó la relación entre el desarrollo de cáncer de mama en la población ecuatoriana y la presencia de cuatro polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen AKT1, además de variables como edad, receptores de factores de crecimiento, estadio del tumor, metástasis gangliolar, y lateralidad. Los SNPs E319G, P388T, rs3803304 y rs2494732 fueron genotipificados en 91 casos y 185 controles por medio de secuenciación Sanger. No se encontraron variantes alélicas de los SNPs E319G y P388T en la población ecuatoriana, por otro lado, se determinó que existía un menor riesgo de presentar cáncer de mama al tener al menos una variante alélica rara en el genotipo del SNP rs2494732 (OR=0.52, 95% IC=0.31-0.88; P=0.022). El genotipo raro GG del SNP rs3803304 fue asociado a un mayor riesgo de presentar cáncer de mama (OR=5.2, 95% IC=1.3-20.9, P=0.027) en comparación a los individuos que tienen el genotipo CC.

Palabras clave: **CÁNCER DE MAMA, AKT1, SECUENCIACIÓN SANGER, SNP, ODDS RATIO.**

ABSTRACT

Breast cancer is the leading type of cancer with the highest rates of incidence and mortality in the female Ecuadorian population. One of the factors influencing breast cancer development is the presence of gene alterations involved in cellular metabolism, such as AKT1 protein which regulates proliferation, cell growth, and cell survival processes. This research determined the association between breast cancer development in the Ecuadorian population and the presence of four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the AKT1 gene in addition to variables such as age, growth factor receptors, tumor stage, ganglion metastasis, and breast affected. The E319G, P388T, rs3803304 and rs2494732 SNPs were genotyped in 91 cases and 185 healthy controls using Sanger sequencing analysis. No allelic variants of the E319G and P388T SNPs were found in the Ecuadorian population. On the other hand, it was determined that there was a lower risk of breast cancer by having at least one rare allelic variant in the rs2494732 genotype (odds ratio [OR]=0.52, 95% IC=0.31-0.88; P=0.022). The rare GG genotype of rs3803304 SNP was associated with an increased risk of breast cancer (OR=5.2, 95% IC=1.3-20.9, P=0.027) compared to individuals with the CC genotype.

Keywords: BREAST CANCER, AKT1, SANGER SEQUENCING ANALYSIS, ODDS RATIO.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La incidencia de cáncer de mama en América del Sur es moderada en comparación a países de Europa Occidental y América del Norte. Esto se debe a que las mujeres que viven en países desarrollados se encuentran más expuestas al consumo de alcohol, tratamientos hormonales, sedentarismo o menores periodos de lactancia. Ecuador está ubicado en el lugar 56 en el ranking de países con mayor incidencia de cáncer de mama a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Los casos de cáncer de mama aumentaron en un 25% en la población ecuatoriana desde el año 2001 hasta el 2010; siendo Quito el lugar con mayor incidencia en el país. El cáncer de seno es el tipo de cáncer que tiene mayor frecuencia en población femenina residente en Quito reportando una incidencia de 35,8 casos por cada 100 000 mujeres. Se reporta un promedio de 495 muertes anuales causadas por cáncer de mama; lo que le convierte en el cáncer con mayor mortalidad en esta población. Hasta el año 2005 se consideraba que al año morían nueve mujeres por cada 100 000 habitantes, en el 2010 el número de mujeres que mueren se ha incrementado a más de doce por cada 100 000 habitantes (Anexo I). La población femenina con edades entre 60 y 64 años es el grupo más vulnerable ante esta enfermedad. El carcinoma ductal infiltrante es la forma de cáncer de seno más frecuentemente reportada con un 76% del total de casos, seguido por carcinomas y el adenocarcinoma ductal in situ con 6 y 5% de los casos respectivamente (Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleo de Quito, 2014).

1.2. JUSTIFICACIÓN

Se han realizado múltiples investigaciones en cáncer de mama para identificar blancos eficaces hacia los que vayan dirigidas nuevas terapias, sin embargo no se han hallado soluciones definitivas hasta el momento. Existen

varias vías genéticas alteradas que inducen la formación de neoplasias y cáncer; es por esto que se ha optado por analizar los elementos de estas vías y los genomas que las codifican, para así poder identificar variantes genéticas que podrían producir tumores (Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012).

En caso de llegarse a identificar mutaciones específicas en genes que son exclusivas del cáncer de seno, sería posible desarrollar métodos de diagnóstico que sean sensibles, específicos y que permitan detectar el cáncer en estadios tempranos o inclusive antes que se manifieste, este tipo de estrategias tienen como objetivo el desarrollar firmas genéticas que brindan información importante sobre la respuesta a tratamientos específicos (Fumagalli, Desmedt, Ignatiadis, & Loi, 2011). Uno de los métodos para identificar mutaciones en genes que intervienen en este tipo de vías es el análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP), ya que se ha reportado que mutaciones en un solo nucleótido del código genético, pueden producir proteínas anómalas y cáncer (Croce, 2008).

A fin de crear terapias personalizadas, se busca caracterizar a una muestra de la población femenina ecuatoriana, y así identificar los polimorfismos que son más frecuentes o dañinos. De esta forma se puede determinar la genética poblacional y redefinir que terapias pueden ser más eficaces en la población ecuatoriana.

El estudio de mutaciones en genes que intervienen en el crecimiento y proliferación celular es una herramienta valiosa en la clasificación de tipos de tumores a nivel genético, los diversos tipos de cáncer de seno tienen alteraciones genéticas específicas y la forma de tratarlos también difiere entre ellos; sin embargo, todavía existen discrepancias y falencias en los parámetros de clasificación que pueden llevar a un tumor a ser pobremente caracterizado y mal clasificado, y por ende no se puede aplicar la terapia más adecuada. Es por esta razón que se necesita identificar genes que varíen entre los distintos tipos de cánceres y que brinden información más clara para su diagnóstico (Suter & Marcum, 2007).

La proteína AKT1 es una cinasa que tiene un papel fundamental en la proliferación y crecimiento celular, se ha reportado que mutaciones en el gen AKT1 producen proteínas anómalas que pueden estar relacionadas con la aparición del cáncer, además se ha predicho por medio de bioinformática que la presencia de los SNPs E319G y P388T podrían tener el mismo efecto en la proteína que otras mutaciones antes detectadas en cáncer de seno (Shanthi, Rajasekaran, & Ramanathan, 2014).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen AKT1 en pacientes mujeres del Hospital SOLCA núcleo Quito que padecen de cáncer de mama y en un grupo control de mujeres sanas.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de nucleótido simple en el gen AKT1 en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y en un grupo control de mujeres sanas de la ciudad de Quito.
- Correlacionar la presencia de polimorfismos de nucleótido simple en el gen AKT1 entre el grupo control y el grupo de estudio.
- Analizar la asociación de los polimorfismos estudiados con las características histopatológicas e inmunohistoquímicas de la enfermedad.

1.4. MARCO TEÓRICO

1.4.1. CÁNCER

Se denomina cáncer a las enfermedades que presentan un crecimiento descontrolado de células atípicas, las cuales pueden diseminarse a otros tejidos del cuerpo (Instituto Nacional del Cáncer, 2014).

Los mecanismos de proliferación y crecimiento celular regulan el nacimiento de nuevas células y la muerte de células viejas, es así como se mantiene un balance y se permite la renovación de los tejidos a lo largo de la vida del individuo. El cáncer aparece cuando estos complejos mecanismos de regulación se alteran debido a daños genéticos, estas alteraciones pueden ser producidas por la exposición a carcinogénicos y presentarse en células somáticas, o también pueden ser producto de mutaciones hereditarias en la línea germinal. La neoplasia es el crecimiento de un tejido de forma anormal que se mantiene aislado, hasta que empieza a diseminarse en un proceso llamado metástasis (Lodish, y otros, 2005).

1.4.1.1. ANGIOGÉNESIS

El tumor es un conglomerado de células que necesitan irrigación sanguínea para crecer de forma exponencial, induciendo un proceso denominado *angiogénesis* que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos para la buena distribución de nutrientes y oxígeno hacia las células del tumor, con lo que se incrementa el número de células tumorales y mutaciones adicionales. A su vez, la formación de nuevos vasos sanguíneos favorece la migración de células cancerosas hacia otros tejidos, produciendo de esta forma la metástasis (Luque & Herráez, 2001).

En la Figura 1 se ilustra el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis puede ocurrir en diferentes etapas del desarrollo del tumor dependiendo de su naturaleza y del microambiente. La mayoría de tumores empiezan a crecer como nódulos sin vascularización hasta que alcanzan un nivel de equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular programada o apoptosis; entonces se inicia la angiogénesis

para permitir el crecimiento exponencial de las células tumorales a través de un desprendimiento perivascular y la dilatación de los vasos. Posteriormente, se produce la formación de nuevos vasos y su maduración por medio de la captación de células perivasculares (Bergers & Benjamin, 2003).

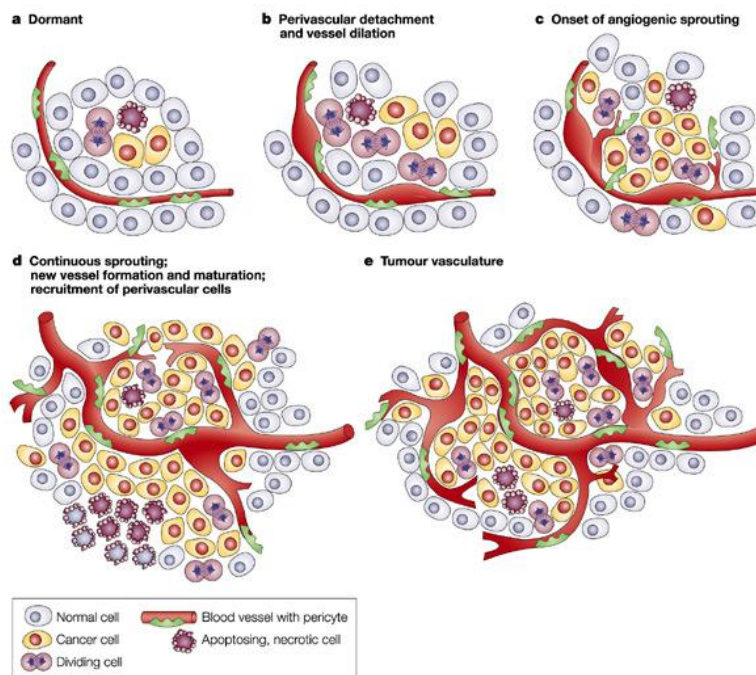


Figura 1. Angiogénesis en el desarrollo del tumor. (a) La mayoría de tumores empiezan a crecer como nódulos sin vascularización; (b) inicia la dilatación del vaso y separación del tejido perivascular; (c) luego aparece un brote del nuevo vaso; (d) el nuevo vaso madura y es recubierto con células perivasculares; (e) la angiogénesis continúa a medida que el tumor crece y necesita irrigar zonas con pocos nutrientes o hipoxia Fuente: Bergers y Benjamin, 2003.

1.4.1.2. METÁSTASIS

La diferencia entre un tumor benigno y un tumor maligno o cancerígeno consiste en que el primero permanece contenido en una cápsula fibrosa y sus células se encuentran adheridas entre sí, por lo que no presentan un peligro para la vida, mientras que un tumor cancerígeno presenta la diseminación de células malignas hacia otros tejidos en un proceso llamado metástasis para producir un tumor secundario. En la Figura 2 se señalan algunos de los factores que inducen la formación de células cancerígenas (Lodish, y otros, 2005).

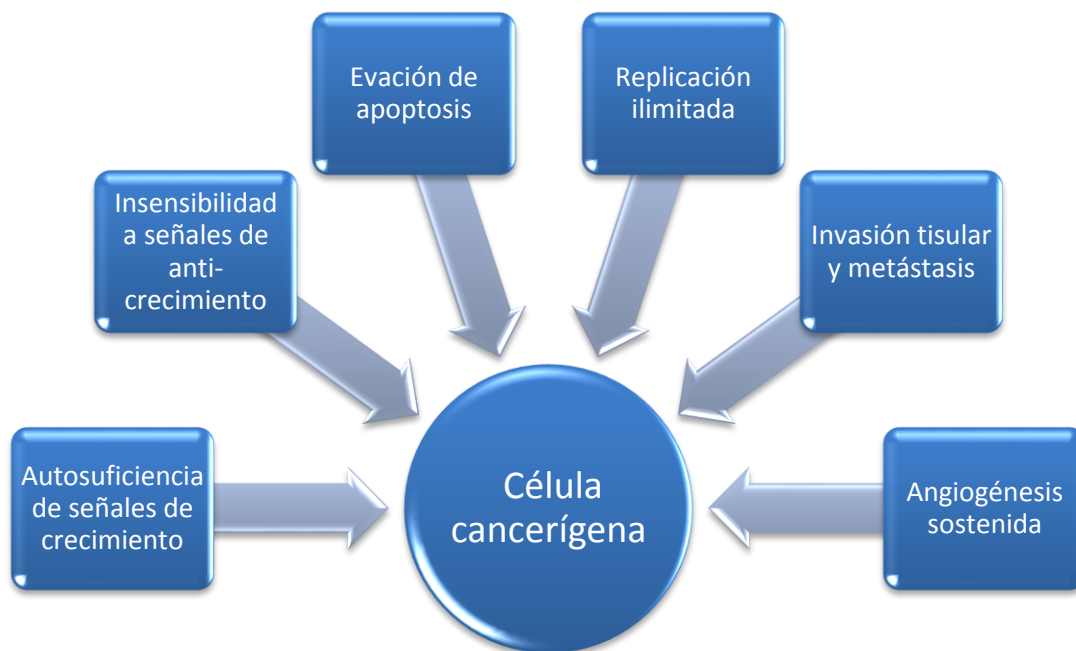


Figura 2. Factores que inducen la transformación de una célula carcinogénica. Entre estos factores se encuentran la presencia de señales de crecimiento, la falta de sensibilidad a señales de disminución de crecimiento, evasión del mecanismo de muerte celular programada, formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan al tumor e invasión de tejidos. Fuente: Lodish, et al, 2005.

1.4.1.3. GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER

Desde el punto de vista genético, el cáncer puede generarse debido a mutaciones en protooncogenes, genes supresores de tumores, o ser el resultado de interacciones de micro ARNs. Conociendo que una mutación es un cambio en el material genético que puede ser transmitida a una célula hija (Watson, 2006), estas alteraciones se pueden presentar en células germinales de un individuo, predisponiendo a la siguiente generación a desarrollar cáncer, ya que todas las células del cuerpo de su progeie poseerán la misma mutación. Sin embargo, la mayoría de cánceres se originan a partir de alteraciones esporádicas en células somáticas (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2007).

1.4.1.4. PROTOONCOGENES Y ONCOGENES

Los protooncogenes tienen función celular normal y sus productos son reguladores de procesos biológicos relacionados con el ciclo celular, pero cuando presentan alteraciones se convierten en oncogenes tumorigénicos,

los mismos que codifican proteínas que inducen la formación de células neoplásicas, por lo que al producto de un oncogén se le denomina oncoproteína. Los oncogenes se expresan de forma dominante, debido a que si un protooncogén presenta alteraciones en al menos uno de sus alelos y produce una oncoproteína, su efecto se va a manifestar en forma de neoplasia a pesar de que el otro alelo no presente alteraciones (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2007).

Un protooncogén necesita una señal externa para poder expresarse, mientras que un oncogén no requiere una señal externa para desencadenar una ganancia de función de la oncoproteína que codifica (Luque & Herráez, 2001).

Las principales causas de la activación de los oncogenes son rearrreglos cromosómicos, mutaciones y amplificación de genes. En el caso de rearrreglos a nivel cromosómico se pueden dar translocaciones o inversiones que yuxtapongan o fusionen oncogenes con genes que poseen promotores muy activos. Las mutaciones pueden producirse por exposición a cancerígenos ambientales y alteran la estructura de la proteína que codifican. La amplificación de genes es la reproducción de un fragmento de ADN en múltiples copias. En procesos cancerígenos los segmentos amplificados contienen muchos genes que están multiplicados de forma aberrante, por ejemplo en cáncer de mama, miembros de la familia de oncogenes que codifican la ciclina D1 o CCND1 suelen estar amplificados (Croce, 2008).

Los productos de los oncogenes se pueden clasificar en algunas categorías: factores de transcripción, complejos remodeladores de cromatina, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de señal y reguladores de apoptosis. Translocaciones cromosómicas pueden potenciar la producción de elementos oncogénicos o crear proteínas quiméricas debido a la fusión de genes, a su vez las proteínas anómalas encargadas de remodelar la arquitectura de la cromatina pueden acetilar, desacetilar y metilar nucleosomas e histonas libres interviniendo en la transcripción del ADN (Croce, 2008).

Los receptores de factores de crecimiento que se encuentran más involucrados en la angiogénesis de varios cánceres son los receptores del factor de crecimiento vascular (VEGFR) y del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Arteaga, 2002) .

Se ha propuesto que la aparición de cáncer se debe a la acumulación de mutaciones que se dan paulatinamente, sin embargo, se ha demostrado que un conjunto de mutaciones que se presentan en un solo evento catastrófico de la división celular y que cuya reparación no es totalmente viable puede desencadenar cáncer, este evento se llama cromotripsis y se ha reportado en 2% al 11,06% de los cánceres de mama (Stephens, Greenman, & B, 2011). En la Figura 3 se muestra la presencia de translocaciones y amplificaciones al final de los puntos de control que demuestran cromotripsis en muestras de cáncer de mama (Goncalves, Warner, Luo, & Ellis, 2014).

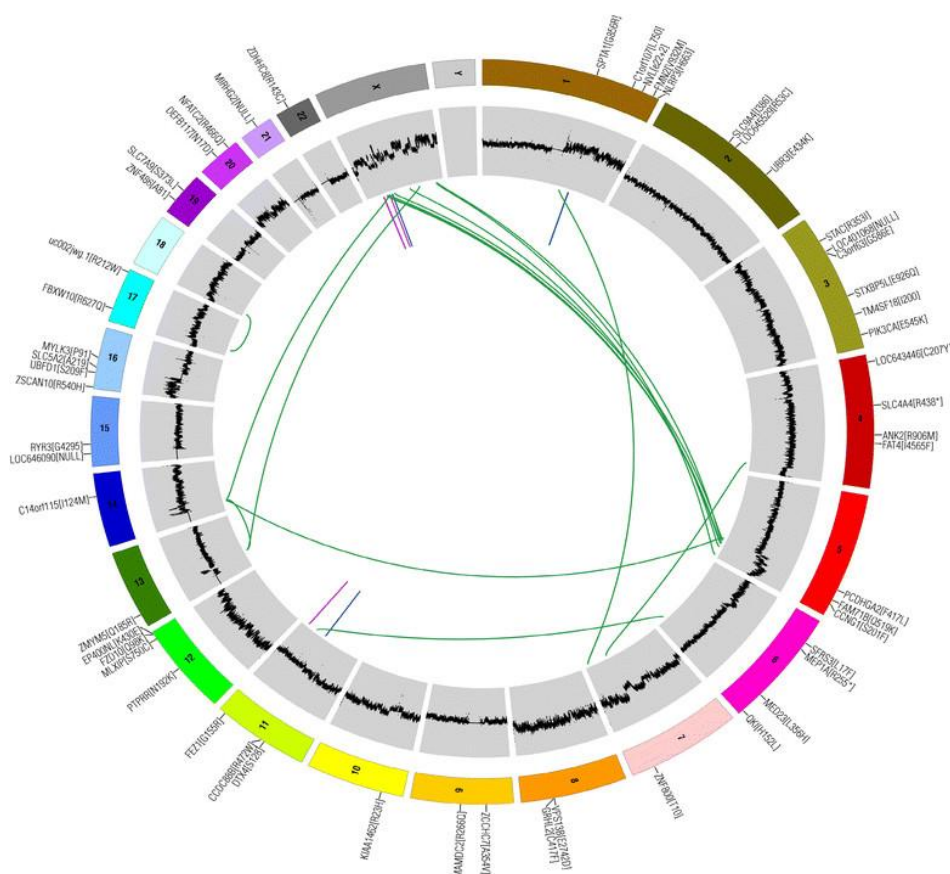


Figura 3. Circos plot de alteraciones genéticas en cáncer de mama. Este gráfico demuestra la presencia de cromotripsis al haber translocaciones y amplificaciones al final de los puntos de control en una muestra de cáncer de mama. Fuente: Goncalves et al, 2014.

1.4.1.5. GENES SUPRESORES DE TUMORES

Los TSG guardianes o gatekeepers son genes que controlan los puntos de control de las células en el ciclo celular o inducen la apoptosis para bloquear la aparición de tumores. Las mutaciones con pérdida de función en los genes guardianes dan lugar a una acumulación celular incontrolada.

Por otro lado los TSG cuidadores o caretakers codifican proteínas encargadas de la detección y reparación de las mutaciones, proteínas envueltas en las disyunciones cromosómicas en la mitosis y en la muerte celular programada. Las mutaciones en estos genes que generen pérdida de función permiten la acumulación de mutaciones en los oncogenes y en TSG guardianes. A diferencia de los oncogenes las mutaciones en los genes supresores de tumores es recesiva, ya que cuando existe al menos un alelo no mutado que codifique una proteína funcional, habrá actividad antitumoral (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2007).

1.4.2. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de seno o mama es el crecimiento de células cancerígenas en los conductos mamarios o en los lobulillos del seno y que puede diseminarse a tejidos normales circundantes o alejados por medio de metástasis. La mayoría de casos de cáncer de mama ocurre en mujeres, aunque el 1% de los casos se presenta en hombres (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

1.4.2.1. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA

a. Carcinoma Ductal in situ (CDIS)

El CDIS es un carcinoma no invasivo que se origina en el epitelio que reviste los conductos lácteos (Figura 4), la denominación *in situ* se debe a que no se propaga fuera de los conductos por lo que no representa un peligro para la vida, sin embargo su presencia aumenta el riesgo de desarrollar un cáncer invasivo en ambas mamas. La mayoría de los tumores

del tipo CDIS no son palpables por lo que la detección a través de mamografías es fundamental, además brinda información valiosa para un procedimiento quirúrgico posterior. Alrededor del 75% de los tumores del tipo CDIS expresan el receptor de estrógeno (ER) (International Agency for Research on Cancer, 2003).

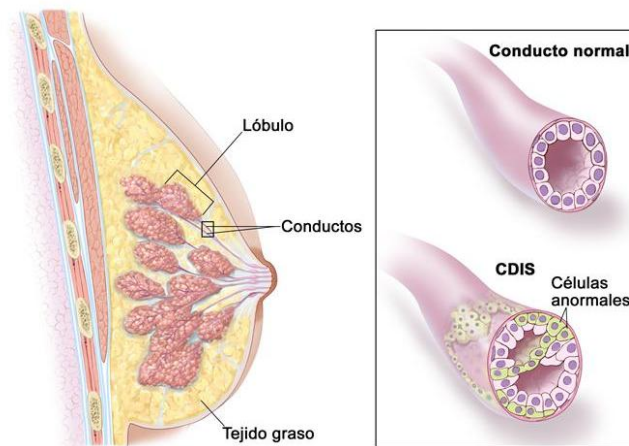


Figura 4. Carcinoma ductal in situ. Las células cancerígenas en el CDIS se originan en los conductos lácteos pero no se propagan a otros tejidos. Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, 2014.

b. Carcinoma Ductal Invasivo (CDI)

Corresponde a un grupo heterogéneo de tumores que no exhiben suficientes características para clasificarlos en un grupo histológico específico. Este tipo de cáncer corresponde al 40 al 75% de los casos de cáncer de mama. El carcinoma ductal invasivo se origina en los conductos lácteos que transportan la leche desde los lobulillos al pezón (Figura 5), recibe la denominación de carcinoma al generarse en el epitelio que reviste el conducto lácteo e invadir otros tejidos del seno, ganglios linfáticos u otros tejidos del cuerpo. El CDI no tiene características macroscópicas específicas, su tamaño varía de 10 a 100 mm, su consistencia puede ser firme o incluso dura al tacto, con bordes indefinidos y se lo ha relacionado con mutaciones en el gen BRCA1 (International Agency for Research on Cancer, 2003).

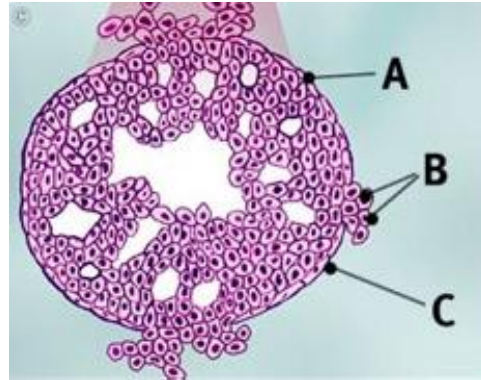


Figura 5. Sección transversal del conducto mamario con carcinoma ductal infiltrante. A, células normales. B, células cancerosas invaden la membrana basal. C, membrana basal. Fuente: Breastcancer.org, 2014.

c. Carcinoma Lobulillar in situ (CLIS)

El carcinoma lobulillar in situ es una neoplasia caracterizada por la proliferación de células pequeñas y que carecen de cohesión, se origina en el epitelio de la unidad ductal-lobulillar terminal (lóbulo) donde puede haber intervención del ducto terminal. La denominación de *in situ* se refiere a que las células anómalas no han salido del lobulillo (Figura 6). Su frecuencia es de menos del 1% de los cánceres de seno, pero su presencia constituye un factor de riesgo no obligatorio para el desarrollo de un carcinoma invasivo (International Agency for Research on Cancer, 2003).

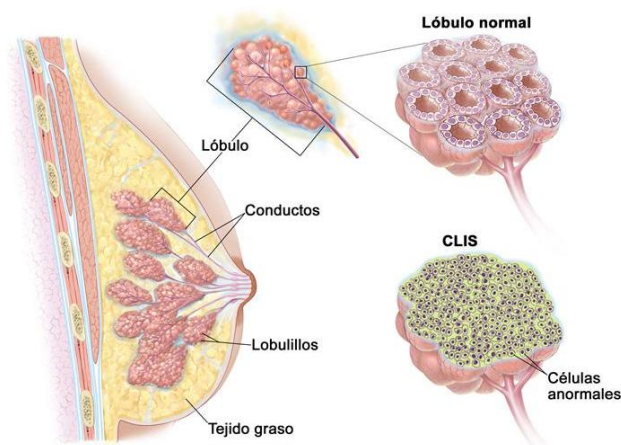


Figura 6. Carcinoma lobulillar in situ. Las células cancerígenas del CLIS se originan en el epitelio de los lobulillos, glándulas donde se produce la leche, sin embargo las células anómalas no salen hacia otros tejidos. Fuente: instituto Nacional del Cáncer, 2014.

d. Carcinoma Lobulillar Invasivo (CLI)

El Carcinoma lobulillar invasivo o infiltrante se origina en los acinos glandulares y se disemina a otros tejidos al atravesar la membrana basal (Figura 7). El CLI representa del 5 al 15% de los tumores invasivos del seno y puede originar carcinoma ductal infiltrante. Los tumores de CLI presentan células pequeñas con déficit de cohesión que aparecen dispersas individualmente a través de un tejido conectivo fibroso o forman hileras lineales que invaden el estroma, usualmente se encuentran envolviendo los conductos sanos (International Agency for Research on Cancer, 2003).

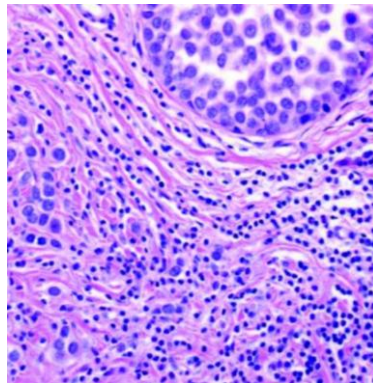


Figura 7. Micrografía de carcinoma lobulillar invasivo (inferior izquierda) y carcinoma lobulillar in situ (superior derecha). Fuente: International Agency for Research on Cancer, 2003.

1.4.2.2. ESTADIAJE DEL CÁNCER DE MAMA

El estadio define el tamaño del tumor y su diseminación hacia ganglios linfáticos u otras regiones del cuerpo. En cáncer de seno el estadio va desde 0 hasta IV en el nivel de gravedad.

a. Estadio 0

En el estadio 0 se encuentran los cánceres que no se han propagado fuera de su lugar de origen, por lo que no se encuentran células cancerosas en otros tejidos normales circundantes. En el estadio 0 se encuentran carcinomas como CLIS, CDIS y la enfermedad de Paget del pezón

b. Estadio I

En el estadio I se agrupan los tumores cancerígenos que invaden el tejido normal circundante. Se divide en estadio IA y IB (Figura 8). El estadio IA describe tumores de hasta 2 centímetros pero que no se han extendido a

ganglio linfáticos. Por otro lado, el estadio IB describe grupos de células inferiores a 2 mm en los ganglios linfáticos con o sin presencia de tumores menores a 2 cm en el seno (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

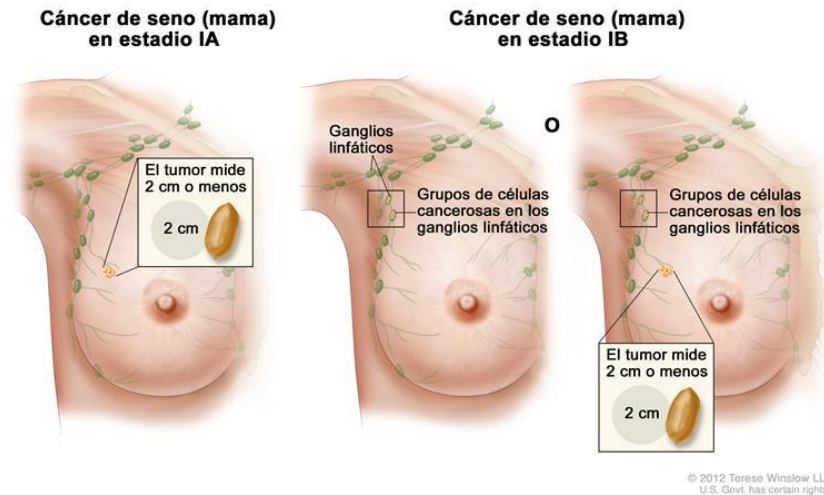


Figura 8. Cáncer de mama en estadio IA y IB. En el estadio IA el tumor puede medir dos centímetros o menos, mientras que en el estadio IB se encuentran células cancerosas en ganglios linfáticos con o sin presencia de tumor de hasta dos centímetros. Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, 2015.

c. Estadio II

El estadio II se divide en IIA y IIB, ambos mostrados en la Figura 9. El estadio IIA describe el cáncer invasivo en el que no se encuentra tumor en el seno, sin embargo presenta células cancerígenas que superan los 2 mm en uno a tres ganglios linfáticos. También puede presentarse un tumor de hasta 2 cm que se ha propagado a ganglios linfáticos auxiliares, o el tumor mide de 2 a 5 cm pero no se ha diseminado a ganglios linfáticos axilares.

Los tumores del estadio IIB miden de 2 a 5cm con presencia de células cancerosas en uno a tres ganglios linfáticos, o pueden ser tumores de más de cinco centímetros que todavía no se han diseminado a ningún ganglio linfático (Instituto Nacional del Cáncer, 2014).

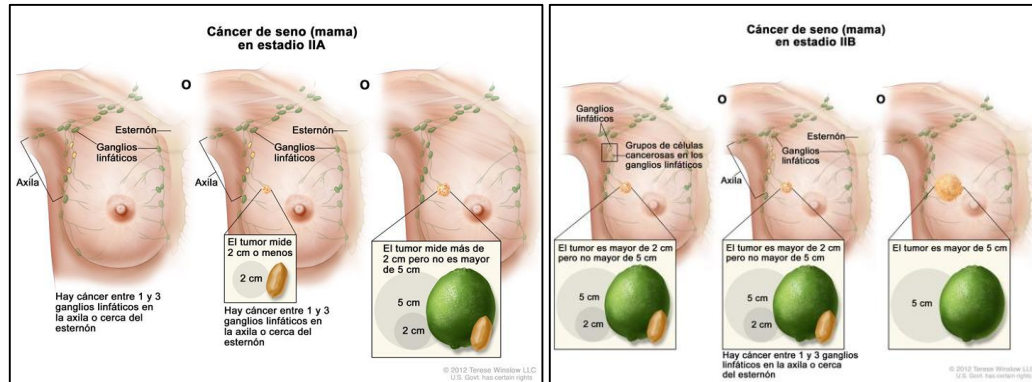


Figura 9. Cáncer de mama en estadio II. El estadio IIA puede comprender cáncer en hasta tres ganglios axilares con o sin presencia de un tumor sólido en el seno, o a su vez la presencia de un tumor de entre cinco y dos centímetros. El estadio IIB comprende tumores sólidos de entre dos y cinco centímetros con presencia de células cancerígenas en tres ganglios linfáticos, o a su vez un tumor de más de cinco centímetros. Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, 2015.

d. Estadio III

El estadio III se divide en IIIA, IIIB (Figura 10) y IIIC (Figura 11) en función de su gravedad. El estadio IIIA comprende los tumores mayores a 5 cm que se han diseminado hasta tres ganglios linfáticos, o a casos en que el cáncer se encuentra en cuatro a nueve ganglios y no hay presencia de tumor o éste es de cualquier tamaño. En el estadio IIIB el tumor puede tener cualquier tamaño y el cáncer se ha diseminado a la pared torácica o la piel del seno, a su vez el cáncer pudo haberse diseminado a no más de nueve ganglios linfáticos (Instituto Nacional del Cáncer, 2015).

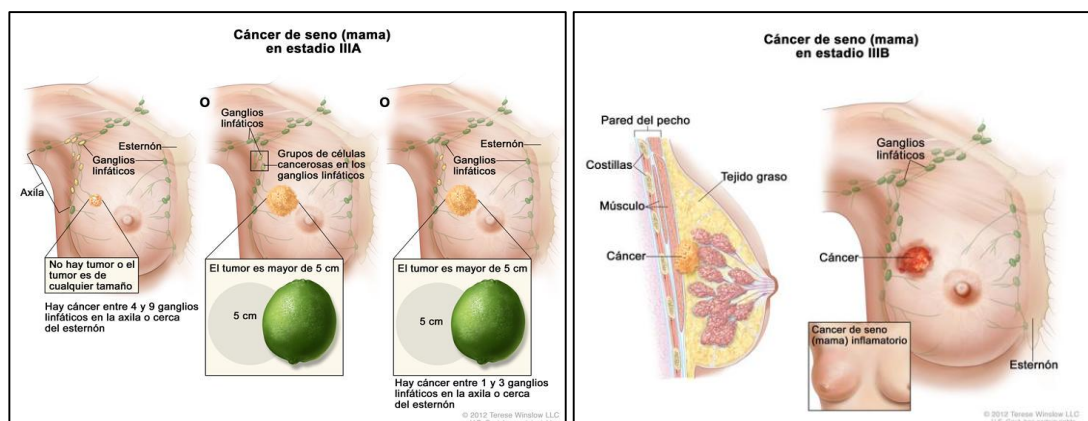


Figura 10. Cáncer de mama en estadio IIIA y IIIB. El estadio IIIA comprende los tumores de más de cinco centímetros con tres ganglios linfáticos afectados, o casos de hasta nueve ganglios linfáticos afectados sin presencia de tumor. El estadio IIIB comprende los cánceres en los que la pared torácica o la piel del seno se encuentran comprometidas. Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, 2015.

El cáncer de mama en estadio IIIC está caracterizado por tumores de cualquier tamaño con ulceración en la piel o a su vez el cáncer ya se ha diseminado a más de diez ganglios linfáticos. Como se muestra en la Figura 11 los ganglios linfáticos afectados pueden estar en la axila, encima o debajo de la clavícula o cerca del esternón.

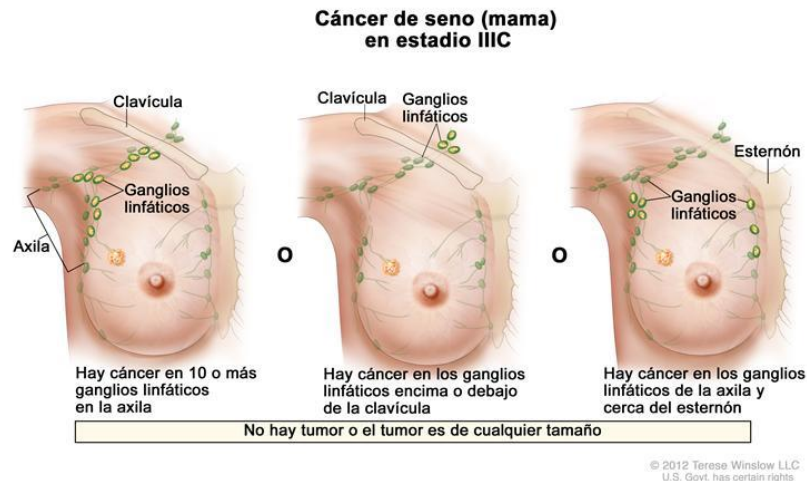


Figura 11. Cáncer de mama en estadio IIIC. El estadio IIIC se caracteriza por la presencia de cáncer en diez o más ganglios linfáticos de la axila, ganglios linfáticos cercanos a la clavícula o en ganglios del esternón. Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, 2015.

e. Estadio IV

El cáncer de mama en estadio IV se ha diseminado a otros órganos como huesos, cerebro, pulmones o hígado como se muestra en la Figura 12.

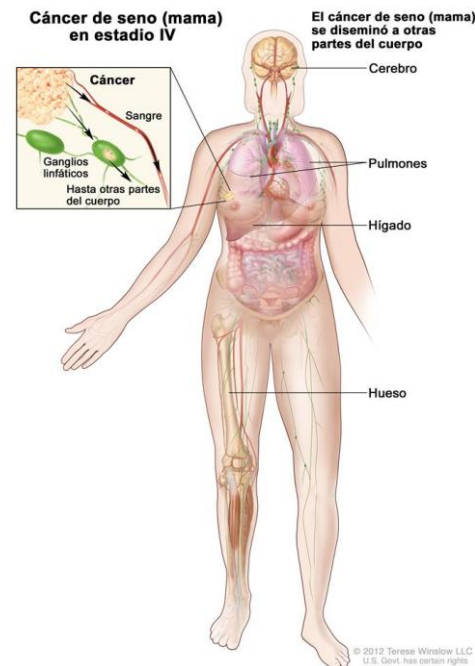


Figura 12. Cáncer de mama en estadio IV. En este estadio el cáncer se disemina al cerebro, pulmones, hígado o los huesos. Fuente: Instituto Nacional del Cáncer, 2015.

1.4.2.3. CLASIFICACIÓN MOLECULAR

Existen varias plataformas que clasifican al cáncer de mama basándose en su expresión génica, de las cuales la clasificación intrínseca (Intrinsic Subtype Classification) brinda la información biológica más valiosa y clasifica al cáncer de mama en seis subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, HER 2 positivo, basal (basal-like), normal (normal breast) y bajo en claudinas (claudin-low) (Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012).

El Consejo Internacional de Expertos en cáncer de mama de San Gall (2013) ha reconocido la importancia de la clasificación molecular para mejorar la aplicación de tratamientos en función de las características histológicas y moleculares del tumor, además ha aceptado que la diferenciación en subtipos no solo se puede realizar mediante arrays genéticos sino también por inmunohistoquímica. La identificación de subtipos se basa en la caracterización inmunohistoquímica de la presencia del receptor de estrógeno ER, receptor de progesterona PgR, la proteína Ki-67 y del protooncogén HER2. Las cinco definiciones patológicas que el consejo ha

establecido se encuentran resumidas en la Tabla 1 (Goldhirsch, y otros, 2013).

Tabla 1. Definiciones de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Estas definiciones han sido aceptadas por el Consejo Internacional de Expertos en Cáncer de Seno de San Gall del 2013. Fuente: Goldhirsch, et al, 2013.

Subtipo Intrínseco	Definición Clínico-patológica	Características
Luminal A	Luminal A	ER y PgR positivo HER 2 negativo Ki-67 <14%
Luminal B (HER 2 negativo)	Luminal B (HER 2 negativo)	ER positivo HER 2 negativo Ki-67 ≥14% PgR 'negativo o bajo'
Luminal B (HER 2 positivo)	Luminal B (HER 2 positivo)	ER positivo HER 2 amplificado en 17q12 o sobre expresado Cualquier valor de Ki-67 y PgR
HER 2 positivo	HER 2 positivo	HER 2 amplificado o sobre expresado ER y PgR ausentes
Basal	Triple Negativo (ductal)	ER y PgR ausentes HER 2 negativo

a. Luminal A y Luminal B

El subtipo de cáncer de seno luminal A representa el 50-60% del total de casos. Basándose en sus perfiles moleculares, todos los casos de carcinoma lobular in situ pertenecen a tumores luminal A, así como la mayoría de carcinomas lobulares infiltrantes. Los pacientes con este subtipo de cáncer tienen un buen pronóstico, su tasa de recaída es de 27,8%, además de una supervivencia de 2,2 años a partir de la recaída. Por otro lado, el subtipo luminal B corresponde del 10-20% de los cánceres de mama, tiene un fenotipo más agresivo, peor pronóstico y una tasa de recaída elevada. Los subtipos luminal A y B no expresan ER pero su

pronóstico es muy diferente, por lo cual se han buscado marcadores moleculares para diferenciarlos y aplicar un tratamiento más eficaz (Kennecke, y otros, 2010). La expresión de Ki-67 y PgR son importantes para la diferenciación entre los subtipos luminal A y luminal B, sin embargo la medición de Ki-67 no ha sido estandarizada debido a la alta variabilidad entre laboratorios para encontrar un punto de corte consenso entre un nivel 'alto' y 'bajo' de expresión de esta proteína (Goldhirsch, y otros, 2013).

b. HER 2 Positivo

Los cánceres de seno del subtipo HER 2 positivo corresponden del 15 al 20% del total de casos y presentan un mal pronóstico. El subtipo HER 2 está caracterizado por una alta expresión del gen HER 2 y de otros genes involucrados en la vía de HER 2, además exhibe la sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación celular y más del 40 % tienen mutaciones en el gen p53 (Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012).

c. Subtipo Basal (Basal-like)

El subtipo basal de cáncer de mama representa del 10-20% de los carcinomas de seno y su término se acuña debido a que expresan genes generalmente presentes en células mioepiteliales incluyendo citiqueratinas, caderinas, CD44 y EGFR. El cáncer del subtipo basal está caracterizado por una aparición a edad temprana, gran tamaño al momento del diagnóstico y frecuentemente daños en el nódulo linfático (Bosch, Eroles, Zaragoza, Viña, & Lluch, 2010). La característica más predominante de este tipo de tumor es la ausencia de expresión de ER, PgR y del receptor HER 2, por lo cual es también llamado en la práctica como Triple Negativo (Triple Negative, TN), sin embargo éstos no son términos equivalentes desde que se encontró una discordancia del 30% entre ambos grupos (Kreike, van Kouwenhove, Horlings, & Weigelt, 2007).

Los tumores tipo basal tienden a ser carcinomas con altos índices de mitosis y necrosis, los patrones de recaída en metástasis es agresiva con predominancia a órganos abdominales, pulmones, sistema nervioso central y nódulos linfáticos (Kennecke, y otros, 2010). Los altos índices de mutaciones

en el gen p53 y en el gen supresor BRCA1 pueden explicar la alta agresividad del tumor del subtipo basal y su pronóstico tan desfavorable (Sorlie, Perou, & Tibshirani, 2001).

d. Subtipo Normal (Normal Breast)

Los tumores pertenecientes a este subtipo abarca a aproximadamente el 5% de los carcinomas de seno, no han sido caracterizados profundamente pero se ha identificado la expresión de genes característicos de tejido adiposo, la expresión de ER, PgR y HER 2 es limitada, por lo cual son considerados como triple negativo sin ser clasificados como parte del subtipo basal al ser negativos para CK5 y EGFR. Existen debates sobre su existencia debido a que podrían ser resultado de contaminaciones en los microarrays, esta idea se fundamenta en la ausencia de casos de tumores del subtipo normal cuando las células neoplásicas son aisladas de tumores por micro disección (Weigelt, Mackay, & A'Hern, 2010).

e. Subtipo bajo en Claudinas (Claudin-low)

El subtipo bajo en claudinas se encuentra jerárquicamente cerca del subtipo basal y fue identificado en 2007 como se muestra en la figura 13. Se caracteriza por una baja expresión en genes involucrados en uniones estrechas y adhesión intracelular como claudinas, cingulina, ocludina y E-caderina. Los tumores bajos en claudina son TN en su mayoría, sin embargo un 20% de estos tumores son positivos para receptores hormonales y presentan baja expresión de genes de proliferación celular (Prat, Parker, & Karginova, 2010). Su pronóstico a largo plazo es pobre y posee una respuesta insuficiente a la quimioterapia (Prat, A, & Perou, 2011).

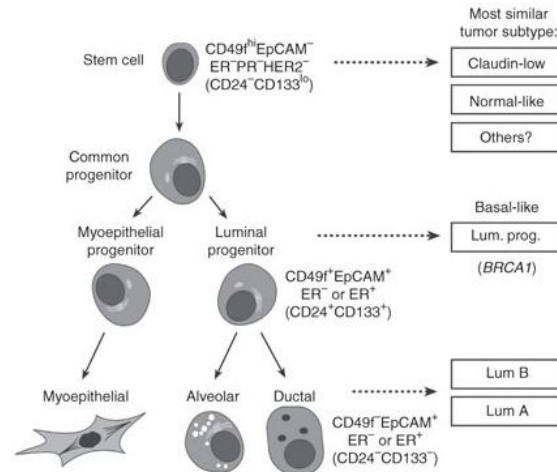


Figura 13. Modelo esquemático de la jerarquía del epitelio del seno y posibles relaciones con los subtipos de cáncer de seno. Los perfiles de expresión revelan similitudes entre la población progenitora de luminal y el subtipo basal. Se especula que el subtipo HER 2 positivo surge a través de la amplificación del amplicón HER 2 en una célula blanco relacionada con el linaje luminal. Fuente: Lim, et al, 2009.

1.4.2.4. FACTORES DE RIESGO

Existen factores de riesgo que alteran la probabilidad que una persona sufra cáncer de mama, unos no están relacionados con elecciones personales mientras que otros están relacionados al estilo de vida de la persona (American Cancer Society, 2015).

a. Factores no controlables

- Género: Las mujeres tienen 100 veces más probabilidad de contraer cáncer de seno que los hombres ya que producen mayor cantidad de hormonas femeninas como estrógeno y progesterona, estas hormonas inducen el crecimiento de células cancerosas.
- Edad: El riesgo de padecer cáncer de mama aumenta con la edad, aproximadamente solo uno de ocho casos de cánceres de mama se detectan en mujeres menores de 45 años. La tasa de incidencia tiene su valor más alto en edades entre 60 y 64 años en mujeres de Quito (Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleo de Quito, 2014).
- Defectos genéticos: Los cánceres de seno de origen hereditario suelen deberse a mutaciones en los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2, en estos casos el cáncer aparece en edades más tempranas y el riesgo de padecer cáncer de ovario aumenta. El cáncer de origen

hereditario también puede deberse a mutaciones en los genes ATM, TP53, PTEN, CDH1 o CHEK2 (Suter & Marcum, 2007).

- Antecedentes familiares de cáncer de seno: El riesgo de que una persona desarrolle cáncer de mama se duplica si otra mujer en su familia ha sufrido de esta enfermedad, este riesgo se triplica si dos familiares directas han sufrido la enfermedad, aunque aproximadamente el 85% de las mujeres que han padecido cáncer de mama no han presentado historial familiar de esta enfermedad.
- Raza y origen étnico: Las mujeres asiáticas, hispanas e indoamericanas tienen un menor riesgo de padecer y morir de cáncer de mama en comparación a mujeres de raza blanca y negra.
- Tejido mamario denso: El término tejido mamario denso se confiere a las mujeres que poseen más tejido glandular y fibroso y menos tejido adiposo en sus senos. Las mujeres con tejido mamario denso tienen un riesgo de padecer cáncer de seno de 1,2 a 2 veces mayor que las mujeres con densidad promedio de sus senos.
- Afecciones benignas del seno: Algunas afecciones pueden incrementar el riesgo de padecer cáncer de seno y usualmente se agrupan en tres categorías. Las lesiones no proliferativas como fibrosis o quistes simples no aumentan el riesgo de padecer cáncer. La hiperplasia ductal usual o varios papilomas se agrupan como lesiones proliferativas sin atipia, las cuales muestran un crecimiento excesivo de células en el seno e incrementan hasta dos veces el riesgo de padecer cáncer. Las lesiones proliferativas con atipia son afecciones donde existe sobrecrecimiento de células con morfología anormal en el seno, aumentan de 3,5 a 5 veces el riesgo de padecer cáncer, en esta categoría se agrupan la hiperplasia ductal atípica y lobulillar atípica.
- Carcinoma lobulillar in situ: Es considerado el crecimiento descontrolado de células anormales en los lobulillos del seno, sin embargo estas células no atraviesan la pared de los lobulillos hacia el exterior. El CLIS no parece convertirse en cáncer invasivo si no es tratado pero puede aumentar el riesgo de siete a nueve veces de generar cáncer de seno.

- Menarquía temprana o menopausia tardía: Las mujeres con una o ambas de estas características tienen un riesgo ligeramente mayor de desarrollar cáncer de seno, ya que la exposición a estrógenos y progesterona ha sido más larga en estas personas (American Cancer Society, 2015; Instituto Nacional del Cáncer, 2014).

b. Factores controlables

- Peso: El sobrepeso y la obesidad son factores que aumentan el riesgo de padecer cáncer especialmente en mujeres postmenopáusicas ya que el tejido adiposo libera estrógenos que pueden aumentar el riesgo de cáncer. Además, se ha visto que las mujeres con sobrepeso tienden a mostrar niveles elevados de insulina en la sangre, los altos niveles de insulina han sido relacionados con el cáncer de seno (Ballard, Hunsberger, Blair, & Goodwin, 2009).
- Maternidad: Las mujeres que tienen hijos después de los 30 años de edad presentan un riesgo ligeramente mayor a desarrollar cáncer de seno, mientras que las mujeres que tienen hijos más jóvenes o que tienen embarazos múltiples disminuyen el riesgo (Britt, Ashworth, & Smalley, 2007).
- Consumo de píldoras anticonceptivas: El consumo de píldoras anticonceptivas que contienen hormonas aumenta ligeramente el riesgo de padecer cáncer de mama, sin embargo las mujeres que no han consumido píldoras anticonceptivas por diez años tienen el mismo riesgo de padecer de cáncer de seno que las mujeres que nunca las han consumido (Hunter, Colditz, & Hankinson, 2010).
- Lactancia: Este factor puede reducir ligeramente el riesgo de desarrollar cáncer de seno si el periodo de lactancia dura de un año y medio a dos años. La explicación puede ser que la lactancia disminuye el número total de ciclos menstruales, y que en la lactancia mueren gran cantidad de células del seno que podrían algún momento generar un cáncer (Russo, Moral, & Balogh, 2005).

- Consumo de bebidas alcohólicas: El consumo de alcohol aumenta el riesgo de sufrir cáncer, una mujer que consuma de dos a cinco bebidas alcohólicas al día tienen un aumento del riesgo de una y media vez más de desarrollar cáncer de seno (Hamakima, Hirose, & Tajima, 2002).
- Exposición a DMPA: El DMPA es una forma inyectable de progesterona que se administra como anticonceptivo y puede aumentar el riesgo de sufrir cáncer, sin embargo el riesgo disminuye al evitar su exposición por al menos cinco años (American Cancer Society, 2015; Instituto Nacional del Cáncer, 2014).

1.4.2.5. GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer puede ser el resultado de mutaciones somáticas esporádicas o de mutaciones heredables en las células germinales. Estas mutaciones frecuentemente afectan vías metabólicas como MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, proteína cinasas activadas por mitógenos), RB/E2F (proteína del retinoblastoma), P13K/AKT/mTOR y TP53 (gen que codifica la proteína p53) que son responsables de la proliferación y crecimiento celular. Generalmente el cáncer de seno se debe a la presencia de mutaciones esporádicas o amplificaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (TSG) (Schulz, 2007).

Hay una multitud de oncogenes envueltos en el desarrollo del cáncer de seno como HER 2, c-MYC y RAS que son estudiados intensamente, a su vez otros genes como el gen del receptor de estrógeno (ER), ciclina D1 y E, y la quinasa dependiente de ciclina son también importantes en la manifestación del cáncer de seno, los oncogenes involucrados en el desarrollo del cáncer de seno y su función están resumidos en la Tabla 2 (Suter & Marcum, 2007):

Tabla 2. Oncogenes involucrados en el cáncer de mama. Fuente: Suter y Marcum, 2007.

Gen	Localización	Proteína	Función
HER2	17q12	Quinasa - 25 kDa	Receptor de crecimiento celular
c-MYC	8q24	Fosfoproteína nuclear -	Factor de transcripción

62 kDa			
HRAS	11p15.5	GTPasa - 21kDa	Transducción de señales
CCND1	11q13	Ciclina D1	Regula CDK4/6
Ciclina E	19q12	Ciclina E	Regula CDK2
ERα	6q25.1	Proteína - 67 kDa	Transcripción

- HER2: Pertenece a la familia de genes HER y codifica para una proteína transmembrana que actúa como receptor de factor de crecimiento. La familia de receptores HER está involucrada en el crecimiento y proliferación celular, angiogénesis, interacción célula-célula, motilidad celular incrementada, metástasis y resistencia a la apoptosis. El gen HER2 está amplificado en 20 al 30% de los cánceres de seno, o la oncoproteína HER2 está sobreexpresada en el mismo porcentaje de los casos. La sobreexpresión de HER2 es casi exclusiva de los casos en los que el cáncer es de origen ductal, además está relacionado con altos índices de recurrencia y baja respuesta a quimioterapia o terapia hormonal. HER2 está involucrado en la activación de alrededor de media docena de vías metabólicas envueltas en el crecimiento celular, es por eso que ha sido un importante objeto de estudio en terapias que incluyen anticuerpos monoclonales, inhibidores de quinasa y oligonucleótidos antisentido (Hobday & Perez, 2005).
- c-MYC: Se expresa únicamente en una etapa del ciclo celular y acelera la entrada de la célula a la fase S, especialmente a través de la inducción de actividad ciclina E-CDK. La proteína del gen c-MYC funciona como un factor de transcripción que está envuelto en la regulación de una extensa red de genes que representan el 15% del total de genes humanos. El c-MYC está sobreexpresado en al menos tres veces del 1% al 94% de los casos de cáncer de seno, esta sobreexpresión suele preceder la amplificación de oncogenes y puede ser resultado de una elevada transcripción (Suter & Marcum, 2007).

- RAS: los genes RAS están ubicados en tres cromosomas diferentes: 1, 11 y 12 y codifican para enzimas quinasas involucradas en varias vías metabólicas. Una importante vía en la que está involucrada es la vía P13K/AKT/mTOR, RAS activa esta vía fosforilando a P13K lo que permite que la célula sobreviva al inhibir la apoptosis. RAS está asociado únicamente al 5% de los cánceres de mama y cuando éste está hiperactivo se debe a la sobreexpresión de EGF y/o HER2. Además, en los casos de cáncer de seno en los que RAS está involucrado se exhibe una mala prognosis (Eckert, Repasky, & Ülkü, 2004).
- Ciclinas D1 y E: Las ciclinas son proteínas que forman complejos con las enzimas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las CDKs son los motores que dan energía para que se lleven a cabo los eventos del ciclo celular, por lo que las ciclinas D1 y E son elementos reguladores críticos en el paso de fase G1 a S en el ciclo celular. La ciclina D1 está sobreexpresada en el 50% de los casos de cáncer de mama pero su gen está amplificado únicamente en el 13% al 20% de casos (Suter & Marcum, 2007).
- Receptores de estrógeno: Existen dos tipos de receptores de estrógenos: ER α y ER β ; cuyos genes se encuentran en cromosomas diferentes pero que comparten una similitud estructural. El estrógeno es una familia de hormonas sexuales que tienen un papel crítico en la carcinogénesis, por lo que sus receptores (ER) se han visto sobreexpresados en estadios tempranos de cáncer de mama, al punto de que dos tercios de tejidos de cáncer de seno sobreexpresan niveles mayores de ER en comparación a tejidos normales (Ideka & Inoue, 2004). Al unirse el estrógeno con su receptor ER α se forma un dímero que expone un dominio de unión al ADN y actividad transcripcional, a su vez algunos factores de crecimiento como EGF, IGF-I y TGF- α también se unen a ER y desencadenan una actividad mitótica en células cancerígenas del seno (Butt, McNeil, & Musgrove, 2005).

Mientras los oncogenes promueven el crecimiento y proliferación celular, los genes supresores de tumores lo inhiben de dos formas: los TSG

llamados gatekeepers detienen la división de las células dañadas, mientras que los caretakers se aseguran de que el ADN no esté dañado. Es por esta razón que la presencia de alteraciones en los TSG puede resultar en una pérdida de función que conlleve a crecimiento y proliferación celular descontrolados. En la Tabla 3 están resumidos los genes supresores de tumores involucrados en el desarrollo del cáncer de mama y sus funciones:

Tabla 3. Genes Supresores de Tumores involucrados en el cáncer de mama. Fuente: Suter y Marcum, 2007.

Gen	Localización	Proteína	Función
RB	13q14	Fosfoproteína nuclear	Gatekeeper
TP53	17p13	Fosfoproteína	Caretaker
BRCA1	17q21	Fosfoproteína nuclear	Caretaker
BRCA2	13q12	Fosfoproteína nuclear	Caretaker

- **BRCA1 y BRCA2:** Los genes BRAC son TSG caretakers y son importantes en el mantenimiento de la integridad del genoma de la célula, por lo que mutaciones en estos genes pueden incrementar el riesgo de padecer cáncer de seno a temprana edad. Los dominios de BRCA1 se unen a otras proteínas como ciclina D1, ER α y c-MYC, importantes en funciones de control de la proliferación y el ciclo celular, de hecho el gen BRCA1 es transcrito durante la fase G1 y a través de la fase S, al punto que BRCA1 detiene la división celular en los puntos de control en las fases S y G2/M (Schulz, 2007).
- **Retinoblastoma:** La proteína del retinoblastoma se une a ciento diez proteínas como quinasas reguladoras o reguladores de transcripción. Estas proteínas limitan el ciclo celular y la proliferación además restituyen la apoptosis celular. RB o su ruta metabólica está alterada en el 80% de los casos de cáncer haciéndolo un importante factor en la carcinogénesis, la pérdida de actividad de RB está presente en alrededor de un tercio de los casos de cáncer de mama y tiene un impacto negativo en la respuesta al tratamiento, la pérdida de actividad de RB puede ocurrir por una delección cromosómica, inactivación funcional a través de sobre expresión de ciclinas y mutaciones

intragénicas, sin embargo se requiere de mutaciones en otros genes como TP53 para la formación de un tumor (Suter & Marcum, 2007).

- TP53: EL producto del gen TP53 es la proteína p53, y entre sus funciones están el que el genoma permanece intacto luego de la división celular, detener el ciclo celular, promover la apoptosis, e inhibición de la angiogénesis, por lo que alteraciones en la ruta del gen TP53 pueden conllevar al cáncer de seno, por ejemplo la pérdida del punto de control quinasa CHK2 impide estabilizar la proteína p53. Alrededor del 20% al 40% de los cánceres de seno tienen una forma genética o epigenéticamente alterada del gen TP53, y está asociado a un mal pronóstico (Schulz, 2007).

1.4.3. RUTA PI3K/AKT1/mTOR

La ruta PI3K/AKT/mTOR es la ruta de señalización intracelular más importante y actúa en función de la disponibilidad de nutrientes y de la estimulación mediada por hormonas o factores de crecimiento, la importancia de la ruta se debe a su papel en la proliferación y el crecimiento celular (Figura 14). El heterodímero PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa) tiene el rol principal en esta ruta, consta de dos subunidades, una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110) que responden a la ausencia o presencia de una estimulación de los receptores tirosina-quinasa (RTKs) de factores de crecimiento EGFR, HER2, HER3 y HER4. PI3K fosforila PIP2 (phosphatidylinositol biphosphate) convirtiéndolo en PIP3 (phosphatidylinositol trisphosphate), esta fosforilación a través de PI3K puede ser inhibida por el supresor de tumores PTEN (phosphatase and tensin homolog) que desfosforila PIP3 a PIP2, la pérdida de PTEN y mutaciones en el gen que codifica PI3K son alteraciones aberrantes que causan varias enfermedades como cáncer de mama. Se ha sugerido que mutaciones de PI3K independientemente de Akt pueden desencadenar la formación de tumores. PIP3 se une a dominios específicos como los dominios homólogos a la plecstrina (PH) de proteínas blanco y las engancha a la membrana celular, dos de estas proteínas son la serina/treonina cinasa Akt (protein kinase B) y PDK-1 (phosphoinositide-depend kinase-1). Ya en la

membrana PDK-1 fosforila a Akt en uno de los dos pasos necesarios para la activación de Akt (Hennessy, Smith, & Ram, 2005).

La cinasa Akt monofosforilada es liberada en el citoplasma donde interactúa con mTORC2, un complejo que consta de mTOR, Rictor, mLST8 y Deptor, el dominio mTOR de mTORC2 es una serina/treonina proteína cinasa que fosforila a Akt en la serina 473 y la activa completamente (Wander, Hennessy, & Slingerland, 2011). La activación de Akt fosforila TSC2 con lo que inhibe TSC1/2, TSC actúa como una GTPasa que activa a Rheb, esto permite la fosforilación de PRAS40 y estimula mTORC1. mTORC1 es un complejo que consta de Raptor, mLST8 y PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40), es activado por la inhibición de TSC1/2 (tuberous sclerosis protein), un supresor de tumores y heterodímero de tuberina y hamartina, el cual actúa como una proteína de activación guanosa trifosfatasa por Rheb-GTP. mTORC1 actúa sobre el metabolismo celular y lleva a la vía de crecimiento anabólico a través de S6K1 (40S ribosomal protein S6 kinase 1) y 4EBP1 (eucaryotic initiation factor 4E binding protein) (Holz, 2012).

mTORC1 y mTORC2 son dos complejos que tienen diferentes modos de acción, mTORC1 es el objetivo de drogas como rapamicina aunque se ha observado que estos agentes también son suficientemente efectivos contra mTORC2, al punto de afectar el metabolismo y crecimiento celular del cáncer (Paplomata & O'Regan, 2014).

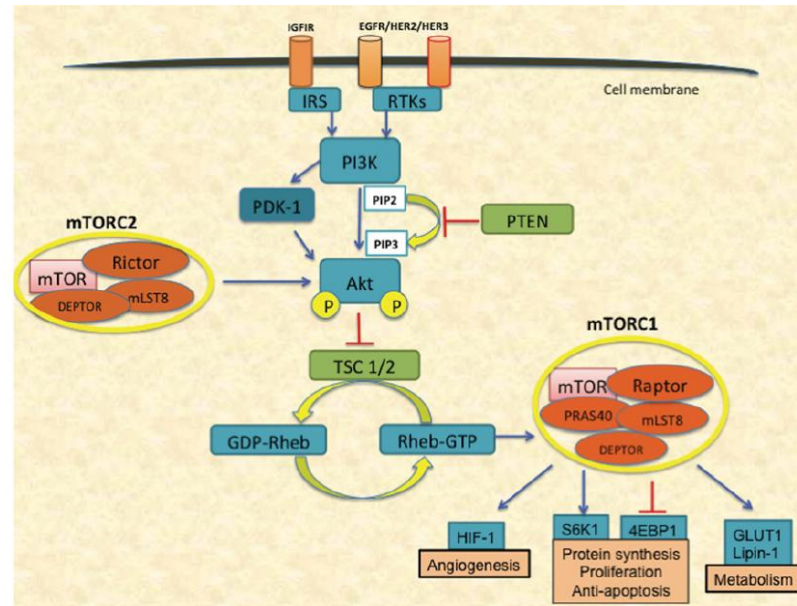


Figura 14. Ilustración de la ruta PI3K/Akt/mTOR. PI3K permite la fosforilación de PIP2 a PIP3 y la adhesión de Akt a éste en la membrana celular a través del dominio PH. PDK-1 monofosforila a Akt y la libera al citoplasma donde es fosforilado nuevamente por el complejo mTORC2, una vez activado Akt inhibe a TSC1/2 y con esto permite que Rheb-GTP active a mTORC1. mTORC1 actúa sobre el metabolismo celular y lleva a la vía de crecimiento anabólico. Fuente: Paplomata y O'Regan, 2014.

1.4.3.1. Gen AKT1

La familia de proteínas AKT tiene tres isoformas que están derivadas de distintos genes: AKT1/PKB α (cromosoma 14), AKT2/PKB β (cromosoma 19) y AKT3/PKB γ (cromosoma 1). El gen AKT1 se localiza en la posición citogenética 14q32.33 y es el homólogo humano uno del oncogén viral *v-akt*. El gen AKT1 humano tiene 14 exones que abarcan una región de 26,4Kb y un marco de lectura abierto de 1443 pb, en la figura 15 se muestran los exones del gen AKT1, su longitud y marco de lectura abierta.

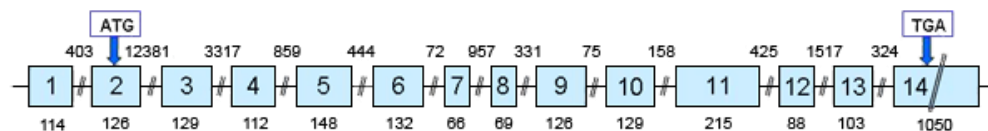


Figura 15. Esquema de exones y marcos de lectura abierto del gen AKT1 humano. EL gen AKT1 se encuentra en el cromosoma 14 y cuenta con 14 exones. ATG, lugar de inicio de transcripción; TGA, lugar de fin de transcripción. Fuente: Etro et al, 2010.

1.4.3.2. PROTEÍNA AKT1

El nombre oficial de la proteína AKT1 es RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, pero también es conocida como PKB α (Protein kinase B). AKT1 es una serina/treonina proteína cinasa codificada por el gen AKT1. Cataliza la fosforilación del grupo hidroxilo de serinas o treoninas de algunas proteínas.

La cinasa AKT1 regula muchos procesos incluyendo metabolismo, proliferación, sobrevivencia, crecimiento celular y angiogénesis. La proteína AKT1 consta de 480 aminoácidos, posee un dominio homólogo a la plecstrina (PH) en su región N-terminal, una corta región helicoidal, un dominio catalítico cinasa altamente conservado y un dominio regulador hidrófobo (Etro, Missiroli, & Buontempo, 2010). Los dominios PH son característicos de una gran variedad de proteínas implicadas en la señalización intracelular y permiten la unión de las cinasas a la membrana citoplasmática.

1.4.3.3. ALTERACIONES EN EL AKT1

Se ha reportado que una mutación somática 49G-A en el gen AKT1 que genera una sustitución de ácido glutámico a lisina en el aminoácido 17 (E17K) en el lugar de unión de AKT a lípidos, alterando las interacciones electroestáticas en la unión y formando nuevos puentes de hidrógeno con un ligando fosfoinositol. Esta mutación está localizada en el dominio PH de AKT1, generando un cambio conformacional en el dominio PH de la proteína y facilitando la unión de la proteína mutante a la membrana celular, esto genera la activación de AKT1 y estimula la señal corriente abajo, posteriormente transforma a las células y puede inducir a leucemia en ratones (Carpten et al., 2007) y transformación oncogénica en fibroblastos de embriones de pollo (Dannemann, Ross, Ueno, & Vogt, 2010). Se puede considerar que la localización alterada de AKT en la membrana plasmática promueve la oncogénesis a través de la vía PI3K/AKT. A su vez, esta mutación provoca que la proteína tenga menor sensibilidad a inhibidores

alostéricos de cinasa, dándole gran importancia a este tipo de mutaciones en cuanto al desarrollo de terapias que tienen como objetivo AKT.

La sustitución E17K ha sido encontrada en un estudio desarrollado por Carpten et al. (2007) en 5 de 61 (8%) casos de cáncer de seno, con esto se comprueba que la variante altera la conformación del dominio PH de AKT1 que resulta en la activación de la cinasa (Carpten, y otros, 2007).

Sin embargo, Kim et al (2008) encontró la variante E17K en el gen AKT1 en sólo 4 de 93 (4,3%) muestras de cáncer de seno en población coreana empleando la técnica de análisis de polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP), con lo que sugiere que esta variante no puede desempeñar un papel crucial en el desarrollo de los tipos más comunes de cáncer en humanos, a pesar de su función oncogénica comprobada.

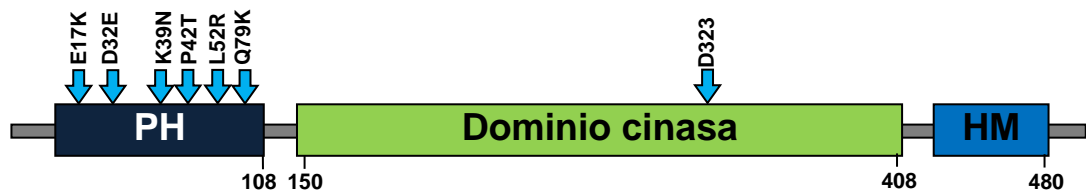


Figura 16. Mutaciones somáticas en la proteína AKT1 en cáncer de mama. PH, dominio homólogo a la plestrina. HM, dominio regulador hidrófobo. Fuente: Parikh et al, 2012.

Shanthi et al (2014) determinó a través de herramientas bioinformáticas que las variantes E17K, E17S, E319G, E319G, L357P Y P388T de la proteína AKT1 pueden producir efectos perjudiciales en la estructura y función de la cinasa. La evidencia computacional sugiere que estas variantes de AKT1 pueden tener el mismo comportamiento que E17K, y por lo tanto generar un impacto similar en el cáncer humano. Se sugiere que las variantes deben ser consideradas junto a E17K en el desarrollo terapéutico de nuevos inhibidores de AKT1 en cáncer humano.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS TUMORALES Y CONTROLES

Se analizó 91 muestras de tumores de mama fijados en parafina del Hospital de SOLCA de Quito. En la Tabla 4 se enumeran los criterios de inclusión, exclusión y eliminación de los casos.

Tabla 4. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de los casos y controles.

Criterio	Casos	Controles
Criterios de Inclusión	Mujeres que padecen de cáncer de mama. Mujeres ecuatorianas. Mujeres con historial clínico y análisis patológico del tumor.	Mujeres no diagnosticadas con cáncer de mama. Mujeres ecuatorianas. Mujeres con historial clínico.
Criterios de Exclusión	Mujeres no diagnosticadas con cáncer de mama. Mujeres no ecuatorianas. Mujeres sin historial clínico ni análisis patológico del tumor.	Mujeres diagnosticadas con cáncer de mama. Mujeres no ecuatorianas. Mujeres sin historial clínico.
Criterios de Eliminación	Muestras de ADN de tumor que presenten baja concentración o mala calidad.	Muestras de ADN de sangre periférica que presenten baja concentración o mala calidad.

En el estudio se analizaron 185 muestras de sangre periférica de mujeres sanas. El grupo control correspondió a mujeres entre 35 y 80 años de edad, sin historial personal de cáncer de mama ni cáncer de ovario. Las muestras del grupo control provinieron del banco de muestras del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UDLA y del Hospital Cantonal Machachi.

2.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

2.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA

La extracción de ADN de muestras de sangre periférica correspondientes al grupo control fue realizada utilizando el kit de extracción PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™).

2.2.2. EXTRACCIÓN DE ADN DE TUMORES FIJADOS EN PARAFINA

La extracción de ADN de tumores fijados en parafina se realizó a con el Kit de extracción PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante y adaptaciones realizadas por el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Se calentó el Baño María a 55°C al menos 10 minutos antes de seguir con el proceso. Con un bisturí estéril se realizaron varios micro-cortes de tejido aproximadamente 5 mm, colocando de 1 a 8 micro-cortes en un tubo Eppendorf estéril. Se añadió 1 mL de xylol o D-limoneno, se mezcló con vortex por 2 minutos y posteriormente se incubó la mezcla a 55°C por 5 minutos.

Luego de la incubación, la muestra se centrifugó durante 3 minutos a 15000 rpm y el sobrenadante fue descartado. Posteriormente se repitió el lavado con xylol o D-limoneno y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1mL de alcohol etílico absoluto 100% (V/V) en la muestra y se mezcló con vortex durante 30 segundos, luego se centrifugó la muestra durante 3 minutos a 15000 rpm y el sobrenadante fue descartado. Se repitió el lavado con alcohol etílico 100%(V/V) a RT.

Para permitir el secado de las muestras, se dejó el tubo abierto durante 15 minutos en la estufa a 37°C para evaporar los residuos de alcohol.

Una vez que las muestras estuvieron totalmente secas se inició el proceso de digestión, para lo cual se añadieron 180 uL de buffer de digestión PureLink™, 20 uL de proteinasa K (Invitrogen) y 20 µL de proteinasa K

(Quiagen) y se mezclaron con vortex durante 1 minuto. Para permitir la digestión las muestras se dejaron en incubación en Baño María a 55°C durante toda la noche (overnight).

Luego de la incubación las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a máxima velocidad. Posteriormente se transfirió el lisado (sobrenadante del tubo) a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL. Se agregó 20 uL de RNAsa al lisado, se mezcló brevemente con vortex e incubó la muestra a RT por 2 minutos.

Para permitir la lisis se añadieron 200 uL de Genomic Lysis Binding Buffer y se mezcló brevemente con el vortex, por último se agregaron 200 uL de etanol 96-100% al lisado.

La mezcla del lisado con Lysis Binding Buffer y etanol se colocaron en una columna de purificación PureLink sobre un tubo de colección, para luego centrifugarla a 10000 x *g* durante 1 minuto a RT. El líquido resultante fue desechado y se agregaron 500 µL de Wash Buffer 1 a la columna para luego centrifugarla a 10 000 x *g* por 1 minuto, el lavado se repitió usando Wash Buffer 2 seguido por centrifugación a máxima velocidad por tres minutos. El producto de los lavados fue descartado y la columna se colocó en un tubo de 1,5 ml estéril para la colección de ADN. Se agregaron 30 µL de PureLink™ Genomic Elution Buffer a la columna y se dejó incubar la muestra a 37°C por un minuto, por último se centrifugó la muestra a máxima velocidad por un minuto colectando el ADN genómico.

2.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN

El ADN en soluciones acuosas puede ser cuantificado por medio de espectrofotometría, a su vez se puede detectar la presencia de contaminantes o inhibidores en las soluciones. La concentración de ADN en una solución se puede determinar al medir la absorbancia (*A*) o densidad óptica (DO) a 260 nm, por otro lado a 280 nm se pueden detectar proteínas y a 230 nm carbohidratos, fenoles o compuestos aromáticos. La relación A_{260}/A_{280} se usa para evaluar la pureza de una muestra, y cuando esta

relación es de entre 1,8 y 2, se puede afirmar que el ADN en una solución no contiene contaminantes ni inhibidores (Somma, 2015).

Para la cuantificación de ADN genómico se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (ThermoScientific). Se empleó Elution Buffer (Invitrogen) como blanco. Se cuantificaron 2 μ L de muestra de ADN genómico purificado.

2.4. POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIPO SIMPLE

Los polimorfismos de nucleótido simple estudiados fueron E319G (rs12881616), P388T (rs11555431) y los SNPs en regiones intrónicas rs3803304 y rs2494732. En la Tabla 5 se describen las variantes que producen los SNPs en los residuos de la proteína AKT1 y su función.

Tabla 5. Polimorfismo de nucleótido simple en el gen AKT1.

SNP	Cambio del alelo	Posición en la proteína	Cambio del residuo	Función	Producto Proteína	Cadena
E319G	GAG>GGG	319	E [Glu]>G [Gly]	Mutación contrasentido	No-sinónima	Pos
P388T	CCC>ACC	388	P[Pro]>T[Thr]	Mutación contrasentido	No-sinónima	Pos
rs3803304	C>G	Intrón		Desconocida		Pos
rs2494732	G>A	Intrón		Desconocida		Neg

2.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Los fragmentos de la región donde se encuentran los SNPs se amplificaron empleando la técnica de PCR.

Las secuencias de ambos cebadores y sus temperaturas de melting teóricas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de Cebadores empleados para la amplificación de fragmentos del gen AKT1 y sus temperaturas de annealing.

SNP	Longitud (pb)	Primer	Secuencia	T _{annealing} (°C)
E319G	186	Forward	5'-CAGAGAGGACACAGCATTGCG-3'	61,60

		Reverse	5'-ACAAGGACGGGCACATTAAGA-3'	59,65
P388T	171	Forward	5'-CAAGGACATCAAGCTTTGGCT-3'	61,7
		Reverse	5'-AAGTCCTTGCTTTCAGGGCT-3'	60,4

En la Figura 17 se muestran los cebadores diseñados para amplificar el fragmento que contiene el SNP E319G, el amplicón tiene 186 pb de longitud.

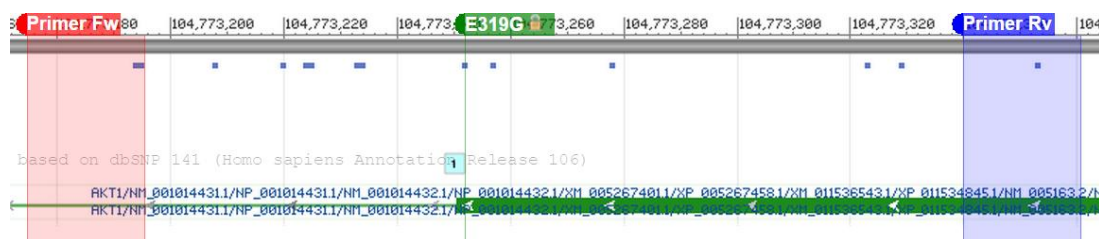


Figura 17. Pre visualización de los cebadores del SNP E319G. Cebador Forward en rojo, cebador Reverse en azul y posición del SNP E319G en verde en el gen AKT1.

Los SNPs P388T, rs3803304 y rs2494732 se encuentran en el mismo amplicón como se muestra en la Figura 18:



Figura 18. Pre visualización de los cebadores del SNP P388T. Cebador Forward en rojo y cebador Reverse, las posiciones de los SNPs rs3803304, rs2494732 y P388T se encuentran marcadas con color azul oscuro, negro y rojo respectivamente.

Los reactivos empleados para la conformación de la MasterMix y sus concentraciones se detallan a continuación. Se utilizó la enzima Platinum® Taq DNA polymerase y nucleótidos de dNTP Set (100mM, Invitrogen).

Tabla 7. Conformación de la MasterMix para la PCR en volumen final de reacción de 25 uL.

Componente	Stock	Disolución	Conc. Final	Vol x 1 (µL)
Agua MQ				14,3
Buffer	5X		1X	5
MgCl₂	50mM		3mM	1,5
dNTPs (Total)	100mM	10mM	0,2mM	0,5
Primer	100µM	10µM	0,2µM	0,5

Forward				
Primer Reverse	100µM	10µM	0,2µM	0,5
Taq	5 U/µL		0,04 U/µL	0,2
ADN	30 ng/µL aprx		3 ng/µL	2,5
Volumen final de reacción				25

Para la amplificación de fragmentos se utilizó el termociclador SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies). Se empleó un ramping rápido (>1°C/s) para las muestras con ADN proveniente de sangre y un ramping estándar (1°C/s) para las muestras con ADN de tumor embebido en parafinas. En la Tabla 8 se detallan las condiciones del termociclador para la técnica de PCR.

Tabla 8. Condiciones generadas por el termociclador para la PCR.

Paso	Ciclos	Tiempo	T (°C)
Hot Start	1	5:00	94
Desnaturalización	35	0:50	94
Alineamiento	35	0:50	Tm
Elongación	35	1:00	72
Elongación Final	1	3:00	72

La temperatura de annealing empleada para cada par de primers o cebadores fue estandarizada basándose en los datos que el fabricante proveyó. La estandarización se realizó a través de un gradiente de temperatura partiendo del promedio de las temperaturas de melting de los cebadores forward y reverse menos 5°C.

$$T_a = \frac{T_m^{fwd} + T_m^{rev}}{2} - 5^\circ C$$

Se evaluó la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) óptima en la master mix, para esto se probaron concentraciones de 2mM y 3mM para obtener bandas de buena calidad en las PCR de muestras de ADN de tumores.

2.6. ELECTROFORESIS

La técnica de electroforesis se basa en la migración de ADN a través de un soporte semipermeable atraído por una corriente eléctrica. Dependiendo del tamaño y la masa de la molécula de ADN, ésta migrará a mayor o menor velocidad debido a la resistencia que el gel ejerce sobre la molécula. La técnica de electroforesis se empleó para evaluar el estado del ADN genómico purificado y para verificar la amplificación de los productos de PCR. Se utilizó geles de agarosa al 0,8%(m/v) para muestras a ADN genómico y al 2%(m/v) para productos de PCR. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 10mg/ml previo a su gelificación, este tinte se aplicó en proporción de 1 μ L por cada 20 mL de gel para permitir la visualización del ADN al ser expuesto a luz UV.

Para verificar el tamaño de los fragmentos de ADN se empleó 1uL del marcador de peso molecular o ladder de 25 pb de (Invitrogen™).

2.7. SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS

La secuenciación de los fragmentos amplificados comprende la aplicación de los siguientes pasos: purificación de los amplicones, PCR de secuenciación donde los ddNTPs marcados son incorporados en los nuevos fragmentos, purificación del producto de la PCR de secuenciación y electroforesis capilar.

2.7.1. PURIFICACIÓN DE AMPLIFICADOS

Los amplicones de PCR fueron purificados por medio de inmovilización reversible en fase sólida con perlas magnéticas, de esta forma se pudo conservar los fragmentos de ADN de más de 100pb de longitud y eliminar el exceso de cebadores, nucleótidos, sales y enzimas remanentes.

A continuación se describe el protocolo de purificación de productos de PCR adaptado por el IIB, donde se utilizó Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter).

Se equilibró el AMPure a temperatura ambiental (RT) y se homogenizó mediante vortex. Se colocaron 10 μ L de AMPure por cada 10 μ L de producto

de PCR en tubos de PCR de 0,2 mL, ambos componentes se mezclaron mediante vortex y se incubó la mezcla por cinco minutos a RT. Los tubos con la mezcla se colocaron en la placa magnética y se dejaron en reposo por cinco minutos hasta que se formó el anillo y el líquido totalmente claro, se aspiró con micropipeta el líquido sin tocar el anillo en las paredes del tubo ni retirar el tubo de la placa.

Se adicionaron 200µL de etanol 70% (fresco, máximo 7 días de disuelto), se incubó la mezcla por 30 segundos y se desechó el etanol por inversión sobre papel absorbente sin retirar el tubo de la placa, se repitió una vez más el lavado con etanol, la incubación por 30 segundos y su descarte. Los remanentes de etanol en el tubo fueron eliminados con micropipeta, posteriormente se dejó secar los tubos en la placa magnética a 37°C por 15 minutos.

Cuando el producto estuvo totalmente seco, se retiraron los tubos de la placa magnética y se resuspendieron en 30 µL de Agua MQ por medio de vórtex hasta que el líquido se torne café por la disolución de las perlas. El tubo con muestra fue colocado en la placa magnética nuevamente, una vez que el líquido se tornó completamente claro, se extrajo el líquido del tubo sin tocar el anillo formado en las paredes, el líquido extraído se colocó en un tubo de PCR nuevo. El líquido transparente contiene los amplificadores de ADN purificados.

2.7.2. PCR DE SECUENCIACIÓN

La PCR de secuenciación se realizó utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing de Applied Biosystems. En la Tabla 9 se describen los reactivos y las concentraciones a ser empleadas en la PCR de secuenciación adaptadas por el IIB-UDLA.

Tabla 9. Conformación de la MasterMix para PCR de secuenciación. Fuente: Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2015.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen X 1 (uL)
Agua MQ			1,5
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100			0,5
BigDye Terminator Sequencing Buffer	5X	0.75 X	0.9
Primer Fw/Rv	1 uM	0,27 uM	1,6
ADN amplificado			1,5
Volumen Final de Reacción			6

2.7.3. PURIFICACIÓN DE PCR DE SECUENCIACIÓN

Los fragmentos marcados obtenidos de la PCR de secuenciación fueron purificados a través de inmovilización reversible en fase sólida con Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter), de esta forma se retiraron dyes no incorporados, nucleótidos, enzimas y remanentes. A continuación se describe el protocolo de purificación de amplicones marcados adaptado por el IIB que fue ejecutado previo a la secuenciación.

Se equilibró el CleanSEQ a temperatura ambiental (RT) y homogenizó con vortex. Se colocaron 1,5 µL de CleanSEQ y 13,2 µL de etanol al 85% por cada 5µL de producto de PCR de secuenciación en tubos de PCR de 0,2 mL, los tres componentes fueron mezclados mediante vortex, los tubos se colocaron en la placa magnética y se incubaron por tres minutos a RT. Luego de formado el anillo y de que el líquido quedase totalmente claro, el líquido fue aspirado con micropipeta sin tocar el anillo en las paredes del tubo ni retirar el tubo de la placa.

Se adicionó 100 µL de etanol 85% (fresco, máximo 7 días de preparado) e incubó por 30 segundos, el etanol fue desechado por inversión sobre papel absorbente sin retirar el tubo de la placa, posteriormente se repitió el lavado con etanol, la incubación por 30 segundos y su descarte. Los remanentes de etanol en el tubo fueron eliminados con micropipeta, posteriormente se dejó secar los tubos en la placa magnética a 37°C por 15 minutos.

Cuando el producto estuvo totalmente seco, se retiraron los tubos de la placa magnética y se re suspendieron en 25 μ L de agua MQ por medio de vortex por 30 segundos. El tubo con muestra fue colocado en la placa magnética nuevamente, una vez que el líquido se tornó completamente claro, se extrajo el líquido del tubo sin tocar el anillo formado en las paredes, el líquido extraído se colocó en la placa para secuenciación. El líquido transparente contiene los fragmentos marcados producto de la PCR de secuenciación purificados.

2.7.4. ELECTROFORESIS CAPILAR

Se realizó la secuenciación de los fragmentos amplificados en el equipo 3130 Genetic Analyzer Applied Biosystems® y las secuencias fueron analizadas con el software Sequencing Analysis (Applied Biosystems®).

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo de nucleótido simple (SNP) a partir de análisis de secuencias. Se evaluó el principio de Hardy-Weinberg que establece que una población se encuentra genéticamente en equilibrio hasta que algún factor o la selección natural genere una mutación. Para este análisis se utilizó la herramienta Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator disponible en: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> (Rodríguez *et al.*, 2009).

Las diferencias significativas entre la presencia de los polimorfismos en los grupos de estudio caso control fueron analizadas con el test Chi cuadrado (X^2) en el software online Social Science Statistics disponible en: <http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/Default2.aspx>. El riesgo de presentar los polimorfismos estudiados y desarrollar cáncer de mama fue estudiado mediante odds-ratio (OR). Se empleó un intervalo de confianza del 95%, una tabla de contingencia 2 x 2 y un valor de P significativo $<0,05$, para esto se utilizó el programa estadístico PASW 22 de SPSS y el software VassarStats: Website for Statistical Computation disponible en: <http://vassarstats.net/odds2x2.html>.

Para predecir la influencia de las variantes alélicas intrónicas en los lugares de corte y empalme del pre-mRNA del gen AKT1, se utilizó la herramienta bioinformática NetGene2 Server (Center for Biological Sequence Analysis, Dinamarca) disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/> (Brunak *et al.*, 1991).

En la Tabla 10 se describen las variables que fueron consideradas en el estudio, las mismas corresponden a datos clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos propios de cada caso.

Tabla 10. Variables analizadas en el grupo de estudio que corresponden a datos clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos.

Variable	Definición	Grupos
Edad	Tiempo desde el nacimiento hasta la toma de muestra.	Menor a 35 años Entre 35 y 49 años Igual o mayor a 50 años
Estadio	Define el tamaño del tumor y su diseminación hacia ganglios linfáticos u otras regiones del cuerpo	Estadio 0 Estadio I Estadio II Estadio III Estadio IV
Subtipo según el modelo intrínseco	Clasificación según histoquímica y arrays genéticos.	Luminal A Luminal B HER 2 positivo Basal/Triple negativo
ER	Determina la presencia o ausencia del receptor del estrógeno en la membrana celular.	ER positivo ER negativo
PgR	Determina la presencia o ausencia del receptor de la progesterona en la membrana celular.	PgR positivo PgR negativo
HER 2	Determina la presencia o ausencia del receptor HER 2 en la membrana celular.	HER 2 Positivo HER 2 Negativo
Metástasis Ganglionar (LN)	Determina si el cáncer se ha extendido hacia los ganglios linfáticos.	Positivo Negativo

Continua Tabla 10 →

Lateralidad	Determina que seno se encuentra el tumor o si se encuentra en ambos.	Mama derecha Mama Izquierda Ambas mamas
Márgenes quirúrgicos	Determina la presencia de células cancerígenas en el borde exterior del tejido que fue extirpado.	Positivo Negativo

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE MUESTRAS DE ADN

El ADN madre empleado en el estudio fue evaluado por medio de electroforesis horizontal (Figura 19). En el caso de las muestras que presentaron baja concentración de ADN ($\leq 10\text{ng/ul}$) o presencia de inhibidores, se realizó nuevamente la extracción de ADN.

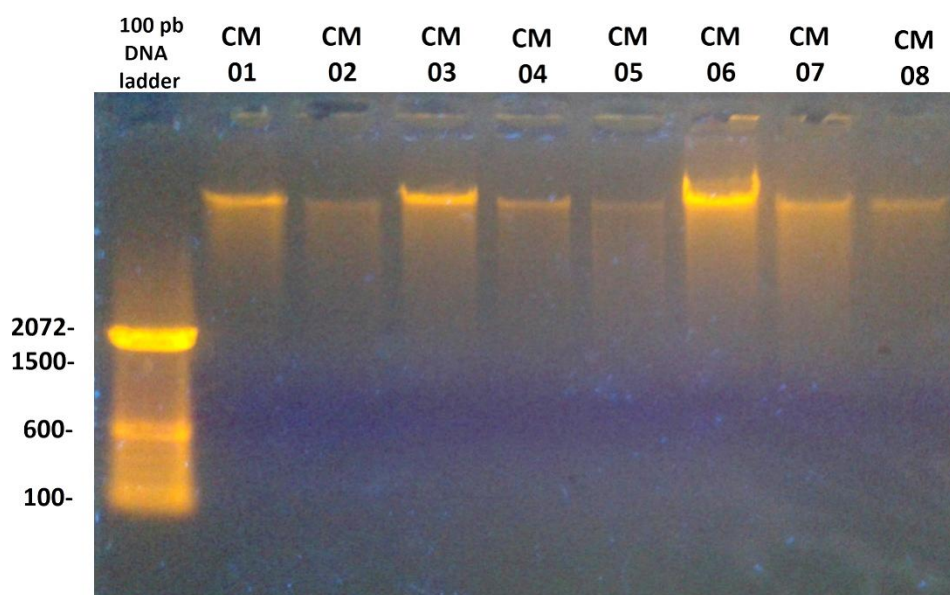


Figura 19. Electroforesis de ADN genómico. Gel de agarosa 0,8%. Marcador de peso molecular de 100pb. CM, control mama.

3.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR

Se realizó un gradiente para determinar la temperatura de annealing óptima para los cebadores forward y reverse de los fragmentos E319G y P388T.

Para evaluar productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 2% (m/v) teñidos con bromuro de etidio a concentración final de 0,001 mg/ml previo a la gelificación. Los productos del gradiente de temperatura del amplicón E319G se muestran en la Figura 20, determinando así que la temperatura óptima de alineamiento para el amplicón E319G es de 60°C.

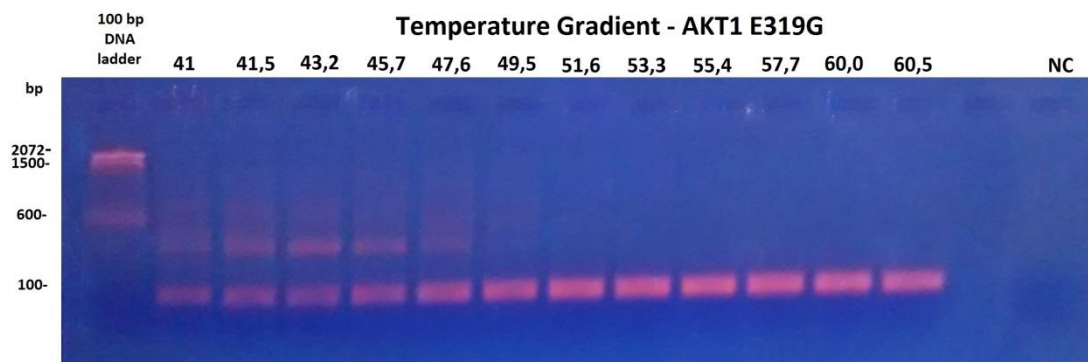


Figura 20. Gradiente de Temperatura para el fragmento del SNP E319G. Gel de agarosa 2% (m/v) teñido con bromuro de etidio a concentración final de 0,001 mg/ml.

A su vez los productos del gradiente de temperatura del amplicón P388T se muestran en la Figura 18, determinando así que la temperatura óptima de alineamiento para este amplicón es de 59,3°C.

Las muestras de ADN de los controles eran de buena calidad, por otro lado las muestras de ADN de tumores fijados en parafina presentaron problemas como baja concentración de ADN o presencia de inhibidores, impidiendo la formación de bandas claras al momento de evaluar los productos de PCR en geles de agarosa. Por esta razón, se realizó un ensayo aumentando la concentración final de cloruro de magnesio en la MasterMix hasta 3mM o aplicando BSA en concentración de 0,8 mg/ml. En la Figura 21 se muestra que la concentración final de cloruro de magnesio en la MasterMix de 3mM, es la que genera bandas más claras y por ende mayor producto de PCR. Por otro lado, agregar BSA (concentración final 0,8 mg/ml) a la MasterMix inhibe la PCR, ya que ni el ADN de tumores ni el control positivo mostraron banda.

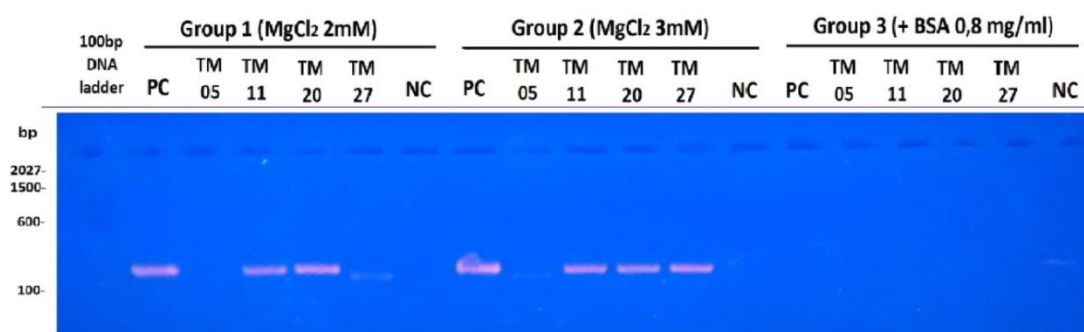


Figura 21. Gradiente de concentración de cloruro de magnesio y presencia de BSA en MasterMix. Gel de agarosa 2% (m/v) teñido con bromuro de etidio a concentración final de 0,001 mg/ml. PC, control positivo; NC, control negativo.

Se amplificaron ambos fragmentos del gen AKT1 de 91 muestras de ADN del grupo de estudio y 185 muestras de ADN del grupo control, por lo que se realizaron 552 reacciones en total. En cada grupo de muestras se incluyeron controles negativos para comprobar la ausencia de contaminaciones de ADN en la MasterMix. En la Figura 22 se muestran los productos de PCR del fragmento de E319G de 186 pb, amplificadas a partir de ADN de controles

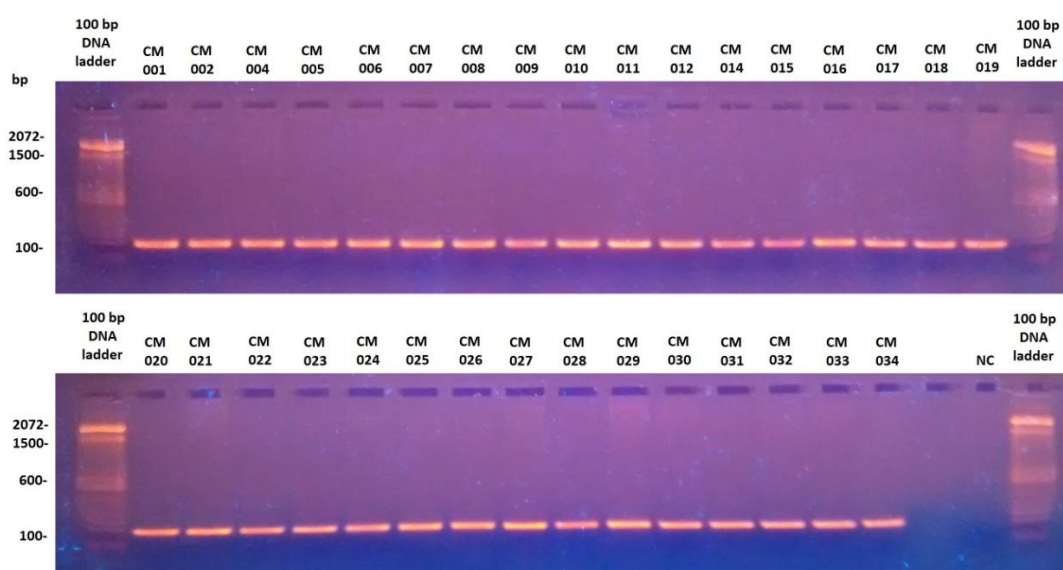


Figura 22. Electroforesis de amplicones de E319G de 186 pb, a partir de muestras de ADN de controles. NC, control negativo; MC, control mama.

En la Figura 23 se muestra el producto de PCR del fragmento E319G de 186 pb, amplificado a partir de muestras de ADN de casos.

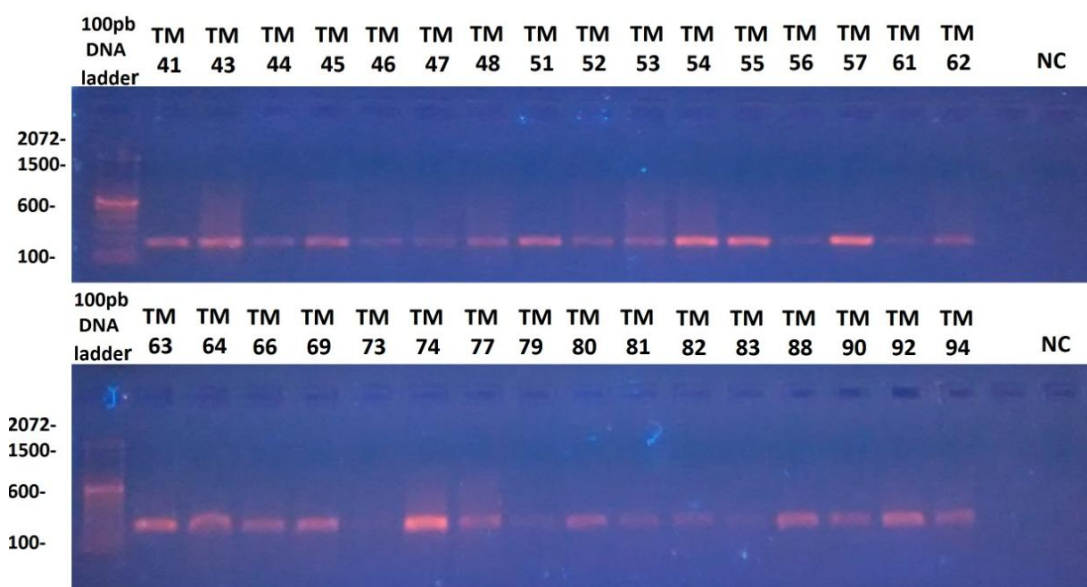


Figura 23. Electroforesis de amplicones de E319G de 186 pb, a partir de muestras de ADN de casos. NC, control negativo; TM, tumor mama.

En la Figura 24 se muestra el producto de PCR del fragmento P388T de 171 pb amplificado a partir de muestras de ADN de controles.

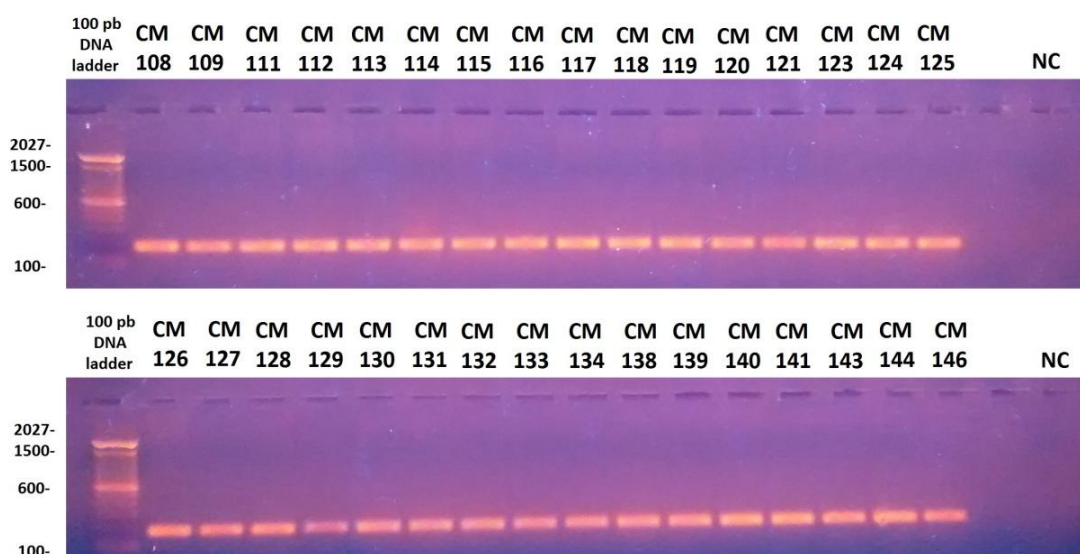


Figura 24. Electroforesis de amplicones de P388T de 171 pb, a partir de muestras de ADN de controles. NC, control negativo; CM, control mama.

En la Figura 25 se muestra el producto de PCR del fragmento P388T de 171 pb amplificado a partir de muestras de ADN de casos.

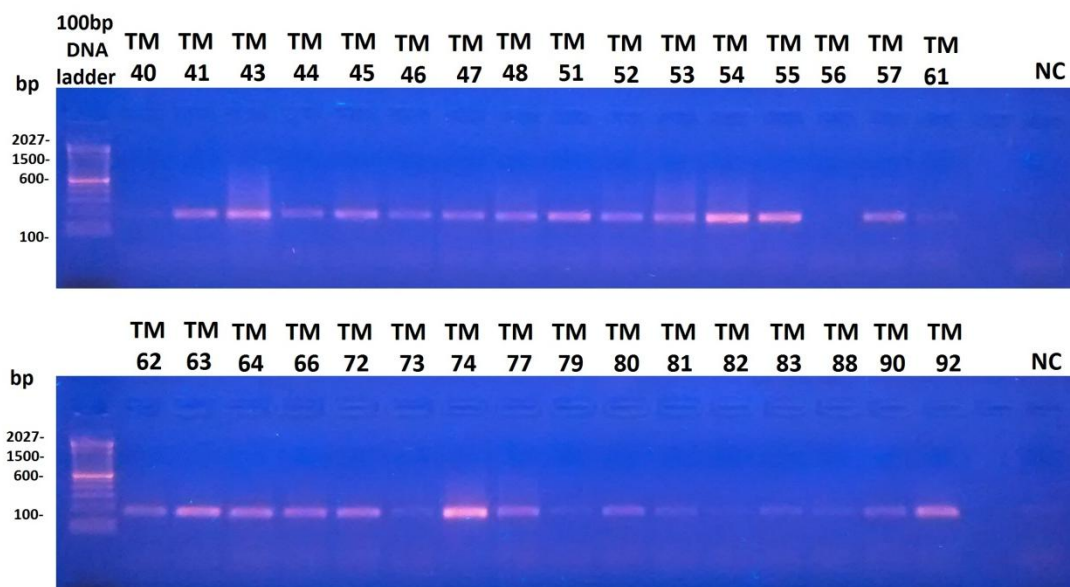


Figura 25. Electroforesis de amplicones de P388T de 171 pb, a partir de muestras de ADN de casos. NC, control negativo; TM, tumor mama.

3.3. IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS

Se obtuvieron secuencias de los fragmentos amplificados E319G y P388T de 91 muestras de casos y 185 muestras del grupo control. En los electroferogramas obtenidos a partir de secuenciación se observó la presencia de las variantes polimórficas analizadas. Para comprobar que las secuencias obtenidas correspondían a fragmentos del gen AKT1, se realizó un alineamiento por medio de BLAST del NCBI. La secuencia del fragmento E319G obtenido por secuenciación correspondía con un 100% de homología a la región analizada del gen AKT1 humano.

Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1) gene, complete cds
Sequence ID: [gb|JX512440.1](#) Length: 32283 Number of Matches: 1

Range 1: 24334 to 24455 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
226 bits(122)	6e-56	122/122(100%)	0/122(0%)	Plus/Minus
Query 1	GAGAGGACACAGCATTGCGTGTGCTCAGGACGTGGGGACGCAGCAACGCGTATGCACGCA	60		
Sbjct 24455	GAGAGGACACAGCATTGCGTGTGCTCAGGACGTGGGGACGCAGCAACGCGTATGCACGCA	24396		
Query 61	GGTGGGGCGCACACCTCGGGGGCCAGGTAAGTCTCAGGTGTGCCGCAAAAGGTCTTCATGGTG	120		
Sbjct 24395	GGTGGGGCGCACACCTCGGGGGCCAGGTAAGTCTCAGGTGTGCCGCAAAAGGTCTTCATGGTG	24336		
Query 121	GC 122			
Sbjct 24335	GC 24334			

Figura 26. BLAST del fragmento E319G obtenido por secuenciación.

De la misma forma se realizó un alineamiento por medio de BLAST del NCBI de la secuencia obtenida del fragmento P388T, la secuencia de este fragmento obtuvo un 100% de homología con la región analizada del gen ATK1 humano.

Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1) gene, complete cds
Sequence ID: [gb|JX512440.1](#) Length: 32283 Number of Matches: 1

Range 1: 24784 to 24877 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(94)	2e-40	94/94(100%)	0/94(0%)	Plus/Minus
Query 1	GACATCAAGCTTTGGCTATCAGTGTAGTCTGGGAGGTGCCAGGACCGCCTGGCGCAGGGG	60		
Sbjct 24877	GACATCAAGCTTTGGCTATCAGTGTAGTCTGGGAGGTGCCAGGACCGCCTGGCGCAGGGG	24818		
Query 61	CAGGTGCAGCCTGGGGATGAGGGGATGGAGGTGT	94		
Sbjct 24817	CAGGTGCAGCCTGGGGATGAGGGGATGGAGGTGT	24784		

Figura 27. BLAST del fragmento P388T obtenido por secuenciación.

3.3.1. POLIMORFISMO E319G

No se observaron variantes polimórficas en la posición del SNP E319G en el gen AKT1, es decir, únicamente se obtuvieron genotipos homocigotos silvestres tanto en casos como en controles. A continuación se muestra un electroferograma con el genotipo homocigoto silvestre del SNP E319G.

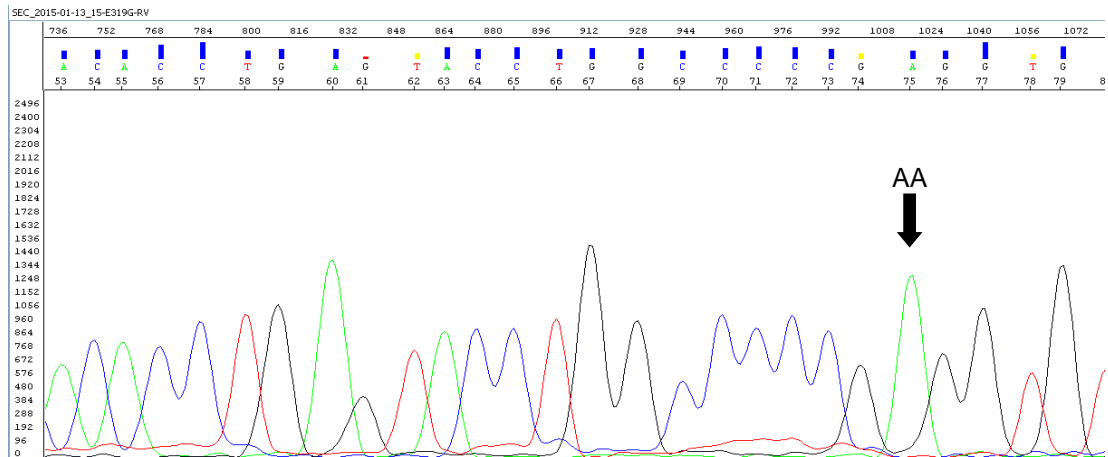


Figura 28. Electroferograma del SNP E319G con genotipo homocigoto AA.

3.3.2. POLIMORFISMO P388T

No se observaron variantes polimórficas en la posición del SNP P388T en el gen AKT1, es decir, únicamente se obtuvieron genotipos homocigotos silvestres tanto en casos como en controles. A continuación se muestra un electroferograma con el genotipo homocigoto silvestre del SNP P388T.

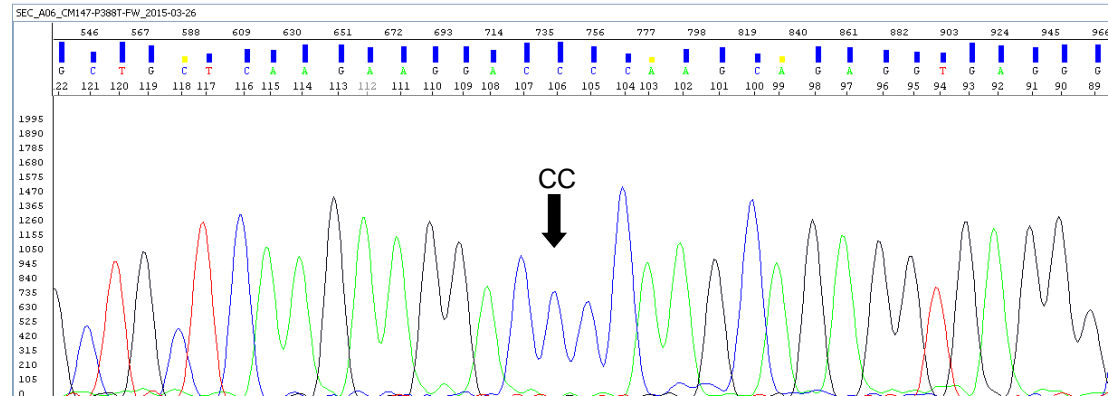


Figura 29. Electroferograma del SNP P388T con genotipo homocigoto CC.

3.3.3. POLIMORFISMO rs3803304

Se identificaron las variantes polimórficas CC (homocigoto silvestre), CG (heterocigoto) y GG (homocigoto raro) en la posición del SNP rs3803304 en el gen AKT1.

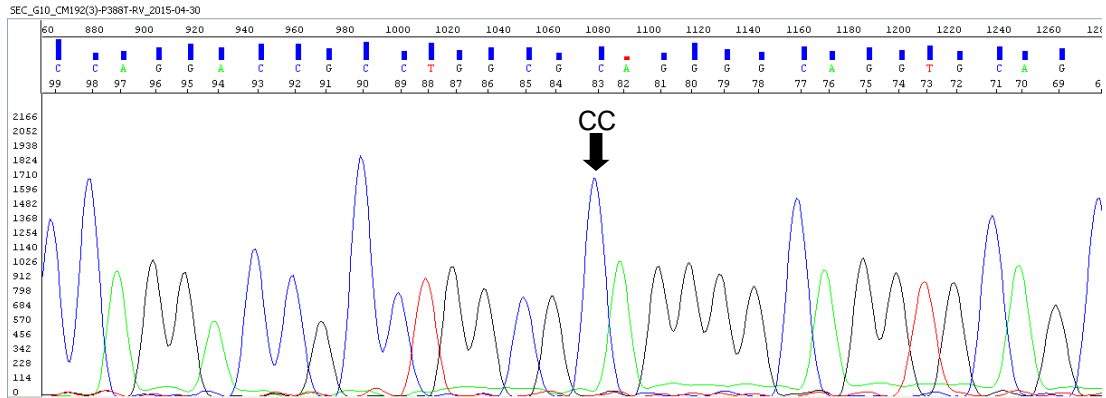


Figura 30. Electroferograma del SNP rs3803304 con el genotipo homocigoto CC.

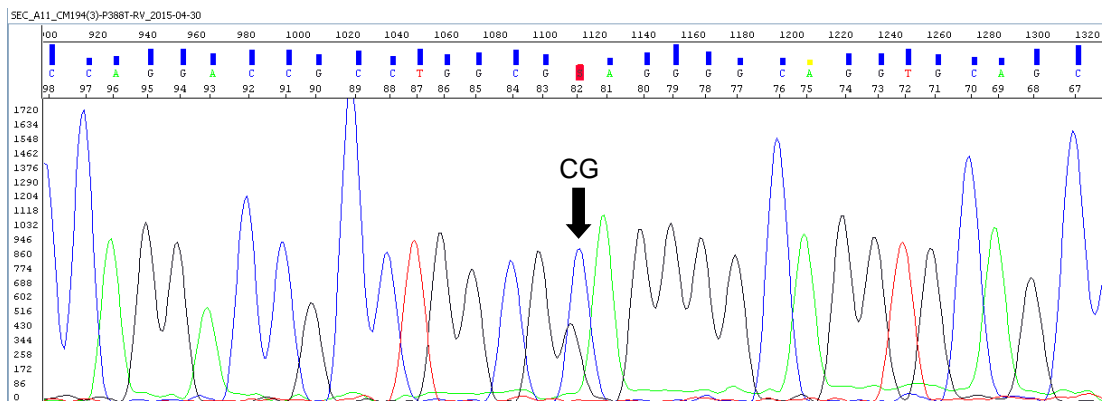


Figura 31. Electroferograma del SNP rs3803304 con el genotipo heterocigoto CG.

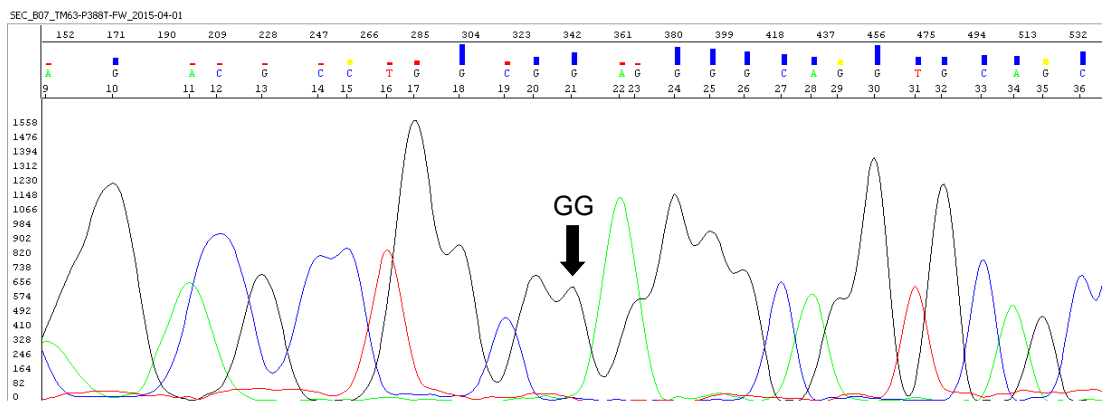


Figura 32. Electroferograma del SNP rs3803304 con el genotipo homocigoto GG.

3.3.4. POLIMORFISMO rs2494732

Se identificaron las variantes polimórficas GG (homocigoto silvestre), GA (heterocigoto) y AA (homocigoto raro) en la posición del SNP rs2494732 en el gen AKT1.

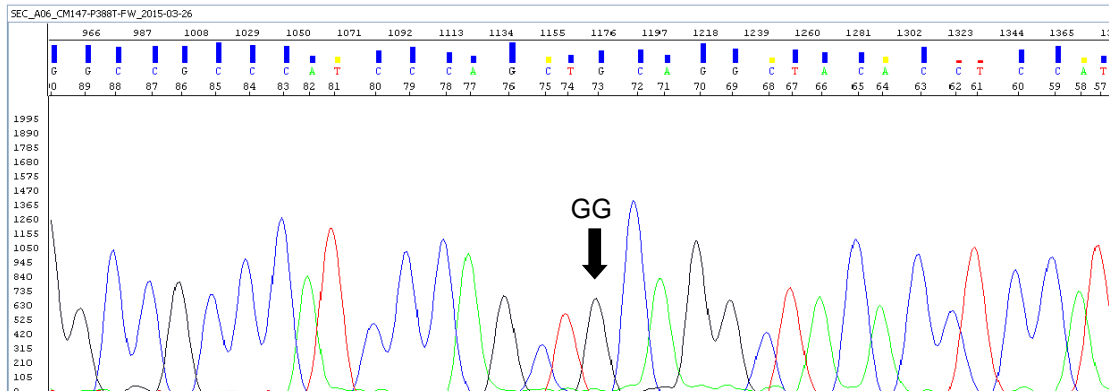


Figura 33. Electroferograma del SNP rs2494732 con el genotipo homocigoto GG.

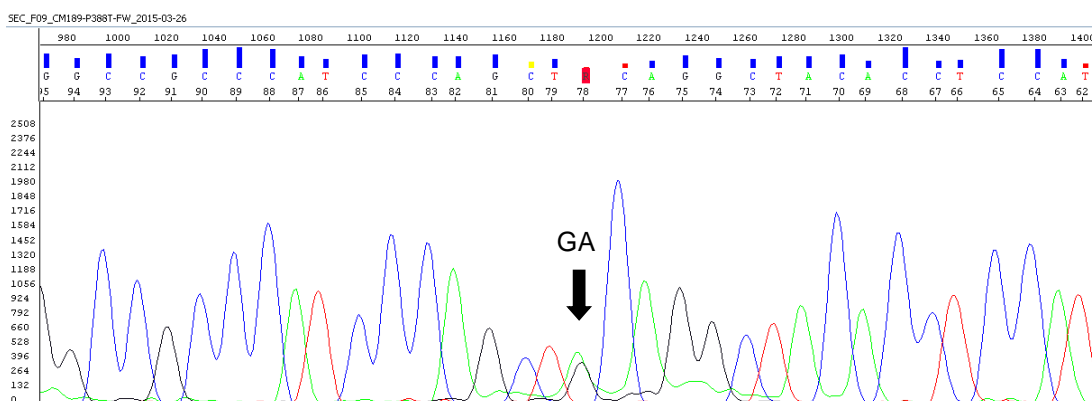


Figura 34. Electroferograma del SNP rs2494732 con el genotipo heterocigoto GA.

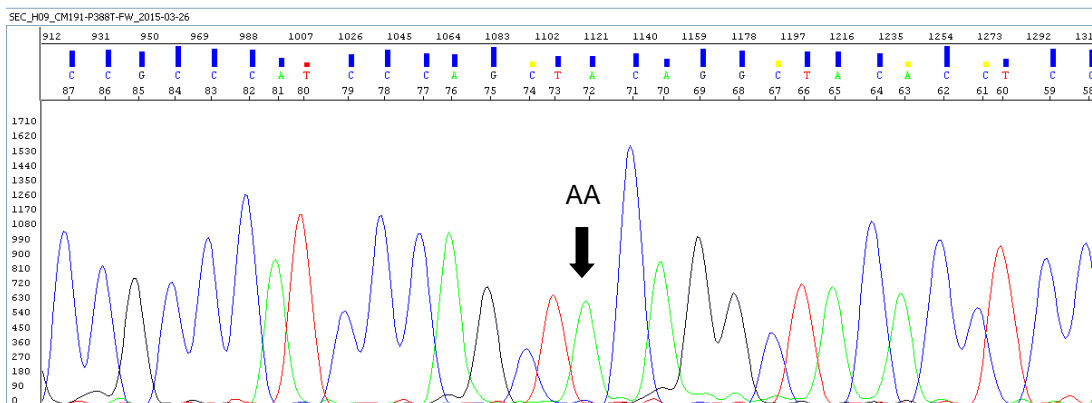


Figura 35. Electroferograma del SNP rs2494732 con el genotipo homocigoto AA.

3.4. ANÁLISIS DE FRECUENCIAS

La distribución de características en todos los pacientes con cáncer de mama se muestran en la Tabla 11. El 40,7% de los casos estudiados fue diagnosticado entre 35 y 49 años de edad, mientras que el 57,1% tenía más de 50 años. En los subtipos luminal A, luminal B y triple negativo la mayor

cantidad de casos tenía más de 50 años. El 57,1% de los casos presentó cáncer en el seno derecho mientras que el 42,9% lo hizo en el seno izquierdo. El 76,92% de los casos fueron identificados en los estadios I o II, mientras que el 19,78% se identificó en los estadios III o IV. El 51,6% de los casos presentaron metástasis gangliolar.

Los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PgR) presentaron un resultado positivo en el 92% y 100% de los casos luminal A respectivamente, 90,9% y 9,1% de los casos luminal B, 0% y 9,1% de los casos HER2 positivo y 0% en ambos receptores en el subtipo triple negativo. El receptor HER2 estaba presente en el 20,8% de los casos luminal A, 45,5% de los casos luminal B, 100% en HER2 positivo y 0% en el subtipo triple negativo. El 67% de los casos presentaron márgenes quirúrgicos.

Tabla 11. Distribución (n, %) de características histopatológicas e inmunohistoquímicas (en el diagnóstico) en todos los pacientes con cáncer de mama.

	Luminal A		Luminal B		HER		TNBC		Total		Valor P
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Edad											
<35	1	1.9	0	0.00	1	9.1	0	0.00	2	2.2	Referencia
35-49	21	39.6	3	27.27	6	54.5	7	43.75	37	40.7	0.623
≥50	31	58.5	8	72.73	4	36.4	9	56.25	52	57.1	0.221
Lateralidad											
Derecha	31	58.5	8	72.7	5	45.5	8	50.0	52	57.1	0.557
Izquierda	22	41.5	3	27.3	6	54.5	8	50.0	39	42.9	
Estadio tumoral											
T0,X	3	5.66	0	0.0	0	0.0	0	0.00	3	3.30	Referencia
T1-T2	41	77.36	6	54.5	8	72.7	15	93.75	70	76.92	0.56
T3-T4	9	16.98	5	45.5	3	27.3	1	6.25	18	19.78	0.453
Met. nodular											
+	28	52.8	3	27.3	9	81.8	7	43.75	47	51.6	0.070
-	25	47.2	8	72.7	2	18.2	9	56.25	44	48.4	
ER											
+	49	92.5	10	90.9	0	0.0	0	0.0	59	64.8	<1E-5
-	4	7.5	1	9.1	11	100.0	16	100.0	32	35.2	
PgR											
+	53	100.0	1	9.1	1	9.1	0	0.0	55	60.4	<1E-5
-	0	0.0	10	90.9	10	90.9	16	100.0	36	39.6	
HER2											
+	11	20.8	5	45.5	11	100.0	0	0.0	27	29.7	<1E-5
-	42	79.2	6	54.5	0	0.0	16	100.0	64	70.3	
Márgenes quirúrgicos											

+	33	62.3	8	72.7	7	63.6	13	81.25	61	67.0	0.527
-	20	37.7	3	27.3	4	36.4	3	18.75	30	33.0	

En la Figura 36 se muestra la distribución de los casos por rangos de edad. La edad de las mujeres del grupo de estudio comprende desde los 29 hasta los 88 años. Las edades con mayor incidencia de casos de cáncer de mama se concentran en dos modas, cercanos a 50 años de edad y cercanos a los 70 años de edad.

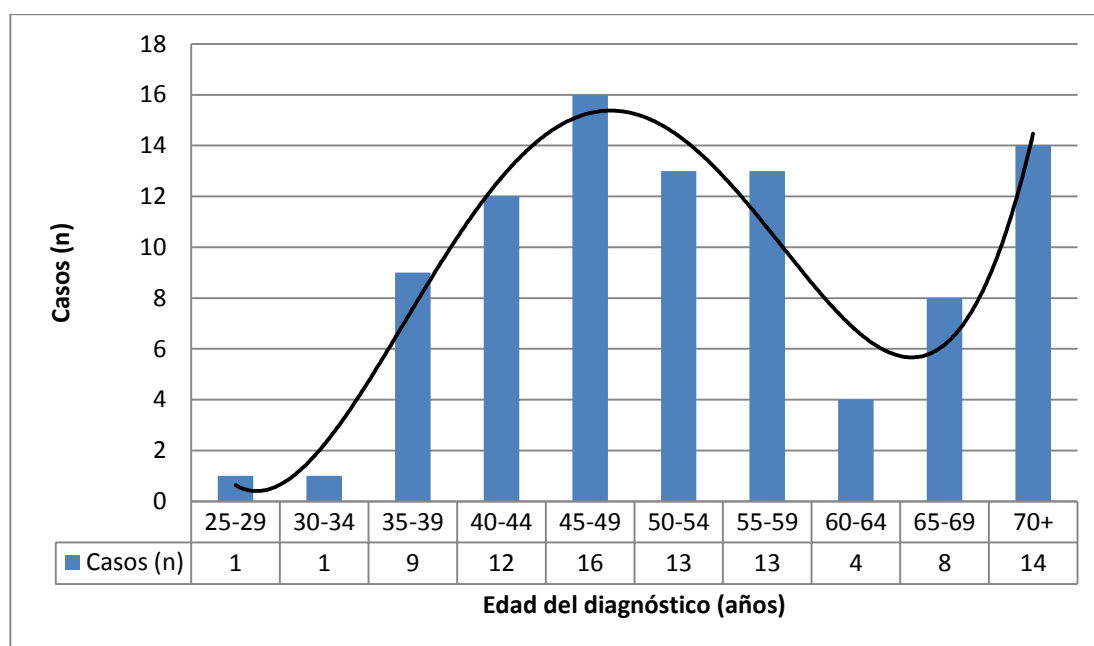


Figura 36. Distribución de número de casos por rango de edad. - Línea de tendencia polinómica de ordenación 4. . Las edades con mayor incidencia de casos de cáncer de mama se concentran en dos modas, cercanos a 50 años de edad y cercanos a los 70 años de edad.

En la Figura 37 se muestran las frecuencias de los distintos subtipos intrínsecos en rangos de edad del diagnóstico de los casos. Los subtipo luminal A y luminal B tienen modas altas cerca a los 70 años y modas menores cerca de los 50 años. El subtipo HER2 positivo presenta una moda alta aproximadamente a la edad de 50 años. Por otro lado, el subtipo Triple Negativo presenta una moda menor a los 70 años y una moda mayor aproximadamente a los 50 años de edad.

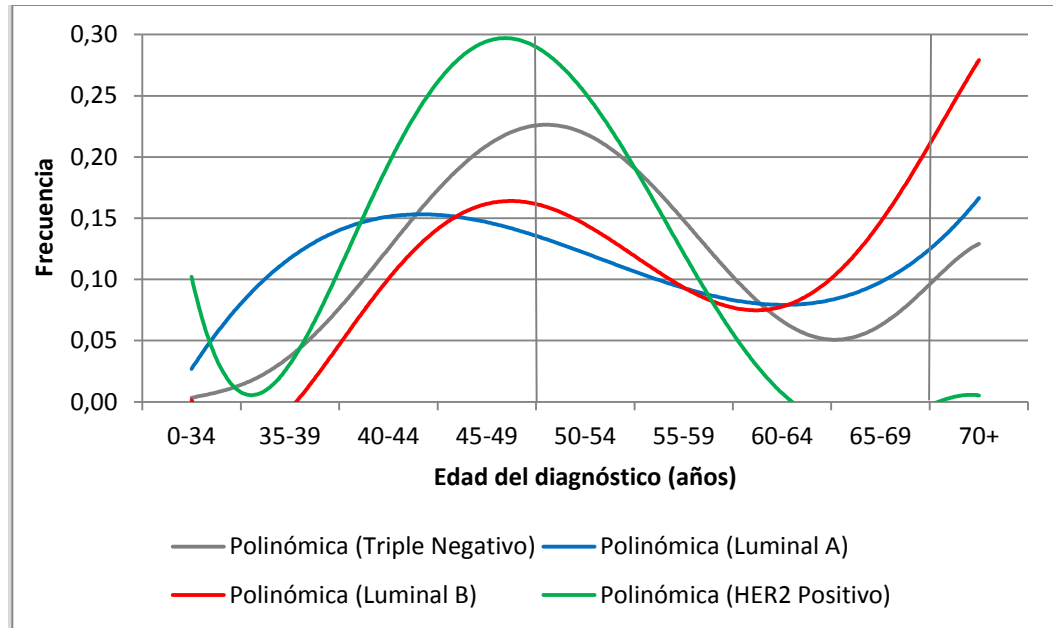


Figura 37. Líneas de tendencia de los subtipos intrínsecos luminal A, luminal B, HER2 positivo y Triple Negativo en función de la edad de diagnóstico.

En la Figura 38 se muestran las frecuencias de los casos ER negativo y ER positivo en función de la edad de diagnóstico. Los casos ER negativos forman una distribución bimodal con una moda mayor cerca de los 50 años y otra moda menor cerca de los 70 años. Por otro lado, la distribución bimodal de los casos ER positivos tiene su pico más alto a la edad de 70 años y uno menor a la edad de aproximadamente 45 años.

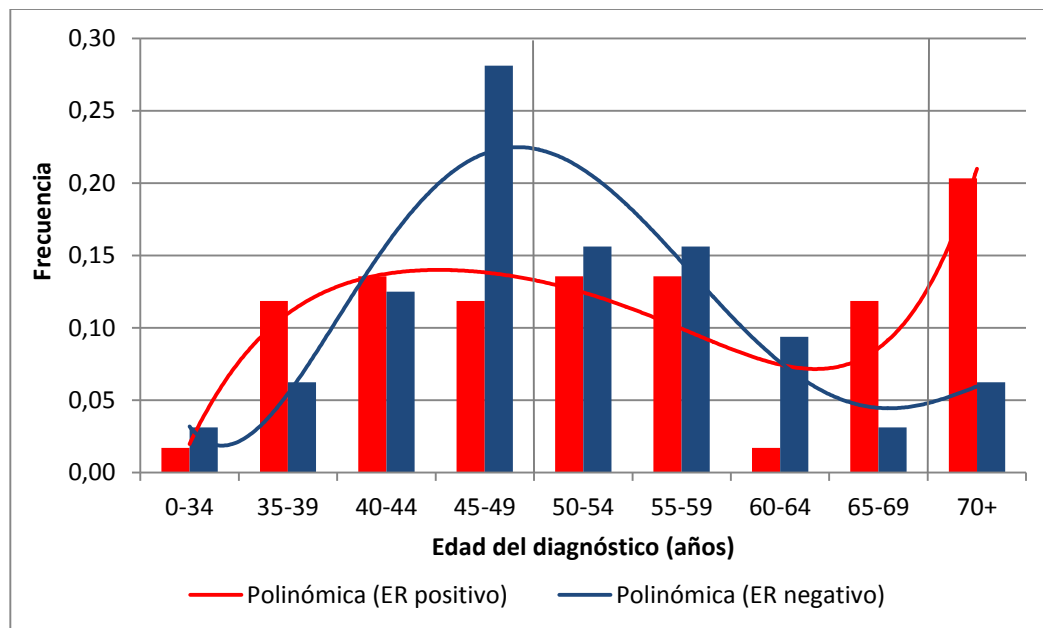


Figura 38. Línea de tendencia de frecuencia de casos ER negativo y ER positivo en función de la edad del diagnóstico.

En la Tabla 12 se detalla la distribución de las variantes polimórficas de los SNPs estudiados con la clasificación intrínseca de los tumores. No se encontraron variantes alélicas de los SNPs E319G y P388T en casos ni en controles. Se aplicó el test chi cuadrado (χ^2) para determinar asociación entre la presencia de los diferentes genotipos y el subtipo intrínseco de cáncer de mama. Se determinó que la presencia de los genotipos CG ($P=0.003$) y CG+GG ($P=0.005$) del SNP rs3803304 y los subtipos del cáncer de mama están relacionados significativamente, además la frecuencia de tumores TNBC con el genotipo CG y CG+GG son significativamente menores a las esperadas.

Tabla 12. Frecuencia (n, %) de variantes polimórficas en subtipos de cáncer de mama.

SNP	Genotipo	Luminal A		Luminal B		HER2		TNBC		Total		Valor p
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
rs3803304	CC	31	58.5	4	36.4	4	36.4	15	93.8	54	59.3	Ref
	CG	18	34.0	7	63.6	5	45.5	0	0.0	30	33	0.003
	GG	4	7.5	0	0.0	2	18.2	1	6.3	7	7.7	0.29
	CG+GG	22	41.5	7	63.6	7	63.7	1	6.3	37	40.7	0.005
rs2494732	GG	24	45.3	5	45.5	6	54.5	6	37.5	41	45.1	Ref
	GA	24	45.3	4	36.3	1	9.1	8	50	37	40.7	0.287
	AA	5	9.4	2	18.2	4	36.4	2	12.5	13	14.3	0.53
	GA+AA	29	54.7	6	54.6	5	45.5	10	62.5	50	54.9	0.856

El subtipo de cáncer que se identificó en mayor frecuencia en el grupo de estudio fue el Luminal A con el 58,2% de casos, el subtipo Triple Negativo se presentó en el 17,6% de los casos, los subtipos Luminal B y HER2 positivo se presentaron cada uno en el 12,1% de los casos (Figura 39).

Distribución de Subtipos

■ Luminal A ■ Luminal B ■ HER2 positivo ■ Triple Negativo

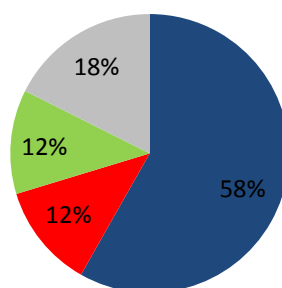


Figura 39. Distribución de subtipos Luminal A, Luminal B, HER2 positivo y Triple Negativo en los casos estudiados.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos E319G, P388T, rs3803304 y rs2494732 se detallan en la Tabla 13. Los polimorfismos E319G y P388T no presentaron heterocigosis ni homocigosis de alelos raros, por lo que las frecuencias alélicas fueron de 1 en casos y controles.

Las frecuencias alélicas del genotipo G/G del SNP rs3803304 fueron 0,24 para casos y 0,18 para controles, mientras que las frecuencias alélicas del genotipo raro A/A del SNP rs2494732 fueron 0,46 para casos y 0,41 para controles. Las frecuencias genotípicas totales hacen posible determinar que la población en estudio presentó equilibrio Hardy-Weinberg ($P > 0.05$).

Tabla 13. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos rs3803304 y rs2494732. HWE, Equilibrio Hardy-Weinberg.

SNP	Genotipos	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica			HWE P
		Casos	Controles	Total	Casos	Controles	Total	
rs3803304	C/C	0.59	0.65	0.63	0.76	0.82	0.80	> 0.05

	C/G	0.33	0.33	0.33				
	G/G	0.08	0.02	0.04	0.24	0.18	0.20	
rs2494732	G/G	0.34	0.35	0.34	0.54	0.59	0.57	> 0.05
	G/A	0.41	0.48	0.46				
	A/A	0.25	0.17	0.20	0.46	0.41	0.43	

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs rs3803304 y rs249473 se muestran en las Figuras 40 y 41 respectivamente. Las frecuencias describen en qué proporción un genotipo o un alelo se encuentra en relación al total.

La frecuencia genotípica de GG (homocigoto raro) del SNP rs3803304 es 6% mayor en casos que en controles, a su vez la frecuencia alélica de G (alelo raro) es 6% mayor en casos que en controles.

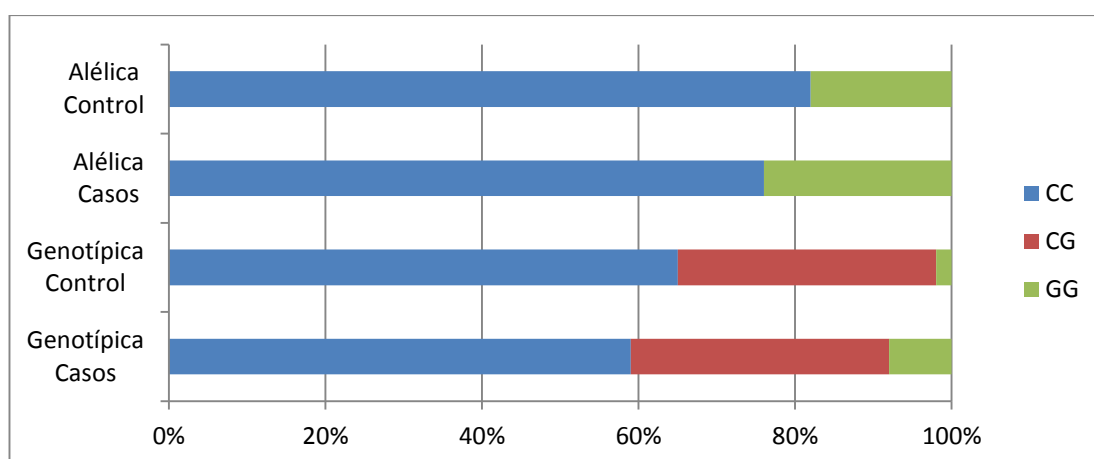


Figura 40. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs3803304.

La frecuencia genotípica de AA (homocigoto raro) del SNP rs2494732 es 8% mayor en controles que en casos, a su vez la frecuencia alélica de A (alelo raro) es 11% mayor en controles que en casos.

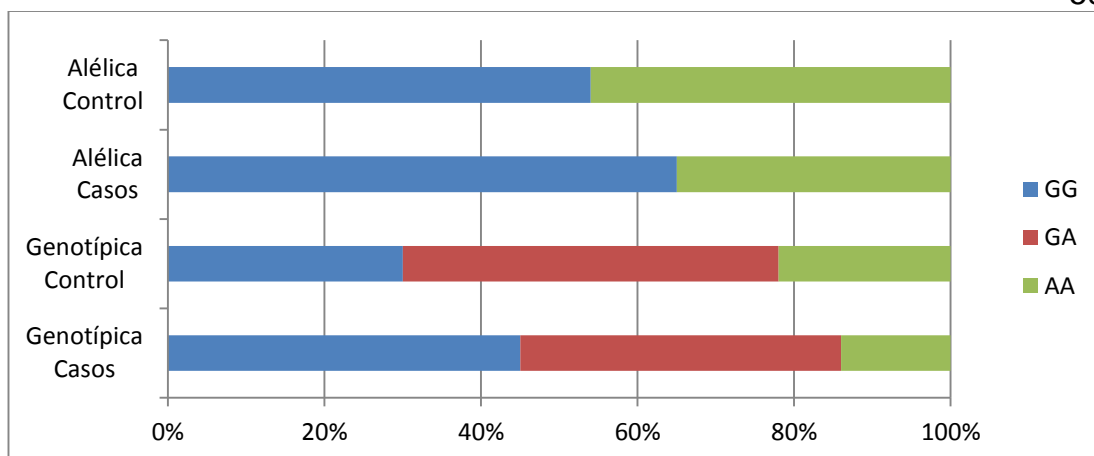


Figura 41. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs2494732.

La asociación entre genotipos y características histopatológicas e inmunohistoquímicas se detallan en la Tabla 14. No se identificaron relaciones significativas entre las características y los genotipos ($P > 0.05$).

Tabla 14. Asociación entre genotipos y características histopatológicas e inmunohistoquímicas.

Variables	rs3803304		rs2494732	
	CC	CG+GG	GG	GA+AA
Lateralidad				
Derecha	28 (30.77)	24 (26.37)	24 (26.37)	28 (30.77)
Izquierda	26 (28.57)	13 (14.29)	17 (18.68)	22 (24.18)
P	0.22		0.81	
Estadio tumoral				
T0-X	3 (3.3)	0	2 (2.20)	1 (1.10)
T1-T2	43 (47.25)	27 (29.67)	32 (35.16)	38 (41.76)
T3-T4	8 (8.79)	10 (10.99)	7 (7.69)	11 (12.08)
P value	0.43		0.65	
Met. nodular				
+	29 (31.87)	18 (19.78)	22 (24.17)	25 (27.47)
-	25 (27.47)	19 (20.88)	19 (20.88)	25 (27.47)
P value	0.636		0.728	
ER				
+	33 (36.26)	26 (28.57)	26 (28.57)	33 (36.26)
-	21 (23.07)	11 (12.09)	15 (16.48)	17 (18.68)
P value	0.369		0.797	
PgR				
+	31 (34.07)	24 (26.37)	25 (27.47)	30 (32.97)

-	23 (25.27)	13 (14.29)	16 (17.58)	20 (21.97)
P value	0.475		0.92	
HER2				
+	12 (13.19)	15 (16.48)	11 (8,79)	16 (20,88)
-	42 (46.15)	22 (24.18)	30 (25,27)	34 (45,06)
P value	0.06		0.591	
Márgenes quirúrgicos				
+	33 (36.26)	28 (30.76)	25 (27.47)	36 (39.56)
-	21 (23.08)	9 (9.9)	16 (17.58)	14 (15.38)
P value	0.147		0.265	

La asociación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo de desarrollar cáncer de mama se detalla en la Tabla 15. Con respecto a la variante rs3803304, el genotipo CG presentó un OR de 1.1 (95% IC=0.6-1.9; $P=0.832$), el genotipo CC tiene un OR de 5.2 (95% IC=1.3-20.9; $P=0.027$), y la combinación de los genotipos CG+CC presentó un OR de 1.3 (95% IC=0.8-2.2; $P=0.395$).

El genotipo GA de la variante genética rs2494732 presentó un OR de 0.56 (95% IC=0.32-0.99; $P=0.063$), el genotipo AA presentó un OR de 0.44 (95% IC=0.21-0.93; $P=0.047$), mientras que la combinación de los genotipos GA+AA dio un OR de 0.52 (95% IC=0.31-0.88; $P=0.022$).

Tabla 15. Asociación entre los polimorfismos rs3803304, rs2494732 y el riesgo de presentar cáncer de mama en casos y controles. ^a Genotipos referencia; OR, odds ratio; IC, Intervalo de confianza.

SNP	Genotipo	Casos (n=91), n (%)	Controles (n=185), (%)	OR (IC 95%)	P
rs3803304	CC ^a	54 (59)	121 (65)	Referencia	
	CG	30 (33)	61 (33)	1.1 (0.6 - 1.9)	0.832
	GG	7 (8)	3 (2)	5.2 (1.3 - 20.9)	0.027
	CG + GG	37 (41)	64 (35)	1.3 (0.8 - 2.2)	0.395
rs2494732	GG ^a	41 (45)	56 (30)	Referencia	
	GA	37 (41)	89 (48)	0.56 (0.32 - 0.99)	0.063
	AA	13 (14)	40 (22)	0.44 (0.21 - 0.93)	0.047
	GA + AA	50 (55)	129 (70)	0.52 (0.31 - 0.88)	0.022

Se predijo la influencia de las variante intrónicas rs2494732 y rs3803304 sobre el lugar de corte y empalme del intrón en el pre-ARNm. Los lugares de

corte y empalme del intrón 13, donde se ubican ambos SNPs, no se alteraron debido al cambio del genotipo de ambos variantes intrónicas. El software predijo correctamente los lugares donadores y aceptores del pre-ARNm.

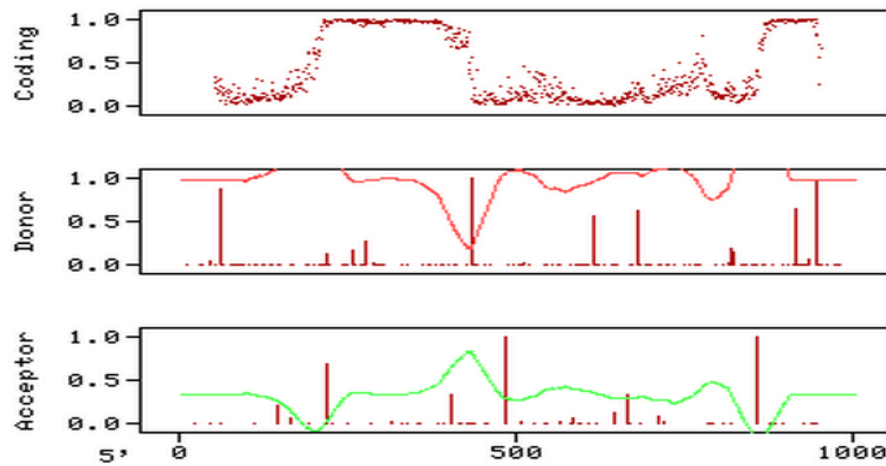


Figura 42. Predicción de lugares de corte y empalme del intrón 13 del gen AKT1. Los lugares predichos corresponden a los lugares donadores y aceptores del intrón 13.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1. HISTOPATOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

El cáncer de mama es el tipo de cáncer que tiene mayor incidencia y es el segundo más mortal en mujeres de Ecuador y el mundo. Según el reporte mundial sobre el cáncer (OMS, 2014), en el 2012 hubieron más de 2 millones de nuevos casos de cáncer de mama y 521 mil defunciones por esta causa. Si bien la población femenina de América Latina no tiene los índices más altos en comparación al resto del mundo, esta enfermedad es un problema de salud pública de gran importancia.

Ecuador se ubica en la posición 56 en cuanto a incidencias de cáncer de mama a nivel mundial de un ranking de 70 países (Forman, y otros, 2013). El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia (A.S.R.) y mortalidad en la población femenina en Quito, reportando 35,8 casos y 12,5 muertes por cada 100 000 habitantes entre los años 2006 y 2010, esta estadística indica que la incidencia de cáncer de mama en Quito se ha incrementado en casi el 50% desde 1986 hasta 2010. Esta cifra posiciona a Quito como la ciudad con mayor incidencia de cáncer de mama en Ecuador, por encima de otras urbes densamente pobladas como Guayaquil (A.S.R.=34,7), Loja (A.S.R.=32.0) y Cuenca (A.S.R.=25.8) (Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleo de Quito, 2014).

Existen varios factores a los que se puede relacionar la aparición de cáncer de mama en una mujer, algunos son controlables como la obesidad, lactancia, maternidad, consumo de alcohol o tratamientos hormonales (Ballard *et al.*, 2009; Britt *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2010; Russo *et al.*, 2005; Hamakima *et al.*, 2002); mientras que otros factores no controlables como la edad, origen étnico, edad de la menarquía y menopausia, además del factor genético, también deben ser analizados (SOLCA, 2014; Suter *et al.*, 2007; Instituto Nacional del Cáncer, 2014).

Al realizar la distribución de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama con las características histopatológicas e inmunohistoquímicas (Tabla 11), no se determinaron relaciones significativas en cuanto a las variables: edad de diagnóstico, lateralidad, estadio tumoral, o márgenes quirúrgicos con los diferentes subtipos de cáncer, con lo que se concluye que estas características y el subtipo del cáncer son independientes. Sin embargo, la presencia de Receptores HER2, ER y PgR, si mostraron relación significativa con los subtipos intrínsecos, ya que la presencia de estos receptores influye en la clasificación intrínseca del tumor.

La edad a la que el cáncer de mama es diagnosticado, es una característica importante al momento de caracterizar el tumor, evaluar los factores de riesgo y subtipos moleculares. Los primeros en determinar la importancia a la que el cáncer de mama es diagnosticado fueron Lilienfeld & Johnson (1955) y De Waard (1979), ya que propusieron que el cáncer de mama se desarrolla por dos rutas diferentes, la primera ruta agrupa a los casos que ocurren antes de la menopausia en edades de cerca de los 50 años, mientras que la segunda ruta agrupa los cánceres postmenopáusicos que usualmente se presentan a edades cercanas a los 70 años (Anderson *et al.*, 2014; Benz, 2007). La población ecuatoriana (Anexo 2) y la muestra tomada en este estudio (Figura 36) siguen esta distribución bimodal con modas cerca a los 50 y 70 años de edad.

Al igual que en un estudio realizado en población británica y canadiense (Curtis *et al.*, 2012), los subtipos Luminal A y Luminal B en la población quiteña tuvieron distribuciones bimodales respecto a la edad de diagnóstico (Figura 36), las modas más altas se presentaron en edades cercanas a los 70 años, mientras que las modas menores se presentaron en edades cercanas a los 50 años, sin embargo esta distribución es inversa para los casos del subtipo Triple Negativo con una moda mayor a los 50 años. En el estudio realizado por Curtis *et al.* (2012) el subtipo HER2 positivo muestra una distribución intermedia con una sola moda a los 60 años, por otro lado los casos analizados en este estudio presentaron una sola moda a la edad de 50 años (Figura 36). Esto indica que la población quiteña tiende a

desarrollar tumores del subtipo HER2 positivo a edades más tempranas que la población anglosajona, fenómeno que se repite en otros países latinoamericanos (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2001).

En este estudio se pueden agrupar los tumores ER positivos (ER+) luminal A y B con modas altas a edades cercanas a 70 años, mientras que los tumores ER negativos (ER-) como HER 2 positivo y Triple Negativo agrupan sus modas más altas en edades cercanas a los 50 años (Figura 36). Esto sugiere que la expresión del Receptor de Estrógenos (ER) en la población quiteña también tiene una distribución bimodal (Figura 37), siendo los tumores ER- (altamente riesgosos) más frecuentes a la edad de 50 años y los ER+ (menos riesgosos) a la edad de 70 años (Anderson, Pfeiffer, Dores, & Sherman, 2006). El riesgo de los tumores ER- se debe a la falta de respuesta hacia tratamientos hormonales (Bauer *et al.*, 2007) y está inversamente relacionado a factores como la ingesta de vegetales (Jung *et al.*, 2013), altos niveles de actividad física (Bao *et al.*, 2011) y uso de hormonas post-menopáusicas (Toriola & Colditz, 2013). En la población quiteña se observa un menor número de tumores ER- (35,2%) que ER+ (64,8%) (Tabla 11), por lo que existe un mejor pronóstico en cuanto a respuesta al tratamiento y mayor tiempo de sobrevida. Por otro lado, la expresión de PgR está asociada a otros factores como índice de masa corporal e historial reproductivo (Colditz *et al.*, 2004). Estos descubrimientos sustentan la hipótesis de que el cáncer de mama es una enfermedad con dos grandes divisiones con diferentes pronósticos, que se originan de dos tipos células diferentes: cánceres del tipo basal a partir de células basales/mioepiteliales, y cánceres no basales (HER2 positivo, Luminal A y B) provenientes del revestimiento interno de los conductos mamarios (Anderson *et al.*, 2014)

Es necesaria una mayor comprensión de la distribución bimodal de la edad a la que el cáncer de mama es diagnosticado, para así mejorar los medios de predicción de mujeres que tienen riesgos más altos de desarrollar cánceres impulsados por hormonas. Y así reducir la incidencia de cáncer de mama entre mujeres ecuatorianas con un riesgo elevado a través de la

administración de moduladores selectivos de ER (Fisher, Constantino, & Wickerham, 1998).

4.2. VARIANTES GENÉTICAS EN EL GEN AKT1

La ruta PI3K/AKT/mTOR es muy importante en el sistema de transducción de señales ya que conecta oncogenes con múltiples funciones celulares, convirtiéndose en la ruta de señalización celular más comúnmente activada en cánceres (Liu *et al.*, 2009). La activación de AKT permite la fosforilación de otras proteínas como GSK3 y FOXO, de esta forma regula una gran cantidad de procesos celulares envueltos en síntesis de proteínas, crecimiento y proliferación celular, metabolismo y angiogénesis (Manning & Cantley, 2007). Además, se ha reportado la expresión elevada de AKT1 en pacientes con cáncer de mama con tiempos de supervivencia más cortos, indicando que la expresión de AKT1 puede ser un marcador para el pronóstico en cáncer de mama (Spears *et al.*, 2012).

Estudios han indicado que la presencia de SNPs en AKT1 pueden ser usados como marcadores del pronóstico en pacientes con cáncer de mama (Yarden *et al.*, 2010). Aunque las mutaciones en AKT1 se han identificado en solo del 1,4 al 8% de los cánceres de mama (Stemke *et al.*, 2008; André *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2015), su análisis ha presentado resultados prometedores en estudios preclínicos (Deluche *et al.*, 2015), y se ha demostrado que la secuenciación Sanger es un método fiable para identificar alteraciones genómicas en este tipo de casos (André *et al.*, 2014). Carpten *et al.* (2007) identificó una mutación en el gen AKT1 en cáncer de mama, esta variante produce la sustitución E17K en el dominio PH de la proteína y permite su activación.

Los SNPs rs2494732 y rs3803304 son variantes intrónicas del gen AKT1 y han sido relacionados con esquizofrenia, psicosis (Bruenig *et al.*, 2014) y riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer. Los SNPs E319G y P388T son variantes genéticas que producen proteínas antónimas, sin embargo en este estudio únicamente se encontraron genotipos homocigotos silvestres de ambos SNPs en casos y controles.

El análisis de la asociación entre los diferentes genotipos y los subtipos intrínsecos de cáncer de mama (tabla 12), determinó que la única relación significativa era una disminución de la frecuencia de tumores TNBC con el genotipo heterocigoto CG del SNP rs3803304 en comparación a la frecuencia esperada, por lo que se puede concluir que la presencia de este genotipo puede reducir la posibilidad de que se desarrolle un tumor TNBC (cáncer altamente severo). Las frecuencias genotípicas totales (Tabla 13) hacen posible determinar que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg ($P > 0.05$). Se analizó la asociación entre los genotipos de los SNPs rs3803304 y rs2494732 y las diferentes características del tumor por medio del test chi cuadrado (χ^2), pero no se encontraron relaciones significativas entre estas variables (tabla 14).

Para determinar el riesgo (OR) de desarrollar cáncer de mama al tener cualquiera de los genotipos, se realizaron tablas de contingencia tomando al genotipo silvestre como referencia. Los OR de cada genotipo fueron comparados con datos de otras poblaciones, y a su vez se tomaron en cuenta estudios clínicos con otros tipos de cáncer, donde se evaluó la respuesta a un tratamiento (Hazard ratio, HR) al poseer las variantes genéticas estudiadas.

Al evaluar el SNP rs2494732 en la población ecuatoriana, se determinó que existía un menor riesgo de presentar cáncer de mama al tener al menos una variante alélica rara en el genotipo (OR=0.52, 95% IC=0.31-0.88; $P=0.022$) (Tabla 15). En estudios realizados en población china se determinó que el haplotipo raro entre rs2494732-rs113233, aumenta significativamente el riesgo de desarrollar cáncer de nasofaringe (OR=3.87, 95% IC=1.96-7.65; $P < 0.001$). Sin embargo, al analizar rs2494732 individualmente no mostró una relación significativa con este cáncer ni con cáncer de piel escamocelular (Zhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Por otro lado, en pacientes coreanos con cáncer de pulmón de células pequeñas, la presencia de al menos una variante alélica rara del SNP rs2494732 produjo una mejor supervivencia general (HR=0.59, 95% IC=0.40-0.86, $P=0.01$) y mejor supervivencia libre de progresión (HR=0.74, 95% IC=0.53-1.03, $P=0.08$) en comparación a los que

presentan el genotipo silvestre (Kim *et al.*, 2012). Estos datos contrastan con un estudio llevado a cabo con población china, donde se evidencio que los pacientes con cáncer de cerebro que presentaron al menos una variante alélica rara del SNP rs2494732 (GA+AA), estaban significativamente asociados a un mayor riesgo de presentar metástasis (HR=1.902, 95% IC=1.259-2.875, $P=0.002$) (Li *et al.*, 2013). Basándonos en esta evidencia no es posible denominar como 'favorable' o 'desfavorable' a un genotipo o alelo del SNP, ya que esta variante tiene un comportamiento diferente entre distintas enfermedades y poblaciones.

Al comparar las frecuencias genotípicas de controles sanos en la población ecuatoriana (tabla 13) y china, se observa que el genotipo raro AA se presenta en mayor cantidad en la población ecuatoriana (22%) que en la población china (3.8-7.33%) (Zhang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Con lo cual se puede deducir que al ser mayor la frecuencia de este genotipo en la población ecuatoriana en comparación a otras poblaciones, el riesgo de desarrollar cáncer de mama podría ser menor en las mujeres ecuatorianas.

El SNP rs3803304 del gen AKT1 ha sido estudiado en pacientes con cáncer esofágico que recibían tratamiento de quimioterapia, en ese estudio se determinó que los individuos con el genotipo heterocigoto CG presentaron una mejor respuesta a la quimioterapia (OR=0.5, 95% IC=0.25-0.99, $P=0.47$) en comparación a aquellos que tenían el genotipo silvestre (Hildebrandt *et al.*, 2009). La presencia de al menos un alelo raro de este SNP en pacientes con cáncer de pulmón que reciben tratamiento de quimioterapia, resulta en una disminución significativa del riesgo de presentar progresión distante del cáncer (HR=0.66, 95% IC=0.42-0.91, $P=0.017$) (Pu *et al.*, 2011). Al estudiar el SNP rs3803304 en la población ecuatoriana, se determinó que al presentar el genotipo raro GG existe un mayor riesgo de presentar cáncer de mama (OR=5.2, 95% IC=1.3-20.9, $P=0.027$) en comparación a los individuos que tienen el genotipo CC.

Se conoce que hay varios mecanismos en los que los intrones podrían influir sobre los mecanismos de transcripción o traducción, es por esta razón que se evaluó si las variantes intrónicas rs3803304 y rs2494732 alteraban

los lugares de corte y empalme de exones e intrones. Al analizar ambas variantes con herramientas de predicción, se comprobó que ambos SNPs no alteran los lugares de corte y empalme del intrón 13 (figura 42), por lo que se sugiere que ambas variantes genéticas podrían influir a otro nivel en la expresión del gen a diferentes niveles como transcripción, poliadenilación o eficiencia de la traducción (Nott *et al.*, 2003; Chorev & Carmel, 2012).

El presente estudio ha tenido limitaciones como un número de muestra pequeño lo que ha generado amplios intervalos de confianza, a su vez no se pudo obtener información de la clasificación morfológica de los tumores. A pesar de estas limitaciones, el estudio puede ayudar a entender de mejor manera la epidemiología del cáncer de mama en Quito y Ecuador.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Existe una distribución bimodal en cuanto a las edades a las que el cáncer de mama es diagnosticado en las mujeres ecuatorianas.

Existe una distribución bimodal en cuanto a la expresión de receptores de estrógeno en tumores de mama en función de la edad de diagnóstico.

Los tumores ER negativos, cánceres con peor pronóstico, se presentan más frecuentemente en edades cerca a los 50 años, mientras que los tumores ER positivos se presentan en su mayoría en edades cerca a los 70 años.

Los resultados en la población ecuatoriana sustentan la hipótesis de que el cáncer de mama es una enfermedad con dos grandes divisiones que poseen diferentes pronósticos.

La población ecuatoriana tiende a desarrollar cáncer de mama del subtipo HER2 positivo aproximadamente 10 años antes, en comparación a la población anglosajona británica y canadiense.

La presencia del genotipo heterocigoto CG del SNP rs3803304 está significativamente relacionada a una reducción del desarrollo de tumores triple negativo (cáncer altamente severo) en la población ecuatoriana.

El genotipo AA del SNP rs2494732 se presenta con mayor frecuencia en la población quiteña en comparación a otras poblaciones.

La presencia de al menos una variante alélica rara del SNP rs2494732 (GA+AA), sugiere que el riesgo de desarrollar cáncer de mama se reduce a la mitad en comparación al genotipo GG en la población ecuatoriana.

La presencia del genotipo raro GG del SNP rs3803304 sugiere que el riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta en cinco veces en comparación al genotipo CC en la población ecuatoriana.

Los SNPs E319G y P388T del gen AKT1 no son representativos en el desarrollo de cáncer de mama en la población ecuatoriana.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Evaluar la eficiencia de las PCRs que se realizan a partir de material genético proveniente de parafinas, ya que en este tipo de muestras se pueden encontrar inhibidores de la *Taq* polimerasa.

Se recomienda utilizar ramping estándar (<1°C/s) así como establecer condiciones de alta sensibilidad (MgCl₂ 3mM) en los ensayos PCR para amplificar muestras provenientes de parafinas.

Comprobar la presencia de variantes genéticas raras de los SNPs de interés, que hayan sido previamente reportadas por medio de bases de datos como dbSNP o 1000 Genomes.

Se recomienda estudiar la relación entre la mayor cantidad de tumores ER negativos que son reportados a edades cercanas a los 50 años, y a su vez los tumores ER positivos que son diagnosticados más frecuentemente a los 70 años de edad.

Analizar la distribución bimodal del cáncer de mama en función de la edad de diagnóstico en un mayor número de individuos en la población ecuatoriana.

Predecir la influencia de SNPs localizados en regiones intrónicas sobre la expresión o estructura de la proteína codificada por medio de herramientas bioinformáticas.

Emplear varios programas predictivos antes de entrar en la fase experimental de la identificación de polimorfismos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Altomare, D. A., & Testa, J. R. (2005). Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*, *24*, 7455-7464.
- American Cancer Society. (2 de Febrero de 2015). *Factores de riesgo del cáncer de seno*. Recuperado el 11 de Febrero de 2015, de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-causas-factores-de-riesgo>
- Anderson, W. F., Pfeiffer, R. M., Dores, G. M., & Sherman, M. E. (2006). Comparison of Age Distribution Patterns for Different Histopathologic Types of Breast Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *15*, 1899-1905.
- Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., Prat, A., Perou, C. M., & Sherman, M. E. (2014). How Many Etiological Subtypes of Breast Cancer: Two, Three, Four, Or More? *Journal National Cancer Institute*, *106*(8).
- André, F., Bachelot, T., Commo, F., Campone, M., Arnedos, M., & Bonnefoi, H. (2014). Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncology*, *15*(3), 267-74.
- Arteaga, C. L. (2002). Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than expression? *Oncologist*, *7*(4), 31-9.
- Ballard, R., Hunsberger, S., Blair, S., & Goodwin, P. (2009). Physical activity, weight control, and breast cancer risk and survival: clinical trial rationale and design considerations. *Journal National Cancer Institute*, *9*, 630-43.
- Bao, P. P., Shu, X. O., Gao, Y. T., Zheng, Y., Cai, H., & Deming, S. L. (2011). Association of hormone-related characteristics and breast cancer risk by estrogen receptor/progesterone receptor status in the

- shanghai breast cancer study. *American Journal of Epidemiology*, 174(6), 661-71.
- Bauer, K., Brown, M., Cress, R., Parise, C., & Caggiano, V. (2007). Descriptive Analysis of Estrogen Receptor (ER)-Negative, Progesterone Receptor (PR)-Negative, and HER2-Negative Invasive Breast Cancer, the So-called Triple-Negative Phenotype. *Cancer*, 109(9), 1721-8.
- Benz, C. (2007). Impact of aging on the biology of breast cancer. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 66(1), 65-74.
- Bergers, G., & Benjamin, L. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401-410.
- Bosch, A., Eroles, P., Zaragoza, R., Viña, J. R., & Lluch, A. (2010). Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treatment Reviews*, 36(3), 206-15.
- Bose, S., Chandran, S., Mirocha, J. M., & Bose, N. (2005). The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Modern Pathology*, 2006(19), 238-245.
- Britt, K., Ashworth, A., & Smalley, M. (2007). Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 14(4), 907-933.
- Bruenig, D., White, M., Young, R., & Voisey, J. (2014). Subclinical psychotic experiences in healthy young adults: associations with stress and genetic predisposition. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 18(10), 683-9.
- Brunak, S., Engelbrecht, J., & Knudsen, S. (1991). Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 220, 49-65.
- Butt, A. J., McNeil, C. M., & Musgrove, E. A. (2005). Downstream targets of growth factor and estrogen signalling and endocrine resistance: the

potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer*, 12, S47-59.

Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., . . . Qian, Y. W. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448(7152), 439-44.

Chorev, M., & Carmel, L. (2012). The function of introns. *Frontiers in genetics*, 3(55), 1-15.

Colditz, G. A., Rosner, B. A., Chen, W. Y., Holmes, M. D., & Hankinson, S. E. (2004). Risk Factors for Breast Cancer According to Estrogen and Progesterone Receptor Status. *Journal National Cancer Institute*, 96(3), 218-228.

Croce, C. M. (2008). Oncogenes and Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358, 502-11.

Cuevas-Rodríguez, S., Franceschi, D., & Labastida, S. (2001). Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer*, 91(4), 836-8.

Curtis, C., Shah, S., Chin, S. F., & Turashvili, G. (Abril de 2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumors reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346-52.

Dannemann, N., Ross, J., Ueno, L., & Vogt, P. (2010). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific AKT1 is oncogenic. *international Journal of Cancer*, 127, 239-244.

De Waard, F. (1979). Premenopausal and postmenopausal breast cancer: one disease or two? *National Cancer Institute*, 63(3), 549-52.

Deluche, E., Onesti, E., & Andre, F. (2015). Precision medicine for metastatic breast cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 35, e2-7.

- Deng, L., Chen, J., Zhong, X., & Luo, T. (2015). Correlation between Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway and Prognosis of Breast Cancer in Chinese Women. *PloS One*, 13(3), e0120511.
- Eckert, L. B., Repasky, G. A., & Ülkü, A. S. (2004). Involvement of RAS activation in human breast cancer signaling, invasion and anokis. *Cancer research*, 64, 4585-92.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698-707.
- Etro, D., Missiroli, S., & Buontempo, F. (Mayo de 2010). *AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)* . Recuperado el 23 de Febrero de 2015, de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology : URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/AKT1ID355ch14q32.html>
- Fisher, B., Constantino, J. P., & Wickerham, D. L. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal National Cancer Institute*, 90(18), 1371-1388.
- Forman, D., Bray, F., Brewster, D. H., Gombe, C., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., . . . Ferlay, J. (2013). *Cancer incidence in Five Continents* (Vol. X).
- Fumagalli, D., Desmedt, C., Ignatiadis, M., & Loi, S. (2011). Gene profiling assay and application: the predictive role in primary therapy. *Journal National Cancer Institute Monographs*, 2011(43), 124-7.
- Gallardo, A., Lerma, E., Escuin, D., Tibau, A., Muñoz, J., Ojeda, B., . . . Peiró, G. (2012). Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *British Journal of Cancer*, 1367-1373.

- Goldhirsch, A., Winer, E. P., Coates, A. S., Gelber, R. D., Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B., & Senn, H. J. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology*, *24*, 2206-2223.
- Goncalves, R., Warner, W., Luo, J., & Ellis, M. (2014). New concepts in breast cancer genomics and genetics. *Breast cancer research*, *16*(460), 1-11.
- Hamakima, N., Hirose, K., & Tajima, K. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British Journal of Cancer*, *87*(11), 1234-1245.
- Hennessy, B., Smith, D., & Ram, P. (2005). Exploiting the PI3K/AKT Pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*, 988-1004.
- Hildebrandt, M., Yang, H., Hung, M., Izzo, J., & Huang, M. (2009). Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR Pathway are associated with clinical outcomes in Esophageal Cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(6), 857-871.
- Hobday, T. J., & Perez, E. A. (2005). Molecularly targeted therapies for breast cancer. *Cancer control*, *12*, 73-81.
- Holz, M. (2012). The rol of S6K1 in ER positive breast cancer. *Cell Cycle*, 3159-3165.
- Hunter, D. J., Colditz, G. A., & Hankinson, S. E. (2010). Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *10*, 2496-2502.
- Ideka, K., & Inoue, S. (2004). Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol*, *67*, 435-43.

- Instituto Nacional del Cáncer. (2014 йил 7-Marzo). *Diccionario del Cáncer*. Retrieved 2014 йил 29-Noviembre from Instituto Nacional del Cáncer: <http://www.cancer.gov/diccionario>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2015). *Cáncer de seno (mama)*. Recuperado el 26 de Enero de 2015, de Instituto Nacional del Cáncer: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>
- International Agency for Research on Cancer. (2003). *Pathology & Genetics Tumors of the Breast and female Genital Organs*. Lyon: IARC Press.
- Jung, S., Spiegelman, D., Baglietto, L., Bernstein, L., & Smith-Warner, S. (2013). Fruit and Vegetable Intake and Risk of Breast Cancer by Hormone Receptor Status. *Journal National Cancer Institute, 105*(3), 219-236.
- Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C., Voduc, D., Speers, C. H., . . . Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology, 28*(20), 3271-7.
- Kim, M., Kang, H., Yup, S., Jeon, H., & Lee, W. (2012). AKT1 Polymorphisms and Survival of Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Surgical Oncology, 105*, 167-174.
- Kreike, B., van Kouwenhove, M., Horlings, H., & Weigelt, B. (2007). Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Research, 9*(5), R65.
- Li, Q., Yuang, J., Wu, H., Liu, B., & Xiong, H. (2013). Associations between Single-nucleotide Polymorphisms in the PI3K-PTEN-mTOR Pathway and Increased Risk of Brain Metastasis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research, 19*(22), 6252-6260.
- Lilienfeld, A. M., & Johnson, E. A. (1955). The age distribution in female breast and genital cancers. *Cancer, 8*, 875-82.

- Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., & Forrest, N. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature medicine*, 15(8), 907-13.
- Liu, P., Cheng, H. C., Roberts, T., & Zhao, J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in breast cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(8), 627-644.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, . . . Darnell. (2005). *Biología celular y molecular* (Quinta ed.). Buenos Aires: Panamericana.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., & Dennis, P. A. (2007). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates*, 11(2008), 32-50.
- Luque, J., & Herráez, J. (2001). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Madrid: Ediciones Harcourt.
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PBK signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-74.
- Nott, A., Meislin, S., & Moore, M. (2003). A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA*, 9, 607-617.
- Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2007). *Genética Médica Thompson & Thompson* (Séptima ed.). Elsevier Masson.
- Organización Mundial de la Salud. (2008). *The global burden of disease*. WHO.
- Paplomata, E., & O'Regan, R. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6(4), 154-166.
- Parilkh, C., Janakiraman, V., Wu, W., Foo, C., & Kljavin, N. (2012). Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 109(47), 19368-73.

- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Molecular Oncology*, 5(1), 5-23.
- Prat, A., Parker, J. S., & Karginova, O. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(5), R68.
- Pu, X., Hidelbrandt, M., Lu, C., Lin, J., Stewart, D., & Ye, Y. (2011). PI3K/PTEN/AKT/mTOR Pathway Genetic Variation Predicts Toxicity and Distant Progression in Lung Cancer Patients Receiving Platinum-based Chemotherapy. *Lung Cancer*, 71(1), 82-88.
- Rodríguez, S., Gaunt, T., & Day, I. (2009). Hardy Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology*.
- Russo, J., Moral, R., & Balogh, G. (2005). The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 7(3), 131-142.
- Schulz, W. A. (2007). *Molecular biology of human cancers. An advanced student's textbook*. Dordrecht: Springer.
- Shanthi, V., Rajasekaran, R., & Ramanathan, K. (2014). Computational Identification of Significant Missense Mutations. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(2), 957-65.
- Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleo de Quito. (2014). *Epidemiología del Cáncer en Quito 2006-2010* (15 ed.). (Cueva, & Yépez, Edits.) Quito, Ecuador: SOLCA Quito.
- Somma, M. (2015). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://gmo->

crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesi%C3%B3n4.pdf

- Sorlie, T., Perou, C. M., & Tibshirani, R. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(19), 10869–10874.
- Spears, M., Cunningham, C. A., & Taylor, K. J. (2012). Proximity ligation assays for isoform-specific Akt activation in breast cancer identify activated Akt1 as a driver of progression. *Journal of Pathology*, *227*, 481-9.
- Stemke, K., Gonzalez-Angulo, A., Lluch, A., Neve, R., & Hennessy, B. (2008). An Integrative Genomic and Proteomic Analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT Mutations in Breast Cancer. *Cancer Research*, *68*(15), 6084-91.
- Stephens, P. J., Greenman, C. D., & B, F. (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, *144*, 27-40.
- Suter, R., & Marcum, J. A. (2007). The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy. *Biologics: Targets & Therapy*, *1*(3), 241-258.
- Testa, J. R., & Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academic Sciences of the United States of America*(98), 10983–10985.
- Toriola, A. T., & Colditz, G. A. (2013). Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. *Breast Cancer Research Treatment*, *138*(3), 665-673.
- Volinia, S., Calin, G. A., & Liu, C. G. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 2257-61.

- Wander, S., Hennessy, B., & Slingerland, J. (2011). Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(4), 1231-1241.
- Wang, Y., Lin, L., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., & Dan, H. (2015). Genetic variants in AKT1 gene were associated with risk and survival of OSCC in Chinese Han Population. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, *44*, 45-50.
- Watson, J. D. (2006). *Biología molecular del gen* (Quinta edición ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Weigelt, B., Mackay, A., & A'Hern, R. (2010). Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncology*, *11*(4), 339-49.
- Yarden, R., Friedman, E., Metsuyanin, S., Olender, T., Ben-Asher, E., & Papa, M. (2010). Single-Nucleotide Polymorphisms in the p53 Pathway Genes Modify Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Carriers of Jewish-Ashkenazi Descent. *Molecular Carcinogenesis*, *49*, 545-555.
- Zhang, X., Chen, X., Zhai, Y., & Cui, Y. (2014). Combined effects of genetic variants of the PTEN, AKT1, MDM2 and p53 genes on the risk of nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, *9*(3), 1-7.

ANEXOS

Anexo 1. Indicadores epidemiológicos del cáncer de mama por periodos en Quito. Fuente: Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleo Quito, 2014.

**MAMA FEMENINA. INDICADORES PRINCIPALES POR PERÍODOS
RESIDENTES EN QUITO. 1986-2010**
FEMALE BREAST. MAIN INDICATORS BY PERIODS. QUITO RESIDENTS. 1986-2010

INDICADORES / INDICATORS	1986-1990	1991-1995	1996-2000	2001-2005	2006-2010
UBICACIÓN* RANK	2	2	1	1	1
FRECUENCIA RELATIVA (%)* RELATIVE FREQUENCY	18	14	17	19	18
PROMEDIO DE CASOS POR AÑO AVERAGE CASES PER YEAR	109	125	165	231	279
PROMEDIO DE MUERTES POR AÑO AVERAGE DEATHS PER YEAR	18	36	59	80	99
TASA DE INCIDENCIA CRUDA RATE INCIDENCE CRUDE	19,2	20,2	23,9	30,6	34,4
TASA DE INCIDENCIA ESTANDARIZADA A.S.R.W. INCIDENCE	27,3	27,1	28,8	34,2	35,8
TASA DE MORTALIDAD CRUDA RATE MORTALITY CRUDE	5,0	5,8	8,5	10,5	12,2
TASA DE MORTALIDAD ESTANDARIZADA A.S.R.W. MORTALITY	7,0	8,1	10,0	11,8	12,4
TASA ACUMULADA 0-74 (%) CUMULATIVE RATE 0-74	3,0	3,2	3,2	3,8	4,1
RAZÓN MORTALIDAD / INCIDENCIA (%) MORTALITY / INCIDENCE RATIO	25,9	28,7	35,6	34,4	35,4
% DE VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA % OF HISTOLOGICAL VERIFICATION	80,7	82,8	89,9	93,9	94,6
% SOLO CERTIFICADOS DE DEFUNCIÓN % DEATH CERTIFICATE ONLY	8,8	6,5	4,0	3,0	2,6

* SIN PIEL / BUT SKIN

Anexo 2. Tasa de incidencia de cáncer de mama por edad en población femenina de Quito.
 Fuente: Sociedad de Lucha Contra el Cáncer Núcleo Quito, 2014.

