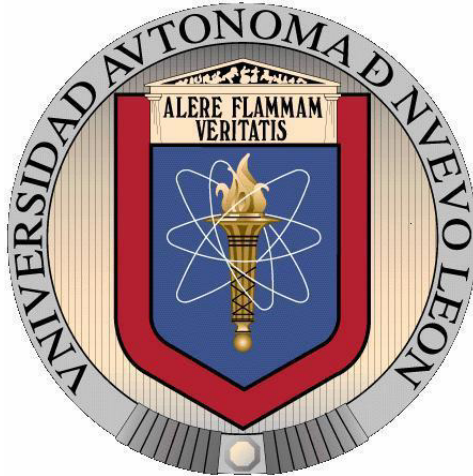


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE ADENOCARCINOMA DUCTAL
INFILTRANTE CON ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS
PATOGENICAS FOCALES Y AMPLIAS”**

POR

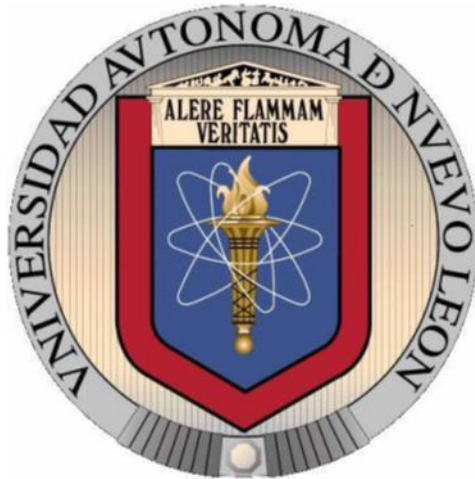
Q.B.P. ANA ITZEL ZARAZÚA NIÑO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA

SEPTIEMBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE ADENOCARCINOMA DUCTAL
INFILTRANTE CON ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS
PATOGENICAS FOCALES Y AMPLIAS”**

POR

Q.B.P. ANA ITZEL ZARAZÚA NIÑO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA
GENÉTICA**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. EN C. CARLOS CÓRDOVA FLETES**

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

SEPTIEMBRE DE 2017

**“ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE ADENOCARCINOMA DUCTAL
INFILTRANTE CON ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS
PATOGENICAS FOCALES Y AMPLIAS”.**

Aprobación de tesis:



Dr. en C. Carlos Córdoba Fletes
Director de Tesis



Dra. en C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla
Co-Director de Tesis



Dr. en C. Hugo Alberto Barrera Saldaña
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos perteneciente al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. en C. Carlos Córdova Fletes.

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León,
Monterrey, Nuevo León, 2017.

COLABORADORES

Med. Manuel de Jesús García Solís
Clínica de Mama
Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda” SSNL

Med. Gabriela Sepúlveda Castañeda
Clínica de Mama
Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda” SSNL

Dra. en Med. Raquel Garza Guajardo
Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología
Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” UANL

Med. Cristina García Padilla
Departamento de Cirugía General
Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” UANL

M.C. Paúl Mendoza Pérez
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Facultad de Medicina UANL

Med. Luis Fernando Sandoval Arellano
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Facultad de Medicina UANL

PROYECTO APROBADO

Comité de Ética en Investigación
del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” UANL.

No. de registro BI15-002

Dirección de Enseñanza, Investigación en Salud y Calidad
de Secretaría de Salud de Nuevo León.

No. de registro DEISC-19 01 16 23

FINANCIAMIENTO

Convocatoria Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social

SS/IMSS/ISSSTE - CONACYT 2014

No. de registro 233212

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque cada instante que vivo me demuestras que siempre estas guiando mi camino.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme una vez más la oportunidad de continuar mi formación académica en esta honorable institución.

A la Facultad de Medicina por permitirme formar parte de ella como estudiante, ayudarme a crecer intelectualmente y enseñarme lo extraordinario que puede ser el conocimiento.

Al Dr. en C. Carlos Córdova Fletes por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza, impulsándome a descubrir mi talento y a desarrollar mi potencial. Gracias por todas sus enseñanzas durante este tiempo, los invaluable conocimientos y las enseñanzas personales, que permanecerán por siempre. No escatime en la dedicación que tiene hacia sus estudiantes. Es algo que lo caracteriza.

Al Med. Manuel de Jesús García Solís por su invaluable apoyo para la realización de este trabajo. Me alegra mucho que existan personas como usted, con vocación en su labor como médico y dispuesto a apoyar plenamente los proyectos de investigación. Mi entero respeto y agradecimiento.

A mi comisión de tesis la Dra. en C. Ana María Guadalupe Rivas Estilla y al Dr. en C. Hugo Alberto Barrera Saldaña por sus valiosas sugerencias y tutela en el desarrollo de este trabajo.

A Alejandro García Ruíz porque fuiste como un papá para mi. Gracias por tus consejos, sugerencias, por todo el apoyo brindado y tu amistad. Me enorgullece tu manera de ser, tan pura y humilde de alma, siempre dispuesta a ayudar y a lograr que todos aprendamos. Nunca cambies esa manera de ser que te distingue y hace que dejes huella en las personas.

A Martha Montserrat Rangel Sosa porque cada día de trabajo se hacía ameno a tu lado. Compartimos tantas experiencias y aprendimos una de la otra. Gracias por ayudarme a crecer y dejarme ser parte de tu historia.

A mis compañeros de laboratorio Luis Fernando Sandoval, Elda Ariadna Flores, Paúl Mendoza, Valeria Bañuelos, Priscila Rodríguez, Antonio Caramés, Juan Gallegos, Osmar Arturo González, Cecilia Aguirre, Carlos Iván Avila, Yanelli Morales, Carlos Ulises Mazariégo y Nohemi Cigarroa. Nunca olvidaré todos los instantes felices que pasamos juntos, todas las risas y pláticas; lo cierto es que no puedo quejarme de ninguna manera, pues soy dichosa de haberlos conocido. Todos vamos en diferentes direcciones, pueden suceder muchas cosas y más cuando se trata de pensar en el porvenir, pero les deseo el mejor de los éxitos a todos.

Siempre he pensado que soy afortunada en haberlos encontrado, porque de no haber sido así, no tengo idea de como habría salido adelante cada vez que la vida me daba sorpresas. Porque con ustedes aprendí, viví y entendí lo que es estar lejos de casa. No importa cuantos años pasen, ni si tomamos un rumbo distinto, porque la alegría de encontrarlos en cada parada de la vida siempre permanecerá intacta. Gracias por hacerme comprender que siempre se puede sacar lo mejor de cada situación, por abrirme las puertas de su casa, permitirme vivir con ustedes en innumerables ocasiones, por tantos momentos divertidos, por compartir y entender mi personalidad, pues así es como los amigos lo hacen. Florencia Estefana Pedroza, Griselda Aidé Cabral, Hazyadee Frecia Rodríguez, Stephen Adonái León Icaza, Juan Francisco Tamez y Alejandro Cerna jamás dejarán de estar en mi corazón.

A la Dra. en C. Elva Teresa Aréchiga Carvajal porque me inspiró a dar lo mejor de mí para descubrir un conocimiento que ya tenía dentro del alma. Le estoy eternamente agradecida.

A todas las personas que me alentaron a seguir adelante en este camino y que desinteresadamente me ayudaron a culminar una más de mis metas. Infinitas gracias.

Al personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo en el financiamiento de este trabajo y alentar a estudiantes a seguir el camino de la investigación.

DEDICATORIA

A la vida, porque te estoy agradecida por toda la dicha que me has dado y lo que me queda por recibir.

A mi mamá Ana María Niño Espiricueta, porque toda la vida me has impulsado a salir adelante ante cualquier situación que se presente, por la risa y los regaños, por tener esa paciencia para soportar mis enojos. Por enseñarme lo que son la fortaleza y el temple, por tus consejos en los momentos difíciles y también por todas las veces que callaste, para que yo aprendiera con tu silencio. Gracias por dejarme tomar mis propias decisiones, mis propios riesgos y respetarlos.

A mi papá Osvaldo Zarazúa Vázquez, porque cuidas siempre de mí, te preocupas por mis necesidades y anhelos. Has compartido conmigo todos los momentos alegres y has estado siempre a mi lado en los momentos tristes en los que nos vimos inmersos en algún momento de nuestras vidas. Gracias por todo, pero más que nada, por lo que me enseñas con tu ejemplo de persona honesta, abnegada y tu amor desinteresado siempre.

A mi abuela Ambrosia Espiricueta, gracias por estar a mi lado, por ser el refugio que a veces necesito en tus brazos, por tu sonrisa sincera, por la generosidad y los valores que siempre te han caracterizado.

“La ciencia, muchacho, está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer, pues poco a poco, conducen a la verdad.”

Julio Verne

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABLAS	16
RESUMEN	17
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Fuentes de información en México	19
1.2 Panorama epidemiológico en México	20
1.3 Alcances y limitaciones de la mastografía	20
1.4 Clasificación histológica del cáncer de mama	21
1.5 Clasificación molecular del cáncer de mama	22
1.6 Genética aplicada al cáncer de mama	22
1.7 Avances en el diagnóstico molecular e investigación del cáncer de mama	24
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	26
2.1 Antecedentes directos	27
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	30
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	31
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos específicos	32
CAPÍTULO VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
6.1 Tipo de estudio	33
6.2 Universo de estudio	33
6.3 Muestras de estudio	34
6.3.1 Tamaño de la muestra	34
6.3.2 Descripción de las muestras	34
Criterios de inclusión	34
Criterios de no inclusión	34
Criterios de eliminación	35
6.4 Aspectos éticos	35
CAPÍTULO VII. MATERIAL Y EQUIPOS	36
7.1 Material biológico	36
7.2 Materiales y reactivos	36
7.2.1 Materiales consumibles	36
7.2.2 Reactivos	37
7.2.3 Materiales y reactivos para microarreglos	38
7.2.4 Materiales y reactivos para qPCR	38
7.3 Equipos	39
7.3.1 Equipos de uso general	39
7.3.2 Equipos para microarreglos	39

7.3.3 Equipos para qPCR.....	39
7.4 Programas bioinformáticos y bases de datos.	40
CAPÍTULO VIII. METODOLOGÍA.....	41
8.1 Estrategia general.....	41
8.2 Base de datos clínico-patológicos.....	41
8.3 Obtención de la muestras.....	42
8.4 Extracción de ARN.....	42
8.5 Microarreglos de expresión.....	43
8.6 Análisis de datos.....	43
8.8 Retrotranscripción.....	44
8.9 Validación de un posible biomarcador.....	44
8.9.1 PCR tiempo real.....	45
CAPÍTULO IX. RESULTADOS.....	46
9.1 Base de datos clínico-patológicos.....	46
9.2 Microarreglo de CGH.....	47
9.3 Selección de las muestras de ARN.....	48
9.4 Microarreglo de expresión.....	49
9.5 Análisis de datos.....	50
9.6 Análisis multi-ómico.....	62
9.7 Validación de un posible biomarcador.....	66
9.7.1 qPCR.....	66
CAPÍTULO X. DISCUSIÓN.....	68
CAPÍTULO XI. CONCLUSIONES.....	75
CAPÍTULO XII. PERSPECTIVAS.....	76
CAPÍTULO XIII. REFERENCIAS.....	77
CAPÍTULO XIV. ANEXOS.....	81
Anexo I. Preparación de soluciones.....	81
1.1 EDTA 0.5 M (pH 8.0) para 1L.....	81
1.2 Buffer TBE 10X para 1L.....	81
1.3 Gel de agarosa al 1% para 35 ml.....	81
1.4 SDS 10X para 1L.....	82
1.5 Buffer PBS (pH 7.4)10X para 1L.....	82
1.6 Reconstitución de buffer de lavados para microarreglos con Triton X-102.....	82
Anexo II. Consentimiento informado.....	83
I. Consentimiento informado.....	83
2.1 Propósito del estudio.....	84
2.2 Criterios de inclusión y exclusión.....	84
2.3 Medicamento/dispositivo de estudio.....	84
2.4 Procedimientos.....	84
2.5 Terapias alternativas.....	85
2.6 Riesgos y molestias.....	85
2.7 Posibles beneficios.....	85
2.8 Nuevos hallazgos.....	85
2.9 Retiro y terminación.....	85

2.10 Costos, reembolsos y pagos	86
2.11 Confidencialidad/expediente clínico	86
2.12 Intervención del médico familiar	88
2.13 Compensación y tratamiento de lesiones	88
2.14 Declaración	88
2.15 Firmas	89
II. Aseguramiento del investigador o del miembro del equipo	89
Anexo III. Extracción de ARN total	90
Anexo IV. Protocolo de microarreglos de expresión un color.	91
4.1 Preparación de Spike-In un color Cy3.....	91
4.2 Preparación de la reacción de marcaje.....	91
4.3 Purificación del ARN amplificado y marcado.....	92
4.4 Cuantificación del ARNc.....	93
4.5 Hibridación de las muestras.....	93
4.6 Lavado del microarreglo.....	94
Anexo V. Validación de un posible biomarcador en CaMa.	95
5.1 Diseño de primers	95
5.2 PCR punto final en gradiente de temperatura.....	96
Anexo VI. Datos clínicos.....	102
5.1 Historia clínica.....	102
Anexo VII. Microarreglo de CGH.	109
6.1 Comparación de tejido sano adyacente vs tejido tumoral.	109
Anexo VIII. Microarreglos de expresión génica.....	113
8.1 Posicionamiento de muestras.....	113
8.2 Control de calidad.....	113
8.3 Análisis de datos	114
Anexo IX. Análisis multi-ómico	117
9.1 CNA focales y amplias	117
9.2 Multi-ómico	117
Anexo X. Análisis genómico y de expresión de cada paciente como muestras independientes.....	118
Anexo XI. Vías de señalización alteradas de acuerdo al perfil de expresión génica en CaMa ($p < 0.01$).....	121

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	Microlitro
°C	Grados centígrados
aCGH	Microarreglos de hibridación genómica comparativa
ACDI	Adenocarcinoma ductal infiltrante
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-lnc ERP44-3	ARN largo no codificante proteína 44-3 de retículo endoplásmico
CaMa	Cáncer de mama
chr	Cromosoma
CNA	Alteraciones en el número de copias
CNV	Variaciones en el número de copias
Cy3	Cianina 3
EGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
IL-7	Interleucina 7
L	Litro
Log	Logaritmo
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción
TE	Tris-EDTA
TN	Triple negativo
TGFBR	Receptor del Factor de Crecimiento Transformante Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación molecular de cáncer de mama.....	22
Figura 2. Paneles multigénicos de estudio del cáncer de mama	23
Figura 3. Alteraciones en el número de copias identificadas mediante aCGH	27
Figura 4. Frecuencia de las alteraciones en el número de copias (CNA) y genes alterados en los subtipos moleculares de CaMa	28
Figura 5. Vías de señalización alteradas en los subtipos moleculares de CaMa.....	29
Figura 6. Diagrama de estrategia experimental.....	41
Figura 7. Gráfica de la edad de menarquia y menopausia de las pacientes del estudio.....	46
Figura 8. Diagrama de Venn del número de CNA identificadas en tejido tumoral vs tejido sano adyacente y el número de alteraciones que comparten ambos.....	47
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR safe.....	48
Figura 10. Cálculo del rendimiento y actividad específica de las muestras.....	49
Figura 11. Escaneo del microarreglo de expresión, imagen representativa	50
Figura 12. Diagrama de Venn del análisis de significancia comparativo entre $p < 0.05$ y $p < 0.01$ con un fold change ≥ 2	51
Figura 13. Relación de intensidad de expresión génica (Log) en cada una de las sondas del microarreglo denominadas entidades.	51
Figura 14. Mapa de calor de las 34 entidades sobreexpresadas en tejido tumoral, respecto al tejido sano adyacente.....	52
Figura 15. Mapa de calor de las 65 entidades subexpresadas en tejido tumoral, respecto al tejido sano adyacente.....	52
Figura 16. Expresión génica de las 99 entidades diferencialmente expresadas	53
Figura 17. Mapa de interacciones de las 99 entidades diferencialmente expresadas en tejido tumoral vs tejido sano adyacente, STRING v10.5	54
Figura 18. Vías de señalización diferencialmente expresadas identificadas.....	55
Figura 19. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización del TGFBR.....	56
Figura 20. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización del EGFR1	56

Figura 21. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización de IL-7.....	57
Figura 22. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización de Wnt.....	57
Figura 23. Vía parcial del receptor del TGFBR.....	58
Figura 24. Vía parcial del receptor del EGFR1.....	59
Figura 25. Vía parcial de la IL-7.....	60
Figura 26. Vía parcial de Wnt.....	61
Figura 27. Selección de genes diferencialmente expresados identificados en el estudio....	62
Figura 28. Diagrama de Venn integración de CNA y expresión génica identificadas en tejido tumoral y el número de genes que comparten ambos.	63
Figura 29. Vía del EGFR1.....	64
Figura 30. Vía del receptor del TGFBR.....	65
Figura 31. Expresión relativa de <i>ARN-lnc ERP44-3</i>	67
Figura 32. Genes identificados en el análisis multi-ómico.....	70
Figura 33. Genes estadísticamente significativos de acuerdo al análisis multi-ómico.....	71
Figura 34. Curva estándar de concentraciones de ADNc para <i>GAPDH</i>	99
Figura 35. Curva estándar de concentraciones de ADNc para <i>lncERP44</i>	100
Figura 36. Curva de fusión de <i>GAPDH</i> y <i>lncERP44</i>	101
Figura 37. Reporte de control de calidad de microarreglos de expresión génica.....	113
Figura 38. Distribución cromosómica de CNA focales y amplias con aCGH.....	117
Figura 39. Diagrama de Venn integración de CNA y expresión génica identificadas en tejido tumoral y el número de genes que comparten ambos.	117

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación histológica del cáncer de mama	21
Tabla 2. Criterios para considerar candidato a un paciente a una prueba molecular de los genes relacionados con cáncer de mama hereditario.....	24
Tabla 3. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs sano adyacente.....	69
Tabla 4. Descripción de ARN-lnc diferencialmente expresados en muestras de CaMa.....	73
Tabla 5. Componentes de mix T7.	91
Tabla 6. Componentes para retrotranscripción para ADNc.	92
Tabla 7. Componentes para retrotranscripción para ARNc.	92
Tabla 8. Mix para hibridación en el microarreglo.....	94
Tabla 9. Características del transcrito del ARN-lnc.....	95
Tabla 10. Características de los primers a utilizar dirigidos a amplificar <i>lnc-ERP44-3</i>	96
Tabla 11. Concentraciones de reactivos que se utilizaron para la PCR punto final.....	97
Tabla 12. Pasos de temperatura para PCR punto final.....	97
Tabla 13. Características de los primers a utilizar dirigidos a amplificar <i>GAPDH</i>	98
Tabla 14. Concentraciones de reactivos a utilizar para la qPCR	98
Tabla 15. Pasos de temperatura utilizados para la qPCR.....	98
Tabla 16. Clasificación histopatológica de pacientes participes en el estudio de expresión ...	102
Tabla 17. Fichas de identificación de pacientes que participaron en el estudio de expresión .	102
Tabla 18. Genes con CNA compartidos en tejido tumoral y sano adyacente.	109
Tabla 19. Distribución de las muestras en los microarreglos de expresión génica.....	113
Tabla 20. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral respecto al tejido sano adyacente ($p<0.01$).	114

RESUMEN

ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE ADENOCARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE CON ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS PATOGENICAS FOCALES Y AMPLIAS

Nombre: QBP. Ana Itzel Zarazúa Niño.
Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León.
Localización: Monterrey, N.L. México.
Fecha de titulación: Septiembre 2017.

Introducción: El cáncer de mama (CaMa) es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres, con una estimación de 1,67 millones de nuevos casos diagnosticados en el año 2012 y representando 25% de todos los cánceres, aunado a que sigue siendo la causa más común de muerte por cáncer entre las mujeres. Debido a que los tumores de mama son muy heterogéneos y dinámicos, es esencial comprender los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo y la adquisición de malignidad. Por ejemplo, el estudio de las alteraciones en el número de copias (CNA) y sus consecuencias a nivel transcripcional, ha proporcionado datos relevantes con respecto a la biología tumoral, el diagnóstico y tratamiento de CaMa. **Objetivo:** Analizar el transcriptoma de biopsias de adenocarcinomas ductales infiltrantes de pacientes del Noreste del país para correlacionarlo con sus CNA focales y amplias. **Material y Métodos:** Se analizó el transcriptoma de 24 biopsias (12 tumores y 12 tejido sano adyacente) utilizando los microarreglos SurePrint G3 Human Gene Exp v3, 8x60K un color, los cuales fueron escaneados en la plataforma de microarreglos SureScan y analizados integralmente (análisis multi-ómico) con el software GeneSpring GX v14.5 (Agilent Technologies). **Resultados:** Se identificaron 99 entidades diferencialmente expresadas ($p < 0.01$) entre tejido tumoral vs. tejido sano adyacente, de las cuales, 34 estuvieron sobreexpresadas y 65 subexpresadas en el tumor con respecto al tejido sano adyacente. Entre estas entidades, se identificaron ARN-lnc diferencialmente expresados, destacando *lnc-C9orf131-1*, *lnc-SLC25A21-2*, *lnc-ERP44-3*, *lnc-BBOX1-1*, *lnc-SPRYD3-1* y *lnc-GLB1-1*. Adicionalmente, el análisis integral con CNA mostró un panel de 590 alteraciones en el ADN procedente de CaMa ductal infiltrante. Derivado de este último, encontramos una correlación del 42% (96 genes, $p < 0.01$) entre las CNA identificadas y la expresión génica. Las vías de señalización identificadas con significancia estadística de la correlación de datos multi-ómicos fueron EGFR1 y TGFBR, las cuales corresponden con los datos de la literatura. Sin embargo, algunos genes diferencialmente expresados en las vías no se han asociado a CaMa. Entre estos, validamos por qPCR un ARN-lnc, que es candidato como biomarcador en CaMa. **Conclusiones:** Se realizó exitosamente un análisis de transcriptoma de todas las muestras incluidas en este estudio, así como un análisis multi-ómico integrando datos de CNA y expresión génica. Además de confirmar datos de la literatura, encontramos nuevos genes diferencialmente expresados, entre ellos un potencial biomarcador diagnóstico para CaMa.

Firma del asesor



Dr. en C. Carlos Córdova Fletes

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres, con una estimación de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados en el año 2012 y representando 25% de todos los cánceres; aunado a que sigue siendo la causa más común de muerte por cáncer entre las mujeres, representando 522,000 muertes en 2012 según la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (<http://www.iarc.fr/>).

De acuerdo con el Informe Mundial sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia del cáncer podría aumentar 50% para el año 2020, donde habría 15 millones de nuevos casos en el mundo y alcanzaría más de 16,500 casos por año en México (Knaul *et al*, 2009; SINAIS, 2011), aunque esta cifra podría ser mayor, según el proyecto GLOBOCAN.

Debido a que los tumores de mama son muy heterogéneos y dinámicos, es esencial comprender los mecanismos moleculares implicados en su desarrollo y de la adquisición de malignidad. Por ejemplo, las alteraciones en el número de copias (CNA), las cuales permiten reconocer patrones de pérdida y ganancia de ADN a través del análisis genómico de estos tumores. Estas CNA se presentan generalmente *de novo* y pueden clasificarse como alteraciones tipo focales y amplias. Las primeras poseen un tamaño menor a las 100kb y pueden contener genes; mientras que las segundas poseen un tamaño superior a las 100kb pudiendo incluir regiones codificantes y no codificantes (Haverty *et al.*, 2008).

Las CNA pueden servir como marcadores para la clasificación de subtipos de CaMa y utilizarse para identificar genes críticos en el desarrollo de la biología tumoral y así permitir el desarrollo de nuevas herramientas de predicción de riesgo y respuesta a tratamientos de esta enfermedad.

1.1 Fuentes de información en México

Pese a que el cáncer es un grave problema de salud pública, en México hay escasa información en relación al aumento de su incidencia y mortalidad. Ello, debido a la ausencia de registros poblacionales confiables de este grupo de enfermedades. Históricamente la necesidad de un sistema de información que permitiera conocer la frecuencia y distribución de las diferentes neoplasias malignas en México, llevó al surgimiento en el año de 1982, del Registro Nacional del Cáncer (RNC), como parte de la Coordinación de Lucha contra el Cáncer y la Dirección General de Epidemiología, sirviendo como base para evaluar los diversos programas de salud que se relacionan con dicho padecimiento y enfocados en el beneficio de la población (Sánchez *et al.*, 2015).

Durante este año se realizó la prueba piloto del RNC en tres hospitales de la Ciudad de México (SS, IMSS e ISSSTE). Un año después ya participaban 34 unidades de atención médica; para 1985 aumentó a 45 y en 1989 a 56. Sin embargo, la cobertura era insuficiente y fue hasta 1993 que se creó el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), con el cual un año después se firmó el Convenio Institucional de Concentración de Acciones para el Establecimiento del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, teniendo como objetivo obtener y difundir información sobre la frecuencia y distribución de neoplasias malignas a nivel nacional, para conocer la verdadera dimensión epidemiológica del cáncer en México, a fin de tomar decisiones en salud pública, planeación de servicios, educación e investigación (Fajardo, 2008; SINAVE *et al.*, 2011).

En su primer año se registraron 40,924 casos de cáncer confirmados por histología y para el año 2003 ya eran más de 110,000 casos (Mohar, 2007; Fajardo, 2008). Sin embargo, a partir del año 2007 se abandonó este registro por parte de las autoridades responsables en aquel momento de la captura y generación de información en el RHNM. Ante esta ausencia, y dada la importancia de desarrollar un registro poblacional a partir del año 2012, se retomó la idea de crear un nuevo registro de cáncer en México.

1.2 Panorama epidemiológico en México

El RHNM registró una incidencia de CaMa de 63,833 diagnósticos histopatológicos de tumor maligno de mama en el periodo de 1998 a 2003. Con una tasa de mortalidad por CaMa en ese periodo de 14 a 16 defunciones por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años de edad (Cabrera *et al.*, 2008).

En México a partir del 2006 el CaMa se encuentra como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer y desde el año 2008 los tumores malignos ocupan el tercer lugar como causa de mortalidad entre los mexicanos, donde el CaMa posee una de las tasas más altas con un 9.2 /10,000 habitantes y 20,444 casos durante 2012 (Palacio *et al.*, 2009). Se sabe que la incidencia del CaMa aumenta con la edad, de 1.5 casos por cada 100,000 mujeres de los 20 a 24 años de edad a 421.3 casos por cada 100,000 mujeres de los 75 a 79 años de edad; donde el 95% de los casos nuevos ocurren en mujeres de 40 años de edad o mayores, con una mediana de edad de diagnóstico de 61 años.

1.3 Alcances y limitaciones de la mastografía

Los métodos tradicionales empleados para la atención de patologías mamarias han sido siempre un desafío para lograr un diagnóstico que permita detectar el CaMa en estadios primarios. Por ello han surgido herramientas y métodos de diagnóstico que complementan e incrementan la sensibilidad y especificidad para diagnósticos oportunos, como el ultrasonido, la tomosíntesis, la detección asistida por computadora (CAD), la mastografía digital, la tomografía por emisión de positrones/TC, la elastografía, la resonancia magnética (RM) y la termografía mamaria. Entre todos estos métodos, destaca la mastografía, la cual mostró que el CaMa no es una enfermedad sistémica desde su inicio, sino que es una enfermedad progresiva, la cual puede ser detenida si se detecta en un estadio temprano (Tábar *et al.*, 1992; 2000); además de ser la única modalidad de detección que ha demostrado disminuir la mortalidad del CaMa entre 26 y 31%.

Dentro de las limitaciones de la mastografía se menciona que esta puede ser difícil de interpretar para ciertos tipos de senos. Esto se debe a que hay una amplia variación en la densidad del tejido mamario entre las mujeres. Los senos más densos presentan mayor

dificultad para obtener imágenes y son más difíciles de diagnosticar. Por ésta y otras razones, la sensibilidad de la mamografía para detectar cáncer puede variar ampliamente. Para muchos casos difíciles, la mamografía de rayos X por sí sola puede no ser lo suficientemente sensible o precisa para detectar cáncer, por lo que también se pueden usar tecnologías de imágenes adicionales, como el ultrasonido o la imagen por resonancia magnética (IRM), para aumentar la sensibilidad del examen (NIH, 2013).

1.4 Clasificación histológica del cáncer de mama

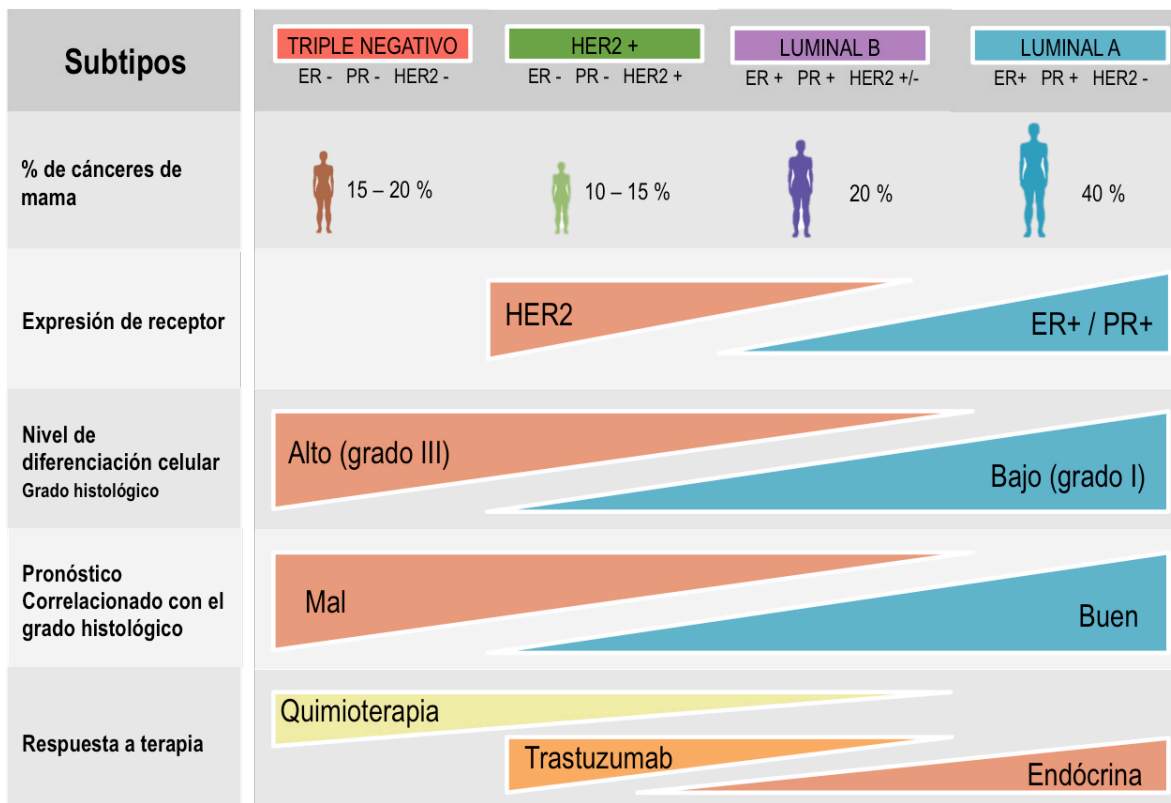
Desde el punto de vista histológico, la mama está compuesta por tejido epitelial, conjuntivo y adiposo. A partir de estos tres tejidos se puede originar un tumor. Sin embargo, a partir del tejido epitelial se originan la mayoría de las neoplasias, especialmente las malignas. Se compone de la unidad ductolobulillar, a partir de la cual se originan los carcinomas ductales y lobulillar. El carcinoma ductal invasor corresponde al grupo más amplio de carcinomas invasores, ocupando alrededor de 50 a 80% de los casos, siendo esta la clasificación utilizada en el estudio por su elevada presencia. Aproximadamente de 70 a 80% de los carcinomas ductales son positivos a los receptores de estrógenos y entre 15 a 30% lo son para HER2-neu (Sánchez *et al.*, 2015).

Tabla 1. Clasificación histológica del cáncer de mama. Se destacan dos tipos principales, el carcinoma ductal y lobulillar, estos a su vez se clasifican como cáncer pre-invasivo y cáncer invasivo. La primer clasificación comprende a los carcinomas *in situ* y la segunda los infiltrantes.

<i>Tipos Histológicos</i>	<i>Ductal</i>	<i>Lobulillar</i>
Cáncer pre-invasivo 25% Células limitadas a membrana basal.	Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS) 80% Puede extenderse a través de conductos y distorsionar su arquitectura. 1% progresa a cáncer invasivo por año. Generalmente es unilateral.	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (CLIS) 20% No distorsiona la arquitectura del conducto. Misma anomalía que CLI- pérdida de E-cadherina.
Cáncer invasivo 75% Extensión fuera de la membrana basal.	Carcinoma ductal infiltrante (CDI) 79% Causa respuesta fibrosa produciendo una masa palpable al momento de examinar la mama. Metástasis hacia nódulos linfáticos y sangre.	Carcinoma ductal invasivo (CLI) 10% CLI precursor. Mínima respuesta fibrosa, se presenta frecuentemente poco como una masa palpable.
Ettinger, 2000; Sims <i>et al.</i> , 2007; Hergueta <i>et al.</i> , 2008; Kumar <i>et al.</i> , 2008.		

1.5 Clasificación molecular del cáncer de mama

La inmunohistoquímica se utiliza con fines pronósticos en tumores de mama. Se utilizan con mayor frecuencia los marcadores receptores hormonales: de estrógenos, progesterona y el factor de crecimiento epidérmico (HER2-neu). El perfil molecular consiste en cinco subtipos principales de tumores: basal, HER2/RE-, luminal A, luminal B y normal.



Perou CM, *et al.* (2000).

Figura 1. Clasificación molecular de cáncer de mama. Se clasifica principalmente en cuatro subtipos de acuerdo a la expresión del receptor de estrógeno, progesterona y el factor de crecimiento epidérmico humano como CaMa triple negativo, HER2+, luminal B y luminal A. El nivel de diferenciación celular se encuentra altamente relacionado con el grado histológico del cáncer, así como el pronóstico y la respuesta a terapia.

1.6 Genética aplicada al cáncer de mama

La atención hacia pacientes con CaMa requiere actualmente el estudio crítico de mecanismos relacionados a su origen y rápida identificación. En este rubro, la genética

ofrece excelentes herramientas en la clínica, ayudando a la vinculación del conocimiento etiológico con el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del paciente.

El CaMa se considera una enfermedad multifactorial y esporádica hasta en un 70% de los casos (Ettinger, 2000), pero un 20% de los casos se presenta con un trasfondo familiar (Hergueta *et al.*, 2008). Los genes constituyen el acervo de nuestro fenotipo, al mismo tiempo que albergan detonadores de enfermedades humanas. Los genes implicados en la susceptibilidad a padecer CaMa se han clasificado en tres grupos: alta, mediana y baja susceptibilidad (Figura 2).

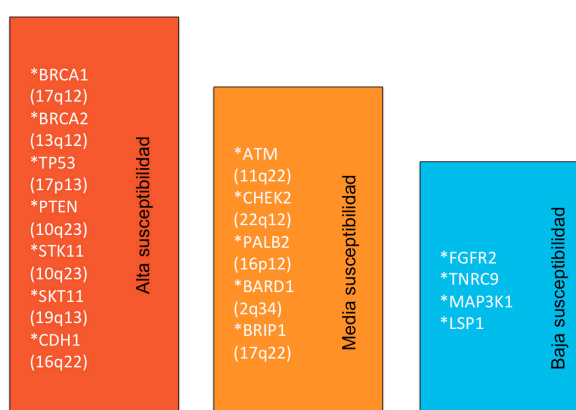


Figura 2. Paneles multigénicos de estudio del cáncer de mama. Los genes de alta susceptibilidad son aquellos cuya pérdida de función se relaciona con síndromes de cáncer hereditario, como BRCA1/BRCA2, TP53; en tanto que el grupo de moderada y baja susceptibilidad se conforma por genes cuyas alteraciones en la secuencia se han relacionado con un mayor riesgo de padecer CaMa en distintas poblaciones y con variabilidad importante, por lo que su contribución se vincula con CaMa familiar o esporádico.

Los datos clínicos que sustentan la sospecha de un síndrome de cáncer hereditario conllevan a la realización de estudios moleculares que permitan confirmar la presencia de una mutación patogénica en un gen considerado de alta susceptibilidad. Actualmente existen paneles de estudio multigenes que permiten la realización simultánea de pruebas para los principales genes de riesgo para padecer CaMa. Asimismo, ha de contarse con directrices para seleccionar a las pacientes candidatas a la realización de este estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios para considerar candidato a un paciente a una prueba molecular de los genes relacionados con cáncer de mama hereditario.

Paciente con historia personal de cáncer de mama u ovario, o ambos, más la presencia de uno de los siguientes criterios

1. Cáncer de mama u ovario, o ambos, o cáncer de páncreas en al menos dos familiares de primero o de segundo grado.
2. Cáncer de mama con primarios múltiples o cáncer de mama bilateral; el primero diagnosticado antes de los 40 años de edad en población latinoamericana.
3. Paciente premenopáusica con diagnóstico de cáncer de mama triple negativo antes de los 45 años de edad.
4. Cáncer de mama en un familiar varón.
5. Antecedente de etnicidad con alta frecuencia de mutaciones en los genes BRCA.

1.7 Avances en el diagnóstico molecular y la investigación del cáncer de mama

Los tumores esporádicos que representan la mayor parte de todos los cánceres humanos, surgen de la adquisición de alteraciones somáticas, genéticas y epigenéticas que producen cambios en la secuencia del gen, la estructura, el número de copias y la expresión. En la última década, la disponibilidad del mapa completo basado en la secuencia del genoma humano, junto con los significativos avances tecnológicos que han revolucionado la búsqueda de alteraciones somáticas en los genomas tumorales, ayudando a identificar genes candidatos del cáncer.

Se prevé que en los próximos años se identifiquen sistemáticamente las formas mas comunes de cáncer en humanos respecto a cambios somáticos subyacentes en el número de copias del gen, la secuencia y la expresión. Estas alteraciones somáticas apuntarán a los genes del cáncer candidatos que requieren mayor validación para determinar si tienen un papel causal en la génesis tumoral, impulsando mejoras en el diagnóstico, pronóstico y terapia del CaMa basados en las alteraciones moleculares específicas que conducen a tumores individuales.

En repetidas ocasiones se ha demostrado que enfoques basados en el pronóstico histopatológico, las características clínicas del tumor, los análisis de la expresión de receptores hormonales para terapia endócrina y del receptor HER2, conducen a un exceso de tratamiento de las pacientes y aproximadamente 85% de ellas no se benefician de la

quimioterapia citotóxica (neo) adyuvante relacionada con la supervivencia específica del CaMa a 10 años. Cerca de 20% de las pacientes mueren de CaMa dentro de los ocho años, a pesar de que actualmente existen quimioterapias citotóxicas adyuvantes disponibles (Sims *et al.*, 2007). Por lo tanto, los criterios de pronóstico y de predicción clásicos no son lo suficientemente específicos para la toma de decisiones con respecto a la quimioterapia adyuvante.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

En los últimos 10 años los avances tecnológicos han sugerido un nuevo enfoque conceptual de la biología molecular del CaMa, lo cual proporciona una nueva esperanza y mejor comprensión de la biología de la enfermedad que permita brindar abordajes terapéuticos más precisos. Este enfoque inició con estudios en microarreglos, posteriormente con RT-PCR y después con secuenciación de nueva generación (SNG).

En el año 2002, Pollack *et al.* estudiaron transcritos de CNA en CaMa en humanos mediante microarreglos, analizando las alteraciones de 6,691 genes humanos en tumores de mama primarios y líneas celulares cancerígenas. Identificaron que en promedio, un cambio de dos veces en el número de copias de ADN se asocia con un correspondiente cambio de 1,5 veces en los niveles de ARNm, y que en general, al menos el 12% de toda la variación en la expresión génica entre los tumores de mama es directamente atribuible a la variación subyacente en el número de copias de genes.

Wolf *et al.*, en el 2004, mostraron que las CNA de cortas distancias podían ser frecuentemente detectadas con microarreglos CGH, incluyendo deleciones próximas a regiones amplificadas. Afirmaron que el uso de aCGH es muy valioso debido a que hace posible la fácil integración de datos del número de copias y la expresión génica a través del genoma. Concluyeron que los cambios en la dosis génica causados por pérdidas y ganancias podrían tener una influencia significativa en los amplios niveles de expresión génicos del cáncer.

Igualmente, en estudios de mutagénesis en el CaMa Chao y cols., en el 2012, identificaron cambios en el número de copias de pequeñas regiones del ADN utilizando microarreglos de CGH en el estudio de tumores primarios de 94 pacientes y dos líneas celulares de cáncer. Los resultados mostraron que los genomas de los tumores primarios con cáncer frecuentemente contenían pérdidas y ganancias de material genético (micro-aberraciones), las cuales en algunas ocasiones alteraban la expresión de genes involucrados. En conclusión, dichos autores mencionan que el utilizar una prueba de alta densidad (gene-centric aCGH) permite evidenciar aberraciones genómicas de pequeña escala, como las

micro-aberraciones, que pueden contribuir a la inactivación de genes, lo cual puede permitir la formación del tumor por mecanismos que usualmente no pueden detectarse utilizando análisis convencionales del número de copias en el ADN (Apostolou y Fostira, 2013).

2.1 Antecedentes directos

En nuestro grupo de trabajo Mendoza-Pérez y Cols. (2016), analizaron las alteraciones genómicas focales y amplias en pacientes con CaMa ductal infiltrante mediante microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH). Los resultados mostraron que las CNA predominantes fueron alteraciones amplias (Figura 3).

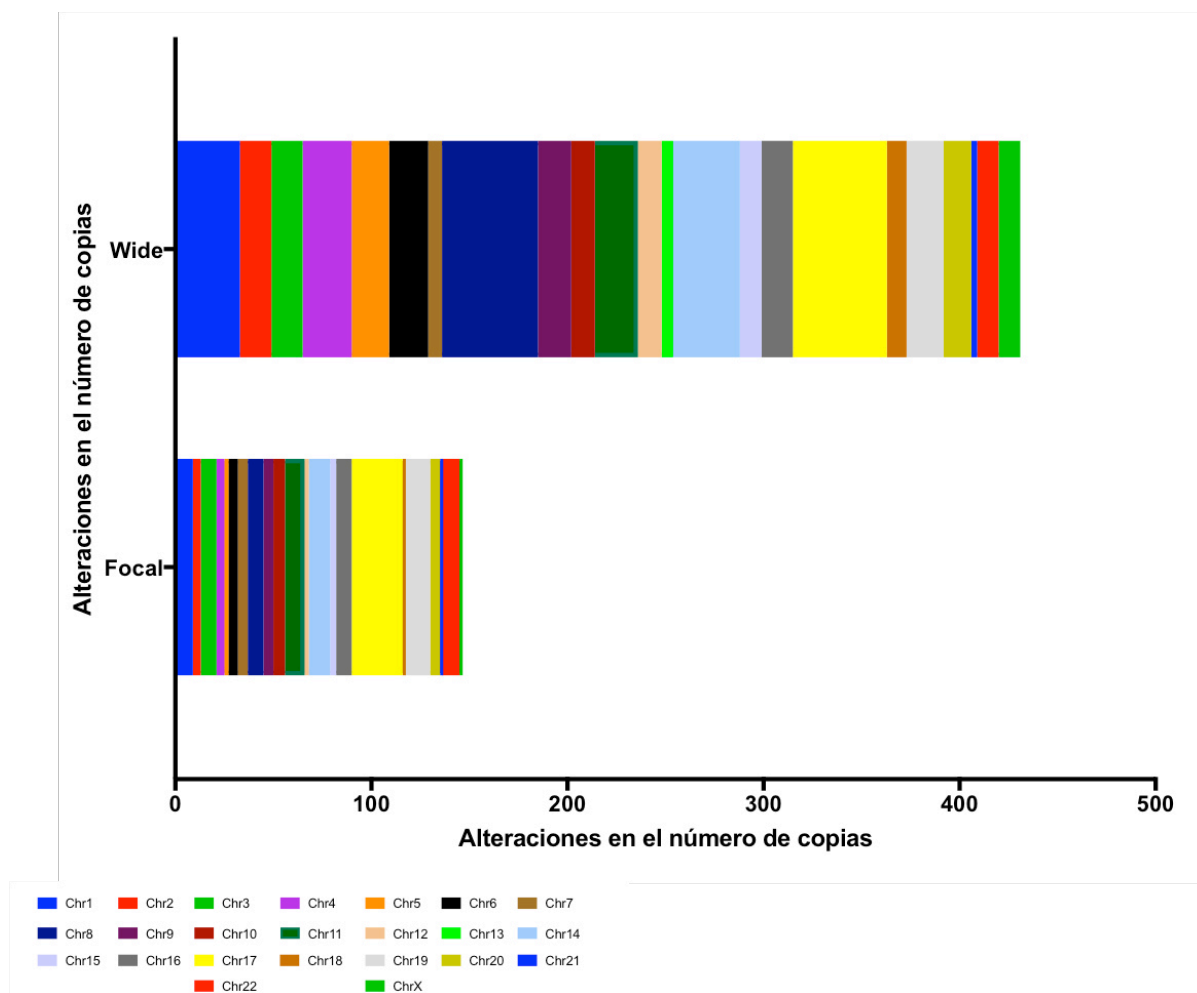


Figura 3. Alteraciones en el número de copias identificadas mediante microarreglos de CGH.

Estas correspondieron en su mayoría a ganancias de material genético (Figura 4).

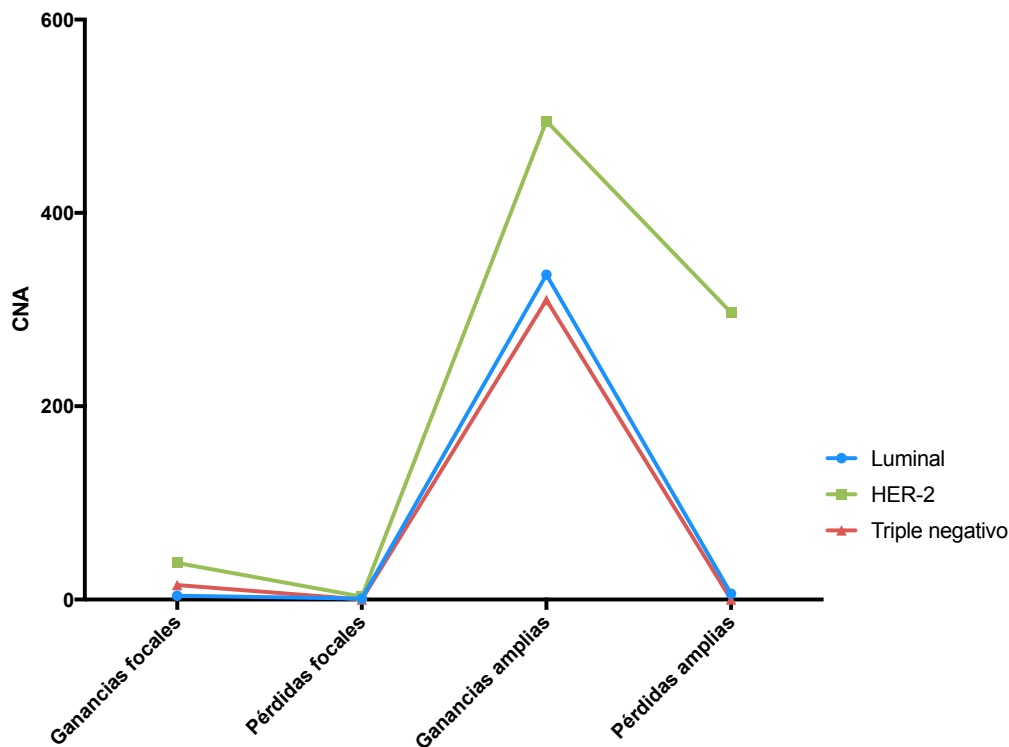


Figura 4. Frecuencia de las alteraciones en el número de copias (CNA) y genes alterados en los subtipos luminal, triple negativo y HER-2.

Las vías de señalización afectadas fueron las de la angiogénesis, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), apoptosis, MAP Cinasas (MAPK) y la vía de p53 (Figura 5). En este estudio se detectaron 25 genes afectados en su mayoría para el subtipo luminal, 14 genes para HER-2 y 11 para basal o triple negativo.

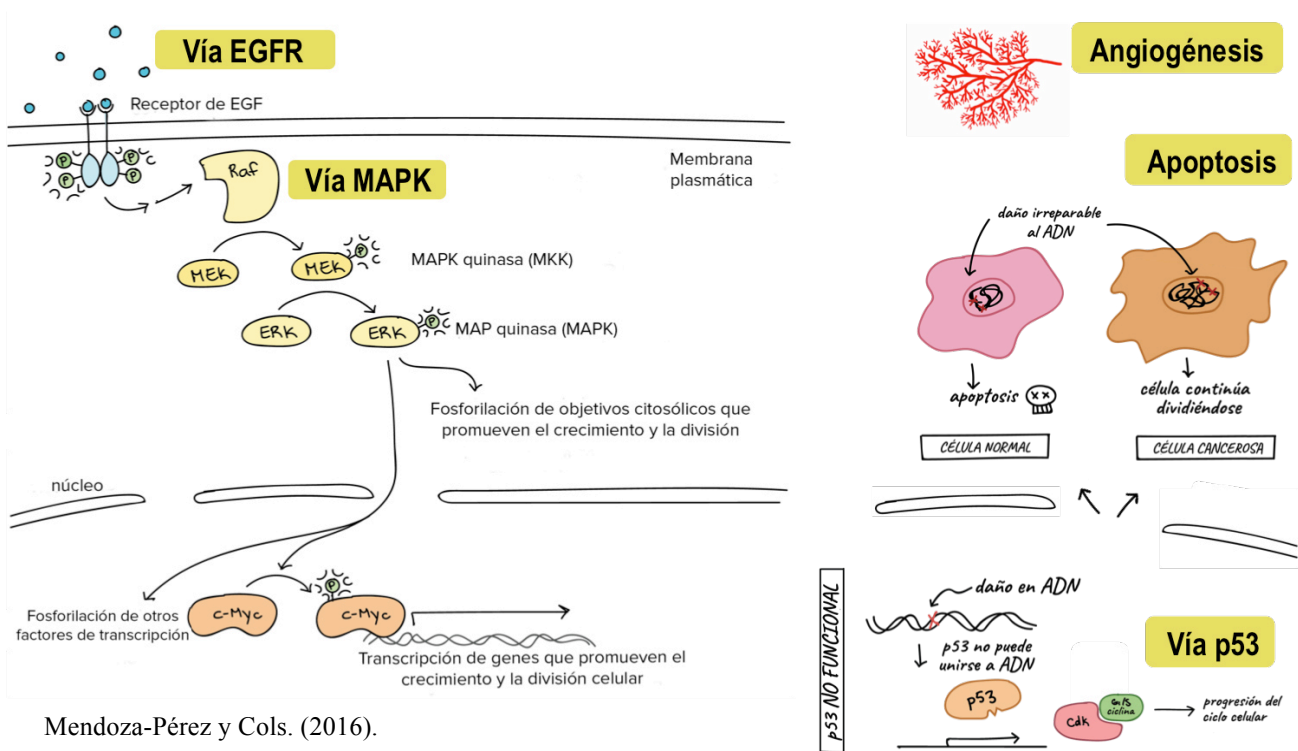


Figura 5. Vías de señalización alteradas en los subtipos luminal, triple negativo y HER-2.

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

El CaMa representa un desafío para la salud pública mundial y nacional debido al incremento incesante en el número de casos. En México es un problema apremiante, ya que además de presentar una alta incidencia, el CaMa se presenta alrededor de 10 años antes que en otros países; por lo tanto, es necesario el estudio detallado de los perfiles de expresión genómicos de tumores mamarios y sus alteraciones en el número de copias, para identificar genes que puedan ser utilizados como biomarcadores. Así, un estudio más a fondo de la patogénesis tumoral permitirá brindar abordajes diagnósticos y predictivos más precisos.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

Las CNA presentes en la arquitectura genómica del CaMa de pacientes mexicanas generan cambios en el transcriptoma que contribuyen a la biología tumoral.

CAPÍTULO V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar el transcriptoma de biopsias de carcinomas ductales infiltrantes de pacientes del Noreste del país para correlacionarlo con sus CNA focales y amplias previamente evaluadas.

5.2 Objetivos específicos

1. Crear una base de datos clínico-patológicos para la estratificación de pacientes de acuerdo al subtipo molecular de cáncer.
2. Caracterizar los perfiles de expresión génica derivados de CNA.
3. Realizar un análisis integral de los datos clínico-patológicos y genómicos obtenidos a partir de la caracterización molecular.
4. Validar por qPCR al menos uno de los genes diferencialmente expresados en microarreglos con potencial para usarse como biomarcador en CaMa.

CAPÍTULO VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 Tipo de estudio

- Observacional, descriptivo y prospectivo.

Es un estudio observacional, debido a que posee carácter estadístico, genera una conclusión al comparar el grupo de estudio con un control y no se modifican las variables en el proceso por el investigador. En este trabajo, el grupo de estudio son pacientes con CaMa ductal infiltrante. Específicamente hablando, es el estudio de perfiles de expresión de tumores y de muestras de tejido sano adyacente de las mismas, de pacientes participantes en el estudio previo. En un estudio descriptivo, como su nombre lo indica se describen únicamente los resultados obtenidos sin que haya modificación de los mismos. Finalmente, se reconoce como prospectivo por el alcance que pueden llegar a tener los resultados obtenidos en el estudio a partir del presente y que puedan tener a futuro un impacto en la investigación.

6.2 Universo de estudio

Pacientes femeninas mexicanas con detección y confirmación del tumor en etapa primaria de CaMa que fueran candidatas a cirugía/intervención quirúrgica del Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda” SSNL y el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” UANL.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenómica y Microarreglos, del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo la convocatoria FONSEC 2014 con el número de registro No. 233212. Fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” UANL con el No. de registro BI15-002 y por la Dirección de Enseñanza, Investigación en Salud y Calidad de Secretaría de Salud de Nuevo León con el No. de registro DEISC-19 01 16 23.

6.3 Muestras de estudio

6.3.1 Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra fue censal, es decir, “n” número de muestras por unidad de tiempo. Para este caso en particular, fueron todas aquellas muestras recolectadas en el periodo de 1 año, comprendido entre Octubre 2015 a Octubre 2016. Usualmente, es permisible este tipo de muestreo cuando el tipo de muestras es escaso y/o sus características son poco usuales y no se presentan o no se pueden obtener de una manera asequible.

6.3.2 Descripción de las muestras

Fragmentos de 30 mg aproximadamente, correspondientes a tejido tumoral y tejido sano adyacente frescos. En total, se recolectaron 24 muestras de las cuales 12 procedieron de tejido sano y las otras 12 de tejido tumoral, las cuales fueron obtenidas por el médico tratante y correspondientes a la clasificación histológica de carcinoma ductal infiltrante determinado por el patólogo en turno.

Criterios de inclusión

- Mujeres de 18 años de edad o más.
- Nacionalidad mexicana.
- Candidata para biopsia de tumor mamario maligno (carcinoma ductal infiltrante).
- Contar con los datos clínicos registrados al momento de la cirugía.
- Firma de consentimiento informado.

Criterios de no inclusión

- Tratamiento previo (quimioterapia, radioterapia, entre otros).
- Menores de 18 años.
- Presencia de otras neoplasias (exclusión).

Criterios de eliminación

Muestras carentes de información previamente mencionada, en mal estado para su estudio o si el paciente optó por retirar sus muestras del estudio.

6.4 Aspectos éticos

Este estudio comprende una investigación de riesgo mínimo, la participación de todos los individuos en el presente proyecto fue aprobada mediante un consentimiento informado por escrito firmado previo a la cirugía. Se realizó una explicación verbal con lenguaje coloquial a cada uno de los pacientes, de modo que fuera sencillo comprender todos los lineamientos dentro del estudio, su propósito, procedimientos, beneficios, riesgos conocidos, molestias, precauciones del estudio incluyendo la duración y la naturaleza de su participación.

Los servicios de oncología quirúrgica y anatomía patológica fueron los responsables de la obtención de muestras de tumor para los estudios de rutina correspondientes y para los de interés del presente proyecto. Para poder cumplir con el aspecto de confidencialidad del paciente, a todas las muestras se les asignó un código cumpliendo con este punto además de facilitar su manejo interno. Dentro de los aspectos benéficos del proyecto sería identificar algún(os) gen(es) candidato(s) como biomarcador(es) diagnóstico(s) o blanco(s) terapéutico(s) de CaMa que sean clave en la(s) fase(s) de progresión de la enfermedad. De manera individual se proporcionaron los datos del estudio molecular de cada uno de los pacientes a los cuales se les realizó los perfiles de CNA y de expresión génica. Se realizó una sesión informativa con el personal clínico y de investigación en dicho proyecto acerca de los resultados encontrados. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas de conducta ética y al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, con la declaración de Helsinki y sus enmiendas, así como los códigos y normas vigentes para las buenas prácticas de la investigación clínica. El consentimiento informado se encuentra descrito detalladamente en el Anexo I.

CAPÍTULO VII. MATERIAL Y EQUIPOS

7.1 Material biológico

24 muestras de tejido fresco de mama, doce correspondientes a tejido sano adyacente y doce de tejido tumoral, de 30 mg aproximadamente de cada una.

7.2 Materiales y reactivos

7.2.1 Materiales consumibles

- Micropipeta de 100 a 1000 μ l, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 20 a 200 μ l, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 10 a 100 μ l, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 2 a 20 μ l, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 0.5 a 0.10 μ l, marca Eppendorf Research Plus.
- Micropipeta de 0.1 a 2.5 μ l, marca Eppendorf Research Plus.
- Tubos de 2.0 ml, marca Scientific Specialties, Inc.
- Tubos de 1.5 ml, marca Scientific Specialties, Inc.
- Tubos de 0.6 ml, marca Scientific Specialties, Inc.
- Tubos de 0.2 ml, marca Scientific Specialties, Inc.
- Puntillas desechables para micropipeta de 1000 μ l, marca SSI.
- Puntillas desechables para micropipeta de 200 μ l, marca SSI.
- Puntillas desechables para micropipeta de 10 μ l, marca SSI.
- Puntillas desechables con filtro para micropipeta de 1000 μ l, marca SSI.
- Puntillas desechables con filtro para micropipeta de 200 μ l, SSI.
- Puntillas desechables con filtro para micropipeta de 10 μ l, marca SSI.
- Guantes de nitrilo Supreno SE, marca Microflex.
- Probeta de 1000ml, 250 ml, 50 ml y 25 ml, marca Nalgene y Kimax.
- Frascos de vidrio de 500 ml, 250 ml y 100 ml, marca Pyrex USA.
- Homogeneizador de tejidos de vidrio 1 ml, marca Wheaton USA.

- Toallas desechables de papel Kimwhipes Kimtech, marca Kimberly Clark.
- Toallas interdobladadas de papel hoja doble, marca Kimberly Clark.
- EXTRAN[®] MA Neutro, marca Mereco S.A. de C.V.
- Pinzas y tijeras quirúrgicas, marca Sharpvet.
- Enfriador de 96 pozos, marca Eppendorf.
- Parafilm, marca Bemis.
- Barra magnética
- Gradillas multi-tubos
- Temporizador digital

7.2.2 Reactivos

- Ácido bórico, marca BioBasic Canada Inc.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dihidratado, marca Sigma Aldrich.
- Agarosa Ultra Pura 100g, marca Invitrogen de Life Technologies.
- Agua grado biología molecular, marca Corning.
- Alcohol etílico 96°, marca CTR Scientific.
- Alcohol etílico grado molecular 500 ml, marca Sigma Aldrich (Número de Cat. E7023-500ML).
- Buffer de carga, marca Sigma Aldrich.
- Buffer salino de fosfatos (PBS) 10X pH 7.4, 1L, marca Ambion.
- Buffer TBE (Anexo I).
- dNTP Mix 10 mM (100µl), marca Invitrogen de Thermo Fischer Scientific.
- Kit de extracción y columnas de purificación de ARN: RNeasy[®] mini kit (50), marca QIAGEN.
- Marcador de peso molecular 100pb de 50 µg (1µg/µl), marca Invitrogen de Thermo Fischer Scientific.
- Random Primers de 300 µg (3µg/µl), marca Invitrogen.
- RNaseOUT[®] Inhibidor de ribonucleasa recombinante de 5,000U, marca Invitrogen de Life Technologies.
- SDS 500g, marca BioBasic Canada Inc.

- Sigma 7-9[®], marca Sigma Aldrich.
- Super Script[®] III 10,000U (200U/μl), marca Invitrogen de Thermo Fischer Scientific.
- SYBR Safe[®] 10,000X de 400μl, marca Invitrogen de Thermo Fischer Scientific.

7.2.3 Materiales y reactivos para microarreglos

- Microarreglos SurePrint G3 Human Gene Exp v3, 8x60K One color, marca Agilent Technologies.
- RNA Spike In Kit, marca Agilent Technologies (Número de Cat. 5188-5279).
- Low Input QuickAmp Labeling Kit 24 reacciones, marca Agilent Technologies (Número de Cat. 5190-2331).
- Cyanine 3 CTP Dye Pack, marca Agilent Technologies (Número de Cat. 5190-2329).
- Gene Expression Hybridization Kit, marca Agilent Technologies (Número de Cat. 5788-5242).
- Agilent Gene Expression, Wash Buffer Kit.
- Triton X-102, 1.35 ml, marca Agilent Technologies (Número de Cat. 5188-5903).
- Wash Buffer 1, 4L marca Agilent Technologies (Número de Cat. 5188-5325).
- Wash Buffer 2, 4L marca Agilent Technologies (Número de Cat. 5188-5326).
- Cámara de hibridación G2534A, marca Agilent Technologies.
- Holder Slides G4900- 60035.
- Gaskets Slides 8 arreglos por laminilla, marca Agilent Technologies.

7.2.4 Materiales y reactivos para qPCR

- Tubos ópticos para qPCR con tapa MicroAmp[®] Fast Reaction Tube, marca Applied Biosystems.
- Placas de 96 pozos, marca Applied Biosystems.
- SYBR[®] Green ET[™] qPCR SuperMix for ABI PRISM, Invitrogen.

7.3 Equipos

7.3.1 Equipos de uso general

- Balanza analítica, marca AND Company Limited.
- Cámara de electroforesis Mini-Sub cell GT, Bio-Rad.
- Campana para PCR, marca UVP.
- Centrífuga refrigerada PrismR, marca Labnet International Inc.
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000, marca Thermo Scientific.
- Fotodocumentador ChemiDoc XLR+, marca Bio-Rad.
- Fuente de poder PowerPac Basic, marca Bio-Rad.
- Horno de microondas, marca LG.
- Mini-Centrífuga centrifuge 5415 C, marca Eppendorf.
- Mini-Spin, marca Labnet.
- Potenciómetro, marca Orion 310 Thermo Electron Corporation.
- Refrigerador -20°C/4°C Thermo Scientific.
- Ultra congelador vertical REVCO UXF -80°C, marca Thermo Scientific.
- Vortex, marca Termolyne.

7.3.2 Equipos para microarreglos.

- Horno de hibridación, marca Sheldon Manufacturing Inc.
- Incubadora HERATHERM, marca Thermo Scientific.
- Plancha de calentamiento, marca Termolyne.
- Plataforma de microarreglos SureScan, Agilent Technologies.
- Termociclador SureCycler 8800, marca Agilent Technologies.

7.3.3 Equipos para qPCR

- Centrífuga de placas C1000, marca Labnet International Inc.
- Termociclador para qPCR 7500 fast, marca Applied Biosystems.

7.4 Programas bioinformáticos y bases de datos.

- GeneSpring GX v14.1, Agilent Technologies.
- Feature Extraction, Agilent Technologies.
- OMIM
- GeneCards
- UCSC Genome Browser
- STRING
- Reactome

CAPÍTULO VIII. METODOLOGÍA

8.1 Estrategia general

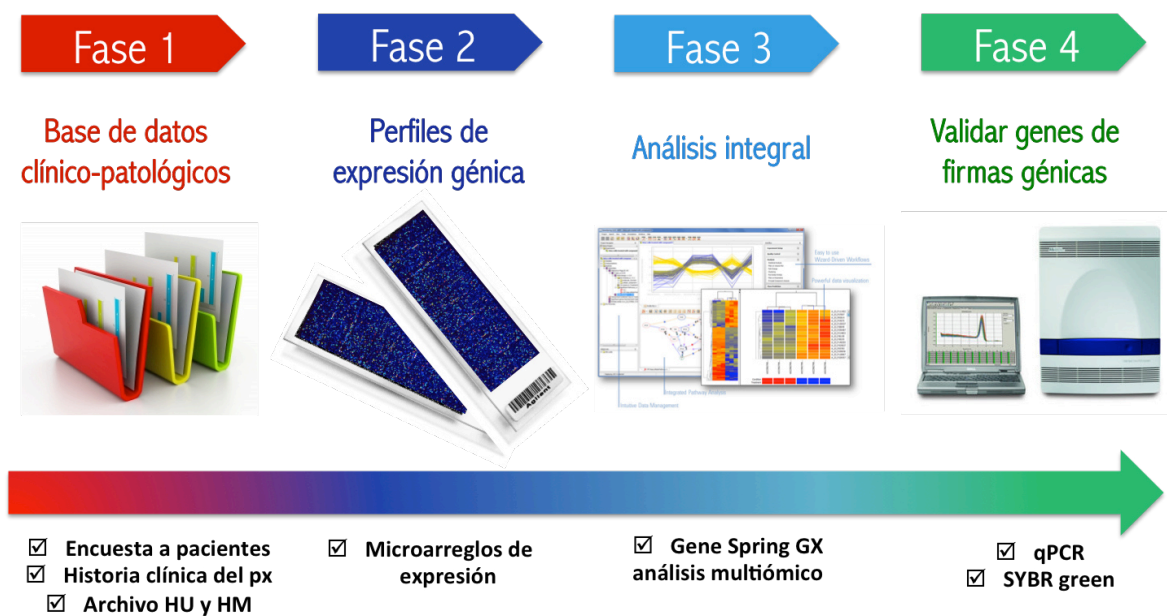


Figura 6. Diagrama de estrategia experimental. Fase 1: recaudar datos clínicos de los pacientes participantes en el estudio mediante encuesta e historia clínica. Fase 2: realizar microarreglos de expresión génica. Fase 3: integrar datos genómicos y transcriptómicos (CNA y expresión génica). Fase 4: validar mediante qPCR al menos un gen diferencialmente expresado en muestras de CaMa.

8.2 Base de datos clínico-patológicos

Se recaudó información de las pacientes correspondiente a datos de somatometría, los cuales se mencionan a continuación: edad, peso, estatura e índice de masa corporal (IMC); datos patológicos del tumor, antecedentes patológicos y no patológicos de la paciente (consumo de alcohol, tabaco o drogas), antecedentes gineco-obstétricos (edad de la menarquia, empleo de métodos anticonceptivos, edad del primer embarazo, número de embarazos, menopausia) y antecedentes familiares para la estratificación de pacientes de acuerdo al subtipo molecular de CaMa.

8.3 Obtención de la muestras

Se reclutaron las muestras asistiendo a la institución correspondiente, el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” UANL y el Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda” SSNL, en donde se les invitó atentamente a las pacientes a participar en el presente estudio, indicándoles detalladamente las características del estudio y su participación. Una vez que fue aceptada su participación en el estudio, firmaron el consentimiento informado.

Con la finalidad de obtener el material biológico para el estudio, se procedió y asistió al Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología para recolectar muestras frescas de tejido sano y tejido tumoral de $\sim 25 \text{ mm}^2$ –brindadas por el Patólogo en turno– las cuales se conservaron en tubos de plástico de 2 ml con 1 ml del agente estabilizador y protector de ARN denominado RNAlater™, QIAGEN. Posteriormente se trasladaron al laboratorio de Citogenómica y Microarreglos del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en la Facultad de Medicina de nuestra Universidad y se identificaron y dieron de alta en la base de datos correspondiente a este proyecto. Se asignó un código alfanumérico irrepetible a cada muestra para su manejo en el laboratorio. Finalmente si no iban a procesarse al instante, las muestras se almacenaban a -80°C en el ultra congelador vertical (REVCO UXF, Thermo Scientific) hasta su utilización.

8.4 Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total de tejido tumoral y sano adyacente mecánicamente utilizando un homogeneizador vidrio-vidrio y 600 μl de buffer de lisis RLT del kit comercial RNeasy Mini Kit, QIAGEN®, siguiendo la metodología del fabricante descrita en el Anexo II, utilizando una centrífuga refrigerada (PrismR, Labnet International, Inc) y una minicentrífuga (5415C, Eppendorf). El ARN total se eluyó en 30 μl de agua libre de nucleasas y fue almacenado a -80°C en el ultra congelador vertical (REVCO UXF, Thermo Scientific) hasta su utilización (Anexo III).

Al finalizar el procedimiento de extracción, se procedió a cuantificar el ARN total mediante espectrofotometría con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Posteriormente, se evaluó

la integridad mediante gel de agarosa (UltraPure, Invitrogen) al 1% en cámara de electroforesis (Mini-Sub cell GT, BioRad) a 90 V (Fuente de poder PowerPac basic, BioRad) por 90 min, en gel teñido previamente con SYBR safe (Invitrogen). Se observó en el fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (BioRad), con el software Image Lab. Nuevamente se almacenaron las muestras a -80°C en el ultra congelador vertical (REVCO UXF, Thermo Scientific) hasta su utilización.

8.5 Microarreglos de expresión

Se utilizaron microarreglos de expresión SurePrint G3 Human Gene Exp v3, 8x60K sondas modelo de un color, Spike-In (Agilent Technologies), el cual proporcionó controles positivos para monitoreo de la amplificación y marcaje en el procesamiento del microarreglo de expresión. Se empleó el kit comercial Low Input Quick Amp Labeling (Agilent Technologies) para la retrotranscripción a ADNc y su retrotranscripción a ARNc efectuando el marcaje de las cadenas de ARNc con el marcador fluorescente Cyanine 3 (Cy3 Rojo) cada muestra y control. Se siguió la metodología del fabricante descrita en el Anexo IV. Una vez que se obtuvo el ADNc, este se purificó, fragmentó e hibridó en el microarreglo de expresión y se incubó en un horno rotatorio (Shel Lab) a 65°C por 17 h.

Transcurrido este tiempo, se realizó el lavado y escaneo del chip en la plataforma SureScan (Agilent Technologies). Se obtuvo la imagen a blanco y negro con el mapa de puntos del microarreglo. Posteriormente se procesó con el software Agilent Feature Extraction para visualizar la imagen a color de los spots del microarreglo y se obtuvo el análisis de control de calidad de cada uno de los campos y los archivos “.txt”, los cuales indicaron el valor numérico de la intensidad de cada sonda.

8.6 Análisis de datos

Los datos se procesaron en el software GeneSpring v14.5 (Agilent Technologies) en donde se realizaron pruebas estadísticas como prueba T-student con corrección de Benjamini-Hochberg y un análisis de significancia de $P \leq 0.05$ y un fold change de 2.0. (cambio de nivel de expresión mayor a 2) para el análisis de significancia biológica. Se identificaron los genes diferencialmente expresados, se seleccionaron algunos de los más representativos

para proceder a la cuantificación de los niveles de expresión del ARN de estos utilizando primers diseñados específicamente.

8.7 Análisis multi-ómico

Se realizó un análisis integral de datos genómicos correspondientes a las CNA identificadas previamente por Mendoza-Pérez y Cols., (2016) y se correlacionó con los datos transcriptómicos de genes diferencialmente expresados ($p < 0.01$) en tumor; todo ello con el programa GeneSpring GX v14.5 con una significancia estadística de $p < 0.01$; para identificar las vías de señalización diferencialmente expresadas.

8.8 Retrotranscripción

A partir de 100ng de ARN total se realizó retrotranscripción a ADNc de cada una de las muestras. Se utilizó la enzima SuperScript III (Invitrogen) siguiendo la metodología del fabricante (Anexo III) a un volumen final de 20 μ l. Se utilizó el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies) para todos los pasos de incubación. Una vez terminado el procedimiento, se procedió a cuantificar mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) el producto y a evaluar la integridad del ADNc por electroforesis mediante un gel de agarosa al 1%, a 90 V por 90 min. El ADNc obtenido se almacenó a -80°C en el Ultra congelador vertical REVCO UXF (Thermo Scientific).

8.9 Validación de un posible biomarcador

Para comprobar la especificidad de los primers (Integrated DNA Technologies), se realizó una PCR punto final de algunas de las muestras utilizando el ADNc del tumor y tejido sano adyacente, así como los primers diseñados.

Los primers fueron diseñados con el programa Oligo 7 a partir de la secuencia del ARN-lnc, el cual se obtuvo de la base de datos LNCipedia.org v4.0 con el siguiente ID del transcrito: lnc-ERP44-3:6 y una localización en (hg19): chr9:102347606-102535894. Los primers se diseñaron para que amplificara un fragmento de 111bp con una T_m de 59 °C. (NR_109802.1) del NCBI. El gen endógeno seleccionado fue GAPDH; los primers

diseñados se localizan en (hg19): chr12:6,643,585-6,647,537 e hibridan en el exón 1 del ARNm de GAPDH de humano de acuerdo con la secuencia de referencia NM_001289746.1 (NCBI) y amplifican un fragmento de 532pb con una Tm de 58 °C.

Se realizó una PCR punto final en gradiente utilizando las condiciones de reactivos recomendada por el fabricante a un volumen final de 25µl. Las características detalladas y estandarización se encuentran descritas en el Anexo V.

8.9.1 PCR tiempo real

Una vez comprobada la amplificación específica de los fragmentos deseados (ARN-*Inc* y GAPDH), se procedió a realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión del ARNm de este ARN-*Inc*. Los primers que se utilizaron para qPCR fueron los mismos con los que se realizó la PCR punto final tanto del gen blanco, como el endógeno. La eficiencia de los primers fue determinada para ambos juegos y la curva estándar se encuentran descritas en el Anexo V.

Se utilizó el equipo 7500 Fast (Applied Biosystems) para efectuar los ensayos de qPCR, las condiciones de reacción se realizaron por triplicado a un volumen final de 20 µl por reacción (gen endógeno GAPDH + muestras de ADNc; gen blanco *Inc-ERP44:3* + muestras de ADNc; con su respectivo control negativo). El umbral (threshold) fue determinado de forma automática por el propio software.

Se utilizó el método de cuantificación relativa o $\Delta\Delta CT$ para determinar el cambio de expresión de un gen blanco en una muestra en relación con el mismo gen en una muestra de referencia. Para comparar niveles de expresión de un gen en tejido sano adyacente y tumoral se asignó el valor de 1 a la expresión de todas las muestras de referencia y posteriormente se determinó la expresión relativa del gen blanco esperando valores < 1, de acuerdo a los resultados de subexpresión observados en tejido tumoral en microarreglos de expresión génica. Se realizó el ensayo de qPCR en 38 muestras de CaMa, se analizaron los resultados e identificaron aquellas muestras que se encontraron diferencialmente expresadas en tejido tumoral vs su expresión en tejido sano adyacente.

CAPÍTULO IX. RESULTADOS

9.1 Base de datos clínico-patológicos

De acuerdo a la información clínica de las pacientes recaudada, se graficaron los datos más representativos como la edad de menarquia y menopausia. La edad de la menarquia resultó ≥ 13 años, mientras que la edad de la menopausia posee un rango entre los 40 -50 años, con una media de 46 años (Figura 7).

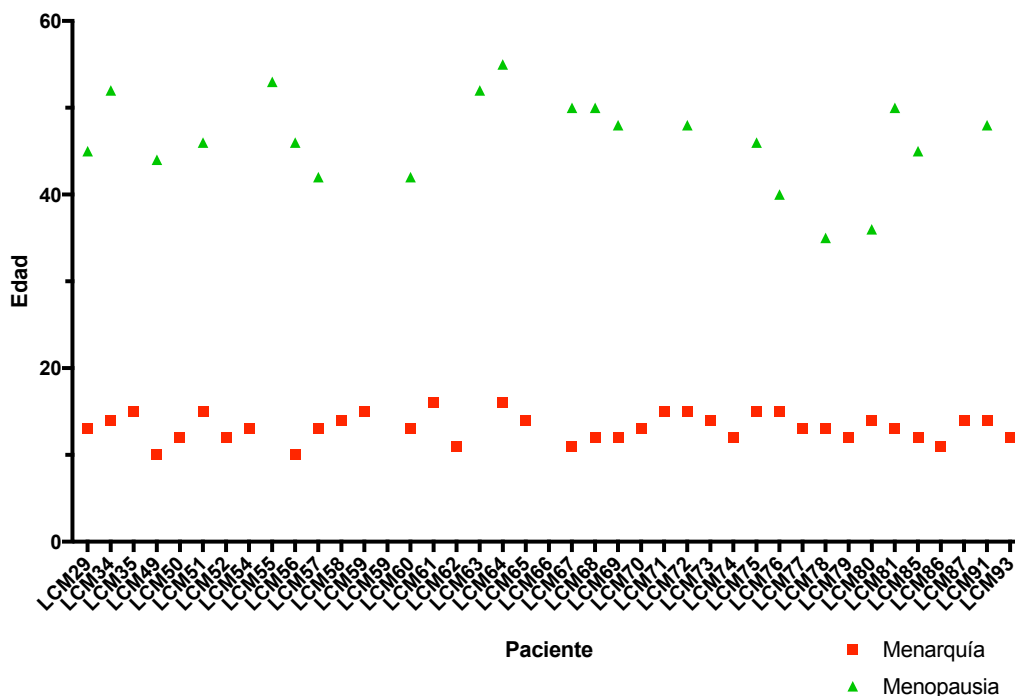


Figura 7. Gráfica de la edad de menarquia y menopausia de las pacientes participantes del estudio. Se aprecia claramente una tendencia en la edad de la menarquia y la edad de la menopausia de algunas pacientes, se registra un periodo de vida fértil de 30 años aproximadamente y no hay indicios aparentemente de una relación entre la edad (debido al amplio rango) y el CaMa.

El IMC fue de ± 29 en 22 pacientes lo cual corresponde a una clasificación de sobrepeso u obesidad. La media de edad del primer embarazo fue de 18 años, mientras que el estadio del tumor más frecuente era de grado II y III en 27 de las pacientes. Los resultados

anteriores son aproximaciones que nos permiten generar una idea del comportamiento y/o relación entre datos de somatometría, factores de riesgo y el CaMa.

9.2 Microarreglo de CGH

Previo a realizar el análisis de expresión génica en muestras de CaMa, se efectuó el cuestionamiento de si efectivamente el tejido sano adyacente podría utilizarse como un control dentro de este estudio. Por ello se procedió a realizar un ensayo de microarreglo de CGH en el cual se identificaron CNA en tejido tumoral y en tejido sano adyacente, seleccionando las muestras de manera estratégica de acuerdo al elevado número de CNA identificadas en tejido tumoral de una de las pacientes (LCM61). Lo anterior sugería una elevada estabilidad genómica con pérdidas y/o ganancias de ADN también en tejido sano adyacente y se procedió a efectuar el ensayo de aCGH.

Se identificaron 4,155 CNA pertenecientes a tejido tumoral y 493 en tejido sano adyacente; compartiendo 175 CNA entre ambos tejidos, lo cual nos permitió fundamentar que efectivamente el tejido sano adyacente podría utilizarse como un control en este estudio, debido a la escasa cantidad de CNA compartidas (Figura 8). Normalmente, las muestras sin tumor no presentan tantos cambios en el ADN.

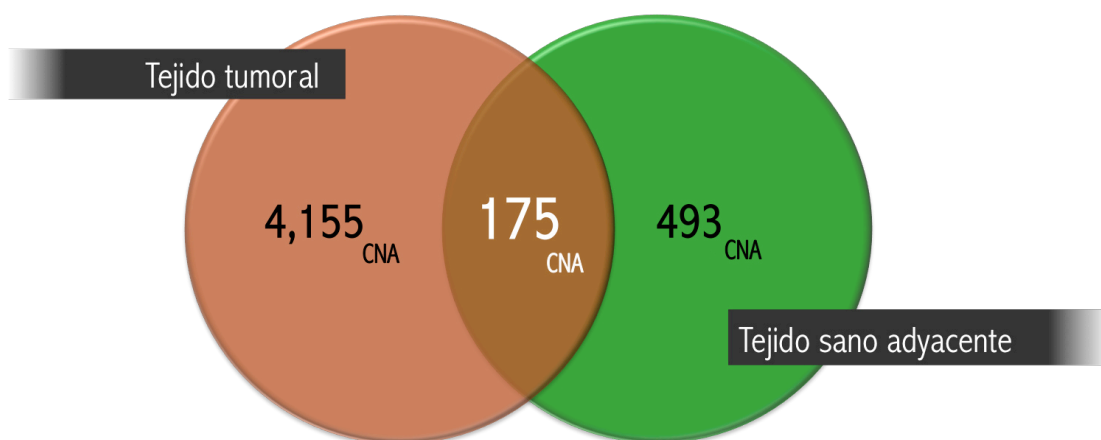


Figura 8. Diagrama de Venn del número de CNA identificadas en tejido tumoral vs tejido sano adyacente y el número de alteraciones que comparten ambos.

9.3 Selección de las muestras de ARN

Se seleccionaron 24 muestras correspondientes a tejido sano y tumoral del mismo paciente, para analizar la expresión génica. Se cuantificaron las muestras mediante espectrofotometría y se realizó un corrimiento electroforético de estas para observar la integridad del ARN. A continuación puede apreciarse en la Figura 9 una imagen representativa correspondiente al proceso de selección de muestras de acuerdo a la integridad del material genético.

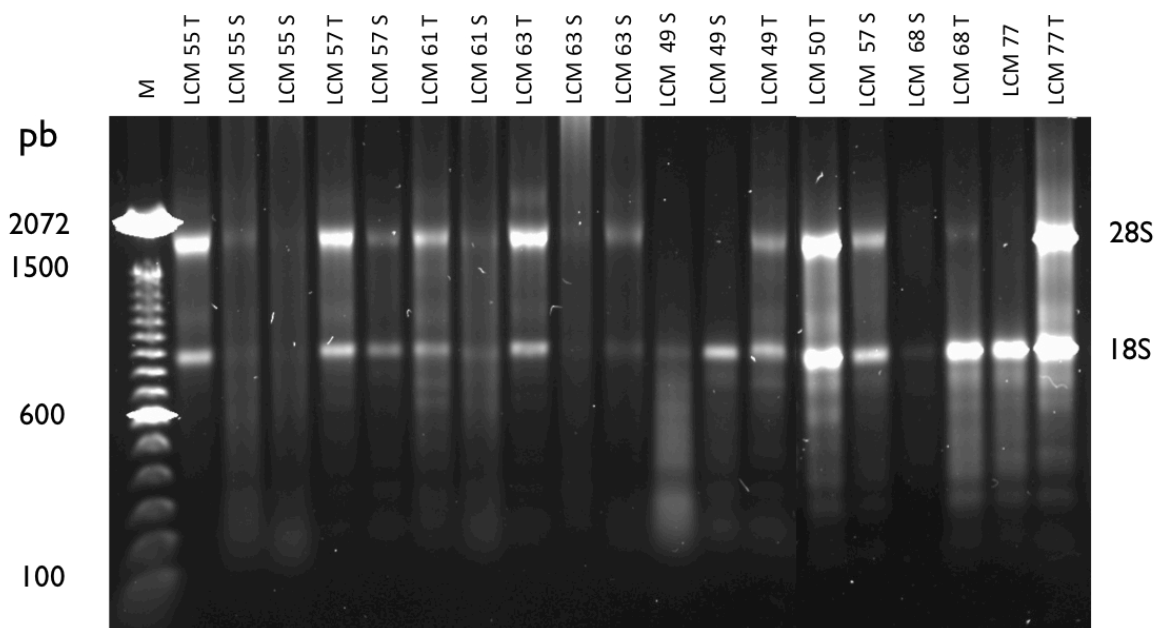


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR safe. ARN total de tejido sano adyacente y tumoral. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder, Invitrogen Thermo Scientific, los 19 carriles siguientes se registran de acuerdo al número de identificación interno del laboratorio, donde corresponde S: tejido sano y T: tejido tumoral. Se señalan en la derecha las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y 18S correspondientes a ARN. En cada carril se cargaron 500ng y se corrió a 90 V por 60 min. Imagen representativa de los ensayos de electroforesis realizados.

A partir de la imagen anterior se seleccionaron las muestras: LCM55T, LCM57T, LCM57S, LCM61T, LCM61S, LCM63T, LCM63S, LCM49T, LCM50T y LCM77T, debido a que pueden apreciarse las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal, un indicador de la integridad de las muestras. De este modo, evitamos seleccionar muestras de ARN degradadas las cuales son inadecuadas para su uso en los microarreglos de expresión. Este ensayo fue realizado con todas las muestras obtenidas hasta completar los pares correspondientes a tejido sano y tumoral del mismo paciente.

9.4 Microarreglo de expresión

Una vez seleccionadas las muestras, se procedió a comenzar con el procesamiento de microarreglos. El ARN se retrotranscribió a ADNc y posteriormente se sintetizó a ARNc, se realizó el marcaje con el fluoróforo cianina-3 (Cy3), se purificó mediante columnas y se cuantificó. En este último se cuenta con un control de calidad el cual corresponde a calcular el rendimiento y actividad específica del marcaje de las muestras problema y los controles. Las fórmulas se describen a continuación junto con los resultados obtenidos de los cálculos de las 24 muestras (Figura 10).

Rendimiento

$$\frac{\text{(Concentración de ARN)} \times 30 \mu\text{l (volumen de elución)}}{1000} = \mu\text{g de ARNc}$$

Actividad específica

$$\frac{\text{Concentración de Cy3}}{\text{Concentración de ARNc}} \times 1000 = \text{pmol Cy3 por } \mu\text{g de ARNc}$$

<i>Muestras de tejido sano</i>		
Muestra	Rendimiento	Actividad específica
LCM34	1.554	9.653
LCM49	1.497	16.032
LCM51	2.226	17.520
LCM55	2.883	16.649
LCM57	2.337	19.255
LCM61	2.310	20.779
LCM64	2.271	9.247
LCM65	2.973	11.100
LCM67	2.103	18.545
LCM76	1.491	18.109
LCM77	1.368	19.737
LCM78	1.881	14.354
Valor esperado	≥ 0.825 μg	Cy3: ≥ 6

<i>Muestras de tejido tumoral</i>		
Muestra	Rendimiento	Actividad específica
LCM34	2.667	13.498
LCM49	2.238	16.086
LCM51	1.752	10.274
LCM55	3.873	17.816
LCM57	2.829	15.907
LCM61	2.691	16.722
LCM64	2.922	11.294
LCM65	2.838	15.856
LCM67	2.802	14.989
LCM76	2.889	16.615
LCM77	1.713	17.513
LCM78	1.828	11.364
Valor esperado	≥ 0.825 μg	Cy3: ≥ 6

Figura 10. Cálculo del rendimiento y actividad específica de las 24 muestras, se registran de acuerdo al número de identificación interno del laboratorio, donde corresponde S: tejido sano y T: tejido tumoral. El valor óptimo para determinar un buen rendimiento es > 0.825 y >6 para la actividad específica.

Se realizó el escaneo del microarreglo con el equipo SureScan (Agilent Technologies) y se le asignó el color correspondiente a la intensidad de fluorescencia emitida por cada sonda (Figura 11).

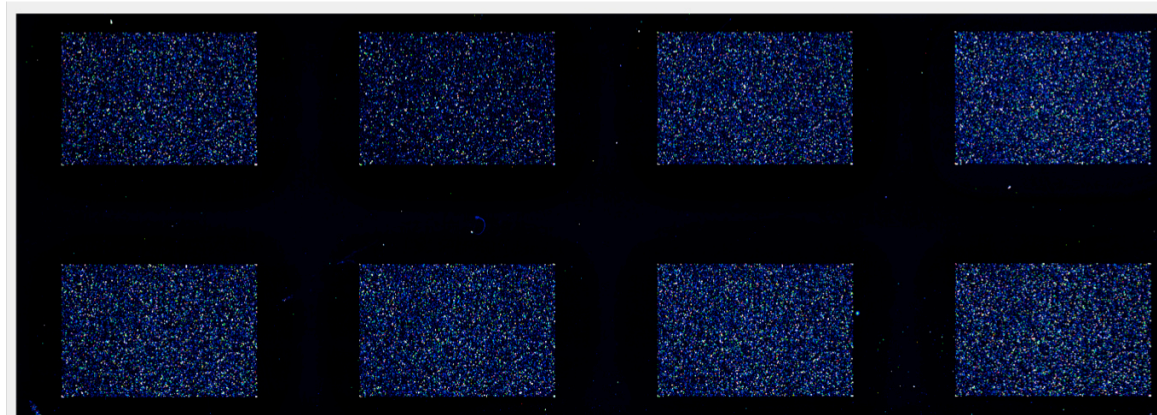


Figura 11. Imagen representativa al momento de realizar el escaneo del microarreglo de expresión SurePrint G3 Human Gene Exp v3, 8x60K Un color, Agilent Technologies. Cada punto de color corresponde a una sonda el cual se le asigna un color falso de acuerdo a la intensidad de fluorescencia emitida por cada sonda del microarreglo. La parte superior corresponde a muestras de tejido sano adyacente y la parte inferior a tejido tumoral.

9.5 Análisis de datos

Posterior al escaneo de los microarreglos, se procedió a analizar los datos con ayuda del programa GeneSpring GX v14.8 (Agilent Technologies). Realizando una prueba T-student con la corrección de Benjamini-Hochberg con un análisis de significancia de $p < 0.01$ y un fold change de ≥ 2.0 ; para poder establecer el valor de significancia (P), se procedió a realizar una comparación de datos $p < 0.01$ y $p < 0.05$, donde efectivamente se encontraban entidades con un valor estadísticamente significativo en ambas (Figura 12).

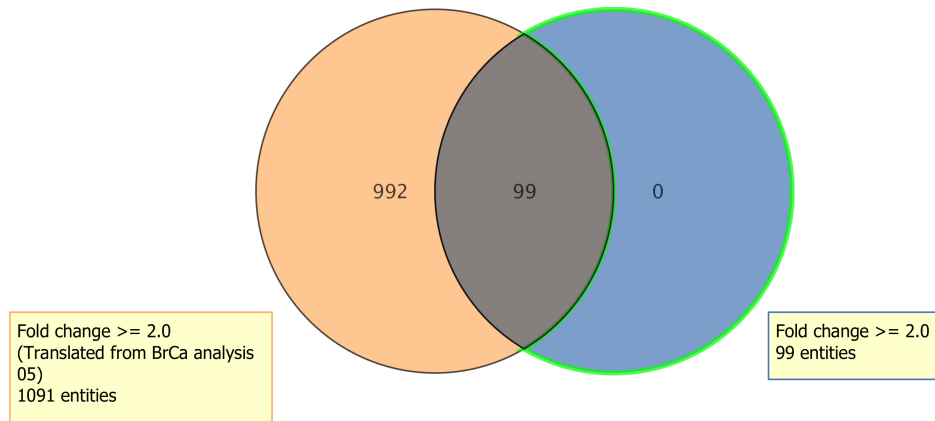


Figura 12. Diagrama de Venn del análisis de significancia comparativo entre $p < 0.05$ con 1091 entidades (tono anaranjado) y $p < 0.01$ con 99 entidades (tono azul) con un fold change ≥ 2 en ambos.

Debido al análisis anterior, se optó por estudiar las entidades correspondientes al análisis de $p < 0.01$ para tener una mayor astringencia y valor estadístico. Se identificaron 99 entidades diferencialmente expresadas, donde la mayoría se encontraban subexpresadas (Figura 13).

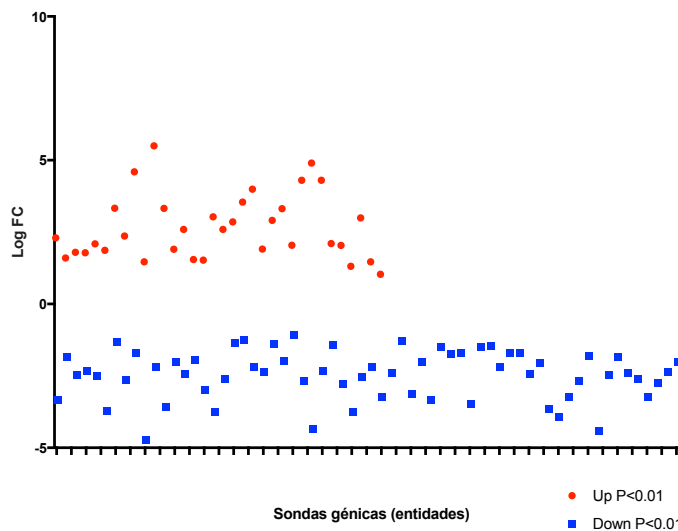


Figura 13. Relación de intensidad de expresión génica (Log) en cada una de las sondas del microarreglo denominadas entidades. Color rojo entidades sobreexpresadas; color azul entidades subexpresadas.

La interpretación de la imagen anterior (Figura 15) hace referencia a los genes que se encuentran subexpresados diferencialmente en tejido tumoral versus tejido sano o normal de mama. El análisis detallado de todos los genes sobreexpresados y subexpresados se describe en el Anexo VIII; 8.3.

A continuación se muestra un gráfico de los genes identificados y su fold change, que describe cuánto cambia una cantidad que va de un valor inicial a un valor final (número de cambios), en este caso la expresión en tejido sano vs tejido tumoral (Figura 16). Los fold change varían desde 45 hasta -25 veces.

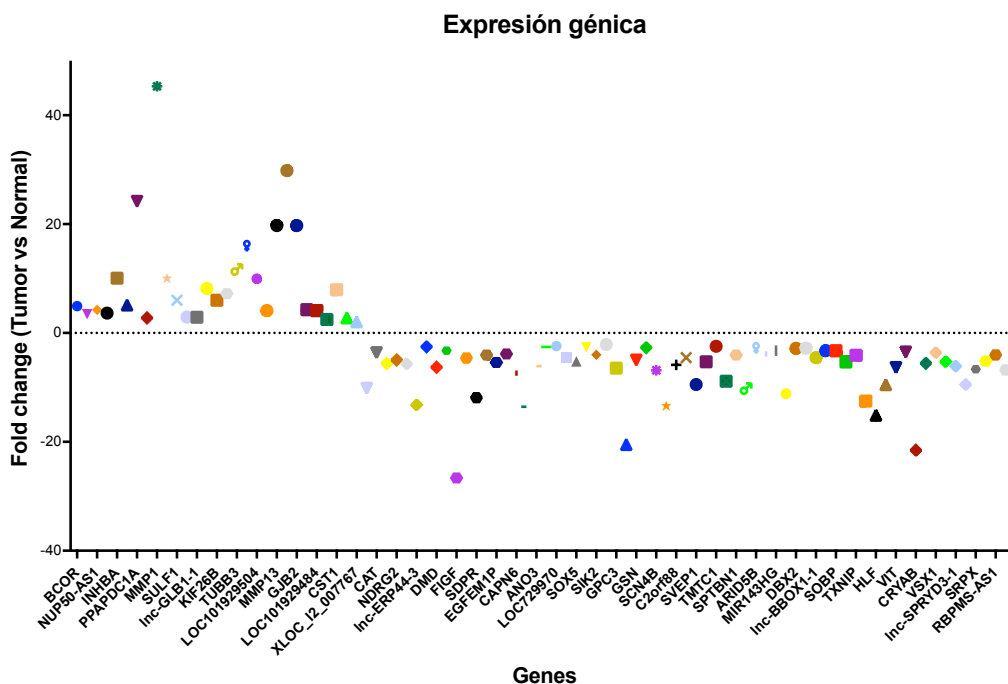


Figura 16. Expresión génica de las 99 entidades diferencialmente expresadas. Sobreexpresión de 34 entidades y subexpresión de 65 entidades.

Posteriormente se realizó un análisis de interacciones de las 99 entidades identificadas con el programa STRING v10.5. A continuación se muestra en la Figura 17 el mapa de interacciones.

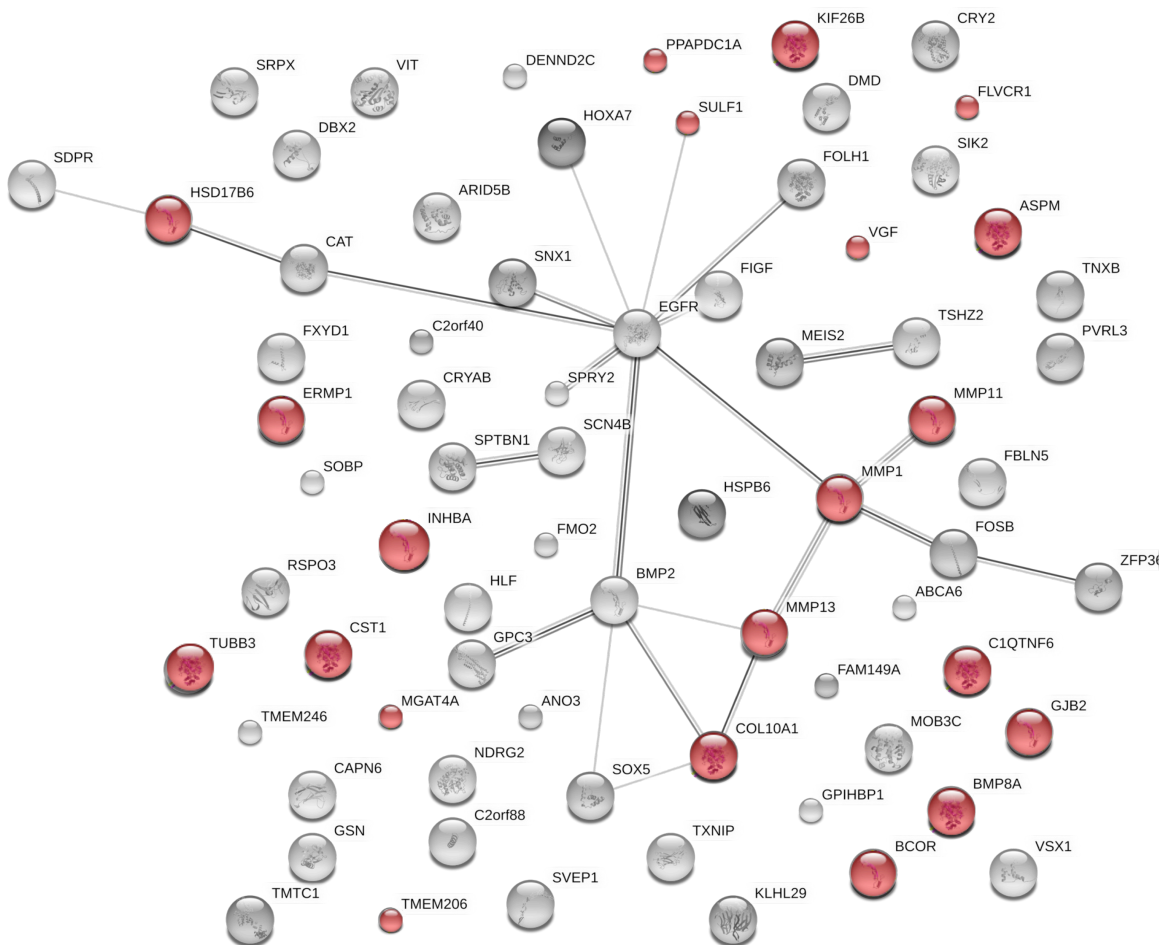


Figura 17. Mapa de interacciones de las 99 entidades diferencialmente expresadas en tejido tumoral vs tejido sano adyacente, STRING v10.5. Color gris: genes subexpresados; color rojo: genes sobreexpresados.

Se procedió a analizar las vías en las que participan los genes que se encontraron diferencialmente expresados, destacando la vía del receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGFBR), la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1), la vía de la interleucina 7 (IL-7) y la vía de Wnt (Figura 18).

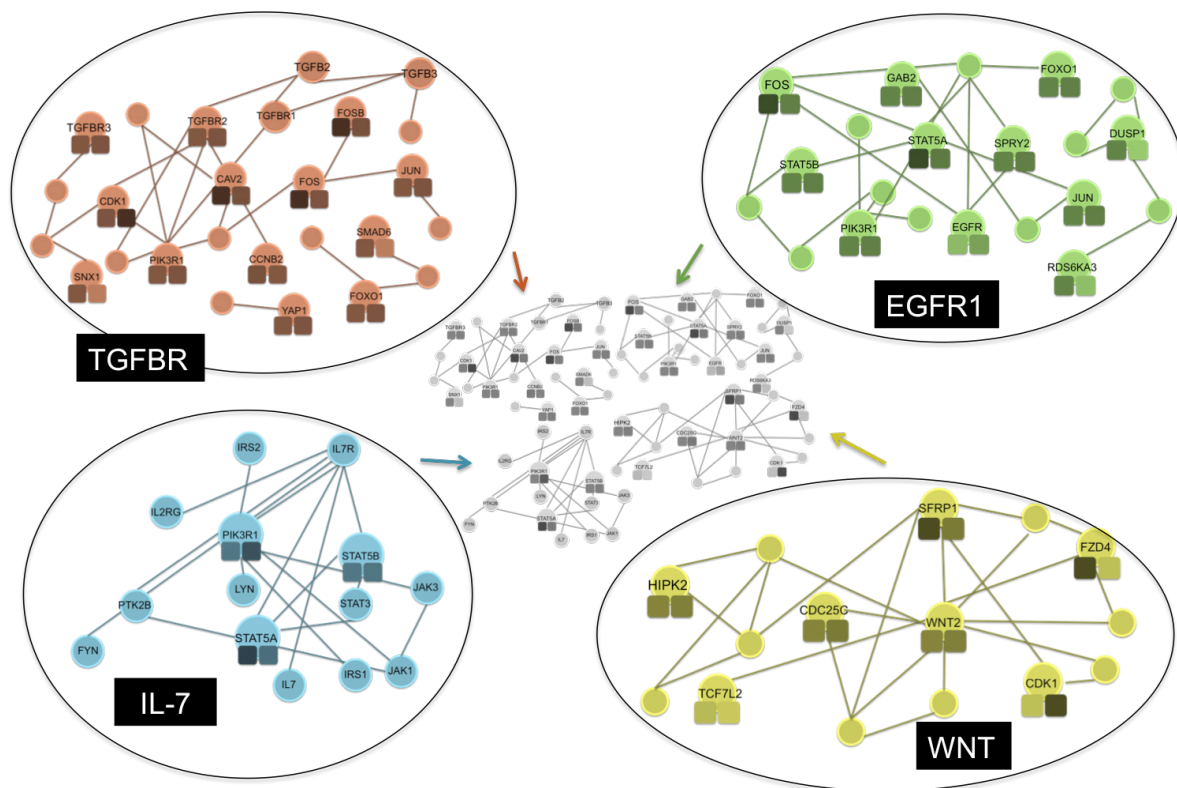


Figura 18. Vías de señalización diferencialmente expresadas identificadas. Parte superior izquierda: Receptor del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGFBR), superior derecha: Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1), inferior izquierda: interleucina 7 e inferior derecha: Wnt.

Una vez identificadas las vías de señalización participantes de los genes diferencialmente expresados, se observó la expresión en tejido tumoral respecto al tejido sano adyacente como control (Figuras 19, 20, 21 y 22).

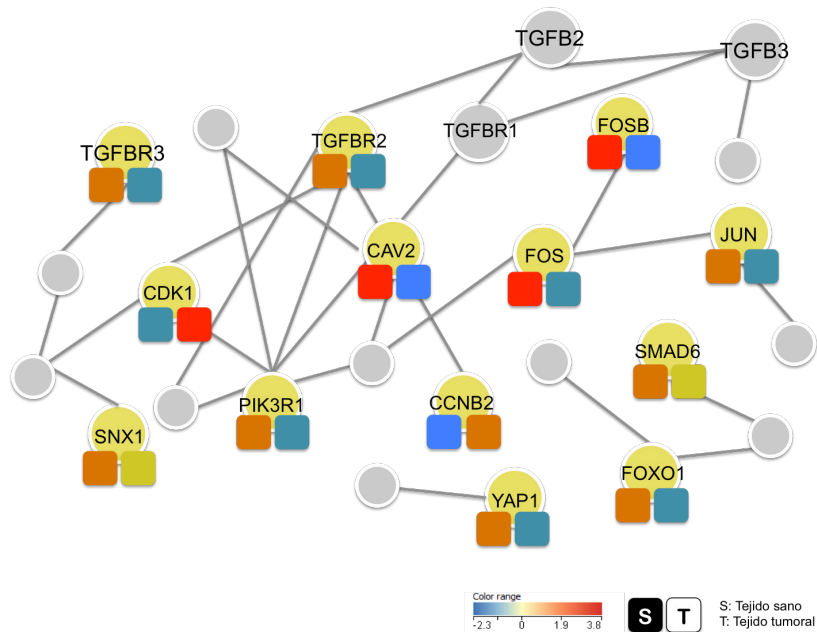


Figura 19. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización del Receptor del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGFBR).

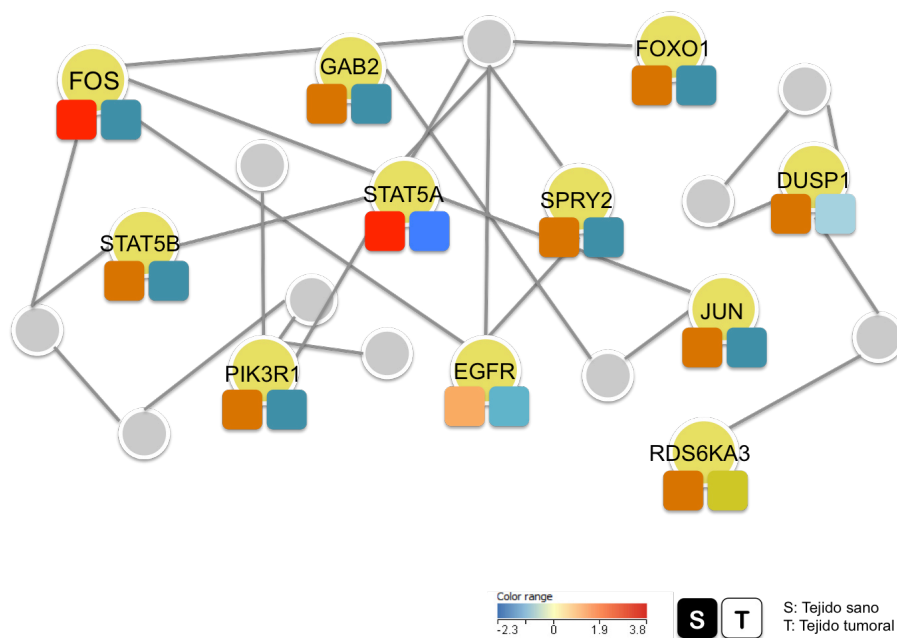


Figura 20. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización del Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1).

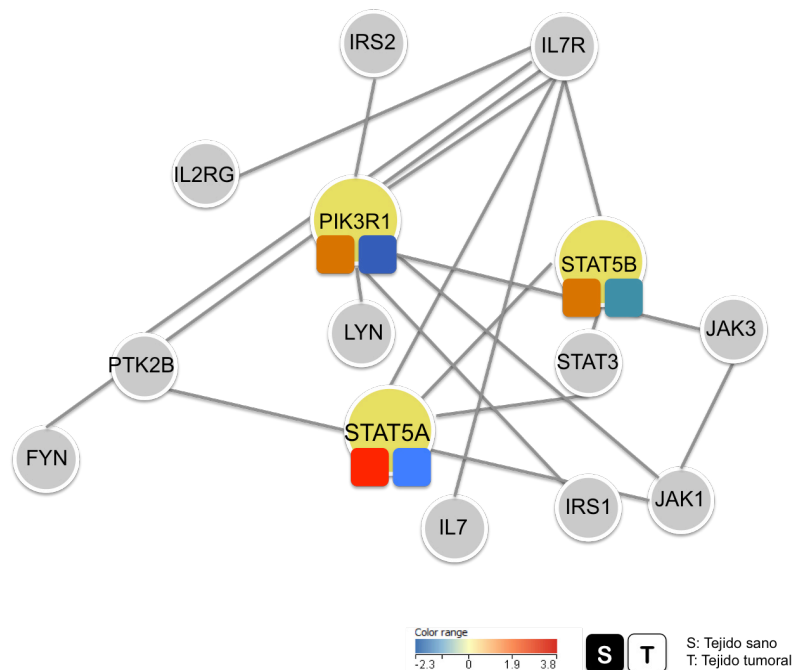


Figura 21. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización de interleucina 7.

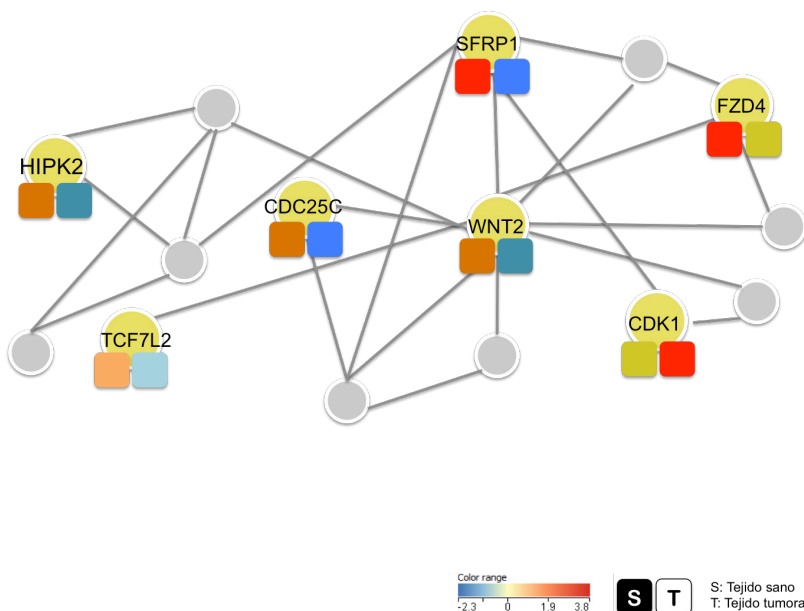


Figura 22. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente participantes en la vía de señalización de Wnt.

A continuación se encuentran imágenes señalando los organelos celulares en los que participan cada una de estas vías.

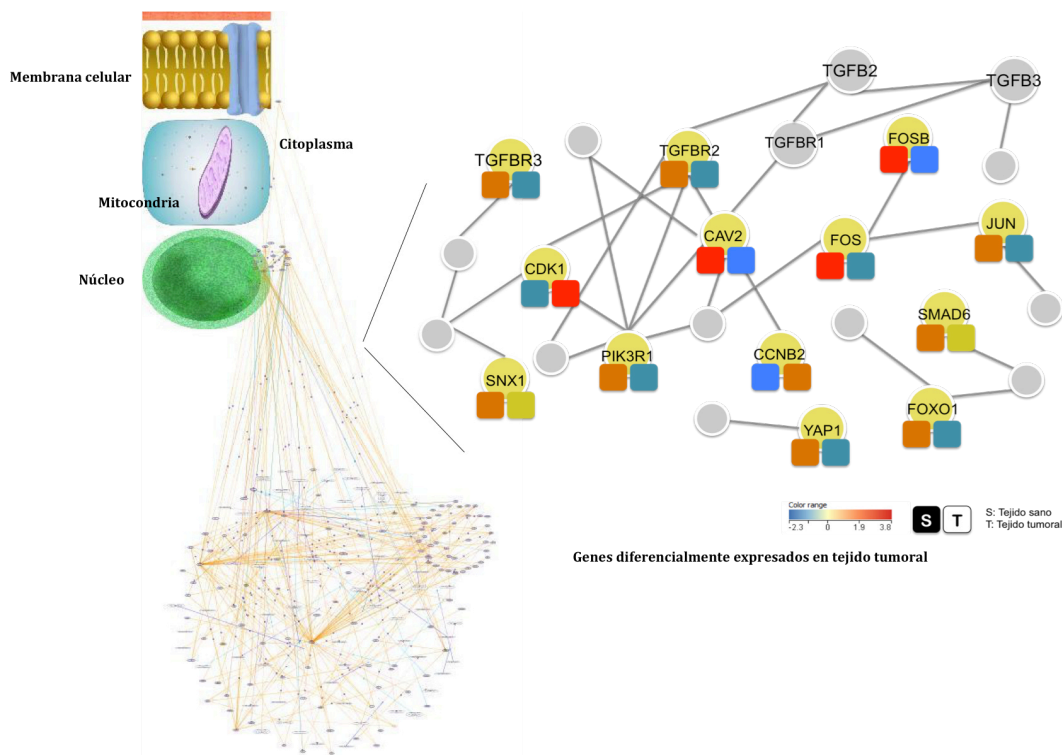


Figura 23. Vía parcial del receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGFBR). Se encuentra ampliamente relacionada a procesos de desregulación celular, los cuales permiten tomar ventaja a las células tumorales. Posee papel en desarrollo tumoral, modulando la invasión celular, la regulación del sistema inmune y modificando de microambiente celular. Participación de la membrana celular, mitocondrias, citoplasma y principalmente el núcleo. A la derecha de la figura se muestran los genes diferencialmente expresados identificados, en color amarillo, así como su expresión génica, correspondiente al cuadro inferior en cada gen (código descrito en la parte inferior derecha de la figura).

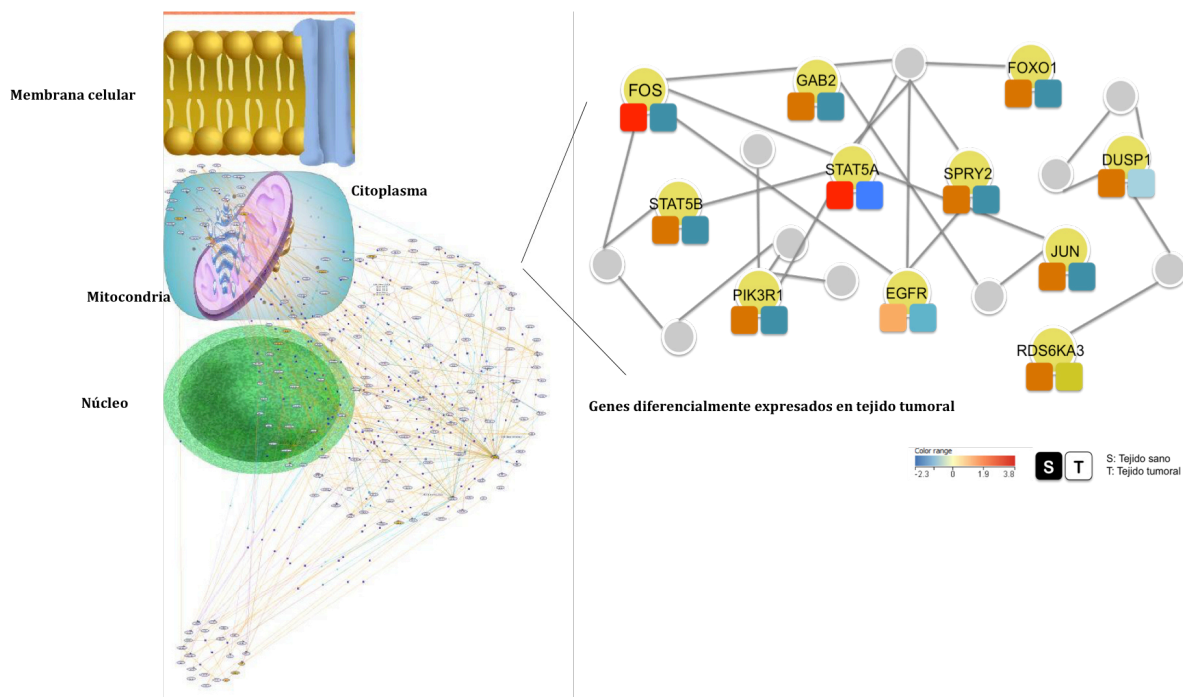


Figura 24. Vía parcial del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1) se encarga de regular los procesos biológicos esenciales durante el desarrollo, como la proliferación celular, supervivencia y migración. La sobreexpresión de genes en esta vía así como de HER2 están relacionados con una diversidad de cánceres humanos. Participación de la membrana celular, mitocondrias, citoplasma y principalmente el núcleo. A la derecha de la figura se muestran los genes diferencialmente expresados identificados, en color amarillo, así como su expresión génica, correspondiente al cuadro inferior en cada gen (código descrito en la parte inferior derecha de la figura).

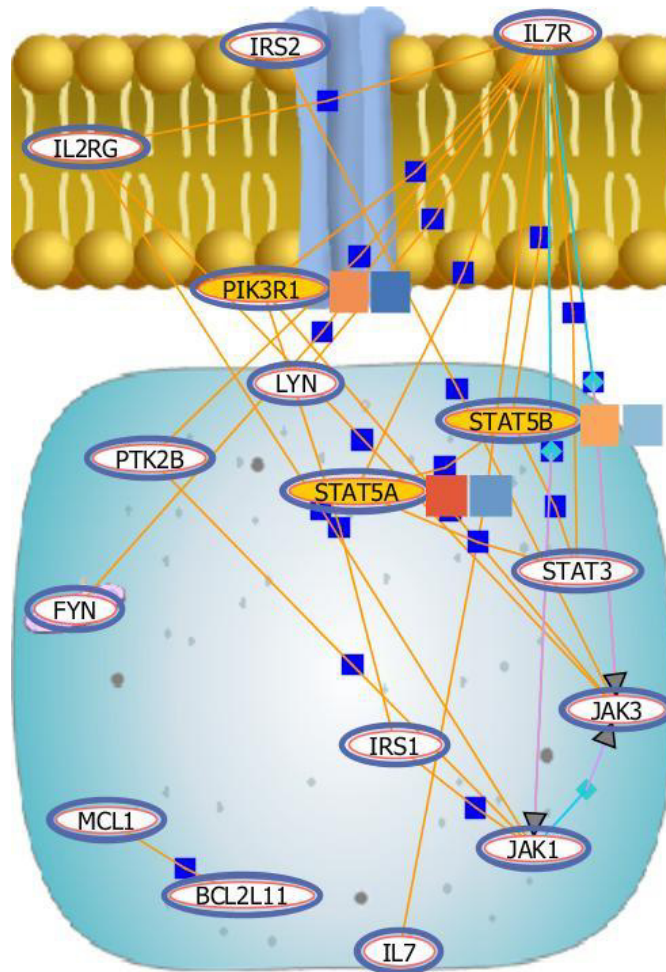


Figura 25. Vía parcial de la interleucina 7 (IL-7) posee rol en el desarrollo de células B y T. Regula la supervivencia de los linfocitos, consumo de glucosa, proliferación y diferenciación. IL-7 promueve el desarrollo de malignidades hematológicas (como leucemia linfoblástica y linfoma de células T). Participación de la membrana celular y citoplasma. En color amarillo se muestran los genes diferencialmente expresados identificados).

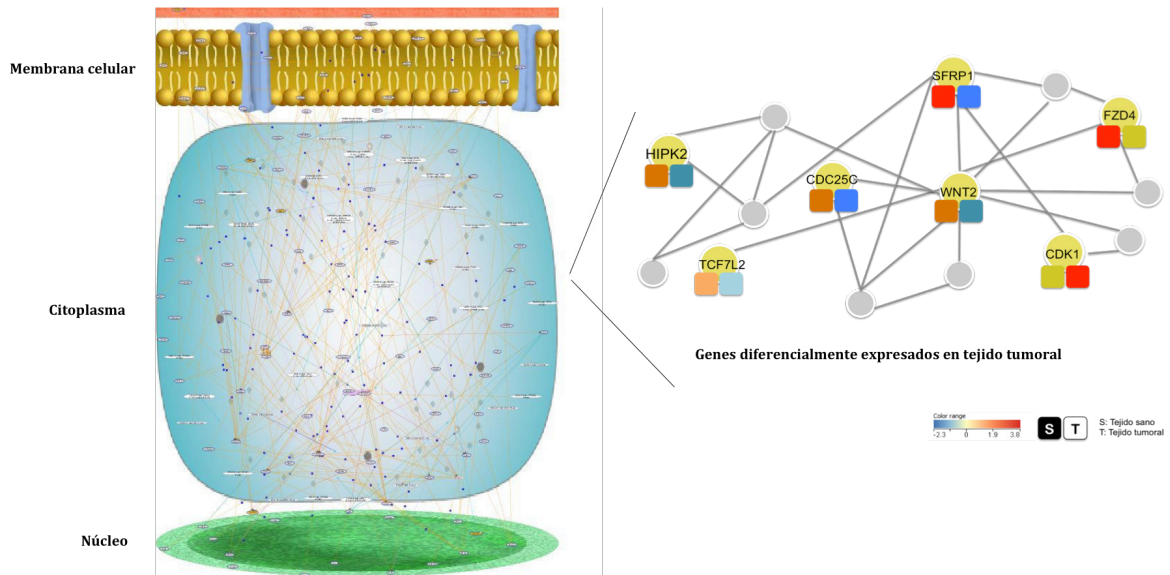


Figura 26. Vía parcial de Wnt tiene un papel en la migración celular, polaridad celular, formación de patrones neurales, organogénesis durante el desarrollo embrionario. La importancia clínica de esta vía ha sido demostrada por mutaciones que conducen a gran variedad de enfermedades, incluyendo CaMa y próstata, glioblastoma, diabetes tipo II. Participación de la membrana celular, citoplasma y núcleo. A la derecha de la figura se muestran los genes diferencialmente expresados identificados, en color amarillo, así como su expresión génica, correspondiente al cuadro inferior en cada gen (código descrito en la parte inferior derecha de la figura).

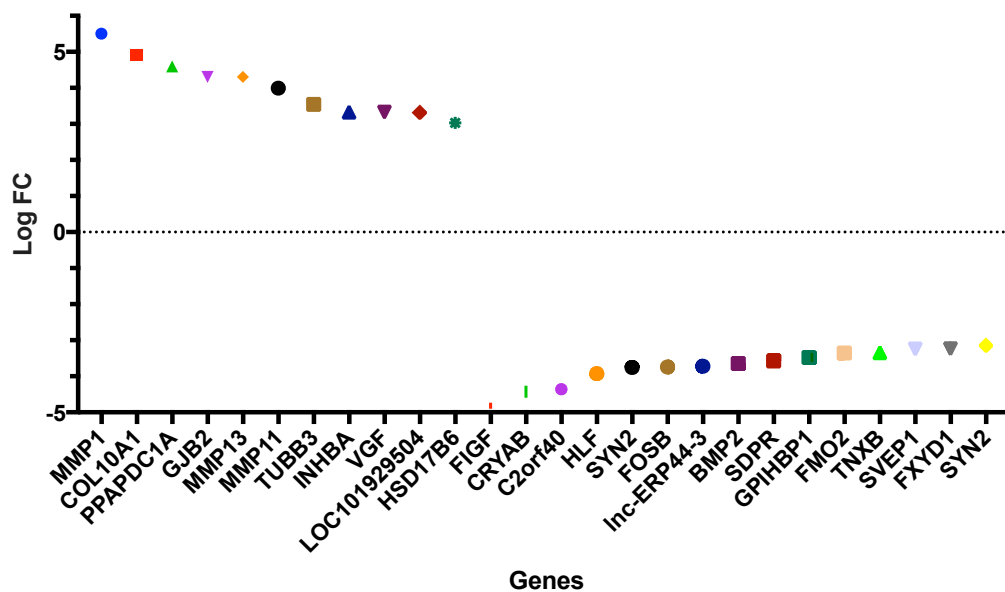


Figura 27. Selección de 26 genes diferencialmente expresados identificados en el estudio. Se seleccionaron 26 genes de acuerdo al nivel de cambio en la expresión en tejido tumoral vs tejido sano adyacente. Los genes seleccionados fueron *MMP1*, *COL10A1*, *PPAPDC1A*, *GJB2*, *MMP13*, *MMP11*, *TUBB3*, *INHBA*, *VGF*, *LOC101929504*, *HSD17B6*, *FIGF*, *CRYAB*, *C2orf40*, *HLF*, *SYN2*, *FOSB*, *Inc-ERP44-3*, *BMP2*, *SDPR*, *GPIHBP1*, *FMO2*, *TNXB*, *SVEP1*, *FXYP1*, *SYN2* (Figura 17). Relacionados a procesos de desarrollo embrionario, la reproducción, proliferación celular, diferenciación, transformación, uniones célula-célula y la remodelación de tejidos; procesos de enfermedad, como artritis y metástasis.

9.6 Análisis multi-ómico

Una vez obtenidos los resultados del análisis de expresión génica, se procedió a realizar el análisis multi-ómico, en el cual se agrupan los datos obtenidos de los microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) en los que se estudiaron las alteraciones en el número de copias, ganancias y pérdidas de material genético por Mendoza-Pérez y Cols., 2016 y los datos obtenidos del análisis de expresión de genes de estas mismas muestras CaMa ductal infiltrante.

A continuación, se muestra un diagrama de Venn con la integración de datos CNA y expresión génica y los genes que comparten. Se identificaron 26,730 genes con CNA en el genoma y 227 genes diferencialmente expresados y al momento de integrar ambos datos se observó que comparten 96 genes (Figura 28).

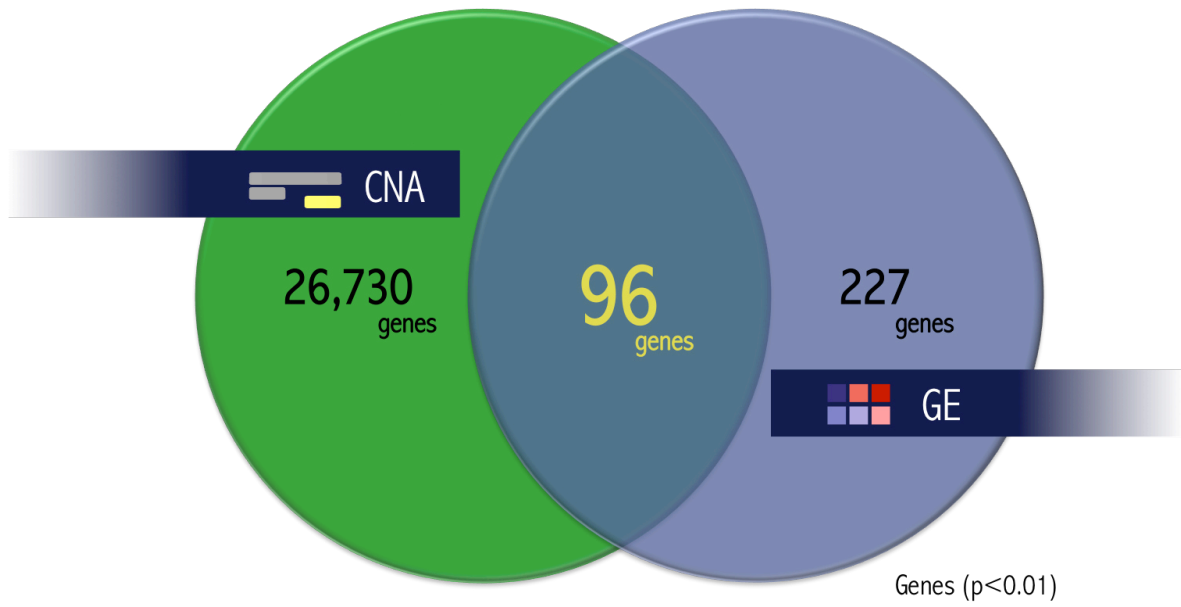


Figura 28. Diagrama de Venn integración de CNA y expresión génica identificadas en tejido tumoral y el número de genes que comparten ambos.

Una vez realizado el análisis multi-ómico se identificaron los genes que comparten los datos genómicos y transcriptómicos y las vías de señalización afectadas con una significancia estadística de $p < 0.01$ (Figuras 29 y 30).

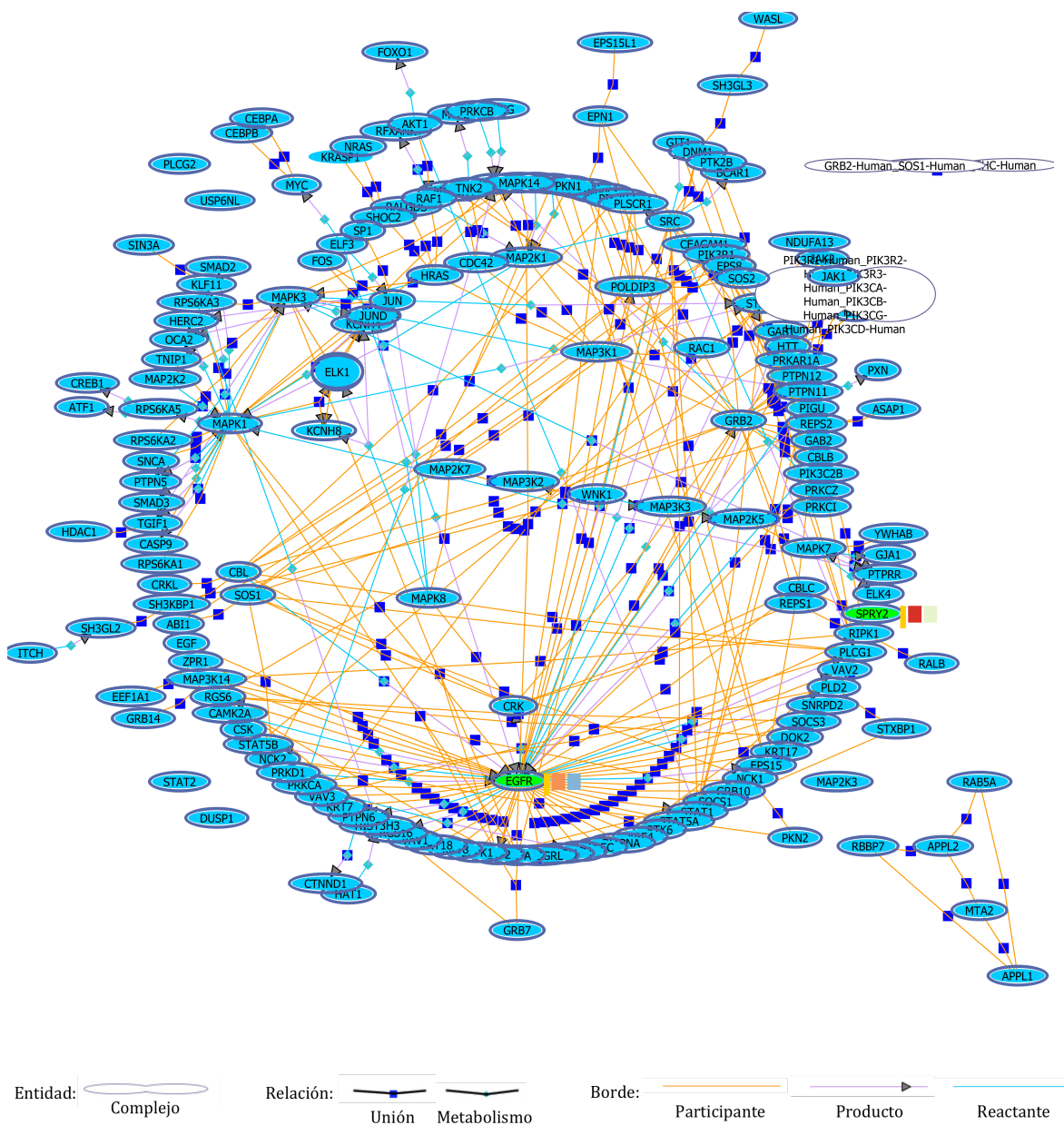


Figura 29. Vía del receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1) induce crecimiento, diferenciación, migración, adhesión y supervivencia celular. Los genes SPRY2 y EGFR se encuentran diferencialmente expresados en esta vía de señalización.

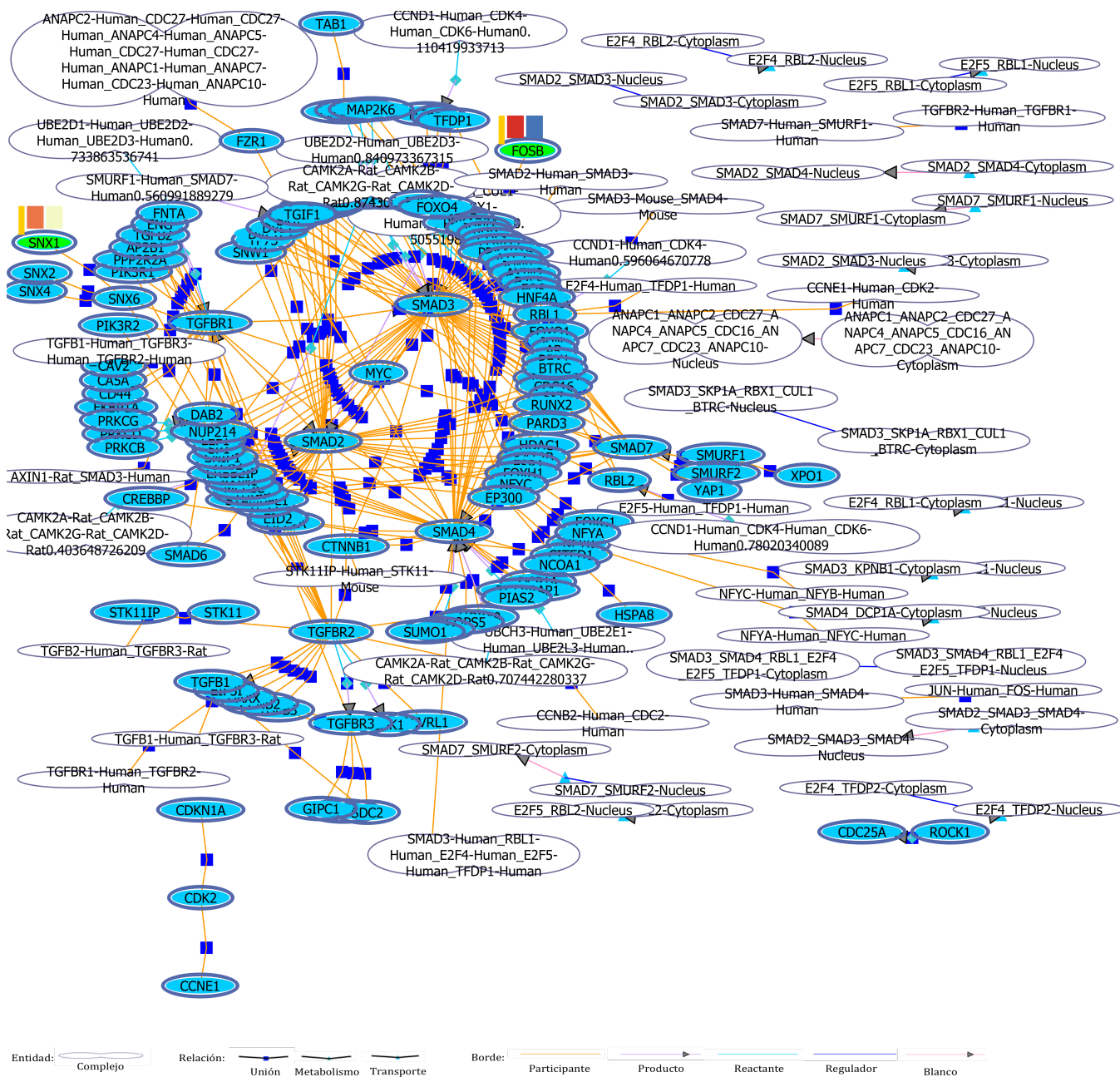


Figura 30. Vía del receptor del factor de crecimiento transformante beta (TGFBR) posee rol en desarrollo tumoral, modulando la invasión celular y la regulación del sistema inmune. SNX1 y FOSB se encuentran diferencialmente expresados tanto a nivel de ADN como en su expresión.

9.7 Validación de un posible biomarcador

Con base al análisis multi-ómico realizado, se procedió a investigar los genes y a realizar una selección de los más representativos con la finalidad de realizar una validación de estos mediante qPCR. Se optó por seleccionar el ARN largo no codificante *lnc-ERP44-3* para estudiar su expresión en todas las muestras incluidas en este estudio correspondientes a tejido sano adyacente y tejido tumoral, con la finalidad de observar si estas poseen un comportamiento similar en su expresión y poder identificar nuevos marcadores predictivos de CaMa. Además se identificaron más genes obtenidos en el análisis que de acuerdo a su comportamiento de expresión y del análisis multi-ómico podrían validarse como posibles marcadores en CaMa.

Se procedió a realizar la retrotranscripción del ARN para obtener el ADNc a partir de las muestras de tejido tumoral y sano adyacente; el protocolo, la estandarización y las cuantificaciones del ADNc, así como las características y el diseño de los primers para el ARN largo no codificante *lnc-ERP44-3*, se encuentran descritos en el Anexo IV.

9.7.1 qPCR

Se determinó que 200ng era la concentración de ADNc ideal de acuerdo a la previa estandarización efectuada (Anexo 5; 5.3) y se procedió a realizar las reacciones y cálculos pertinentes. A continuación se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación relativa de *ARN-lnc ERP44-3* (Figura 34).

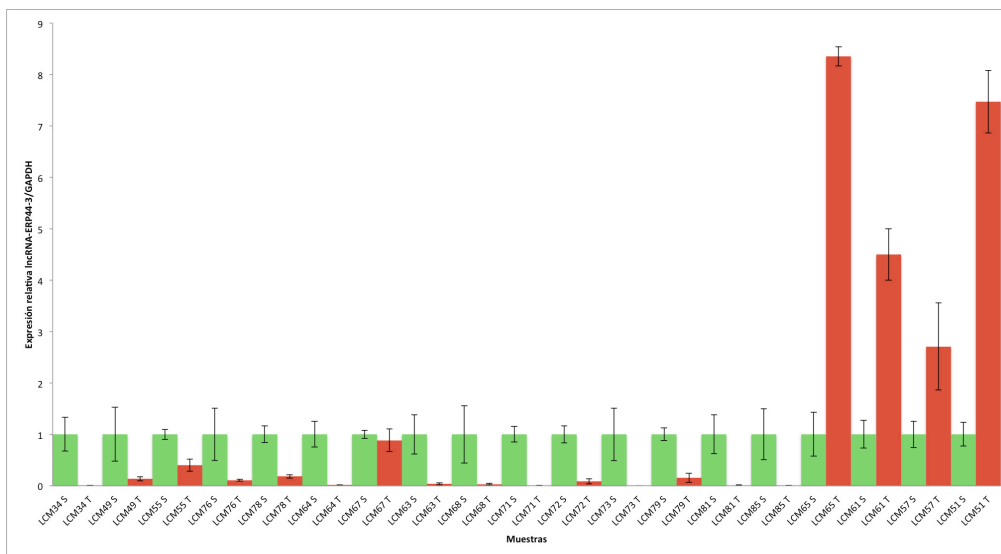


Figura 31. Expresión relativa de *ARN-lnc ERP44-3* correspondiente a tejido tumoral y tejido sano adyacente de 38 muestras de pacientes. S:tejido sano adyacente (código de color verde); T:tejido tumoral (código de color rojo). Gen endógeno *GAPDH*.

El análisis de expresión relativa comprendió 38 muestras de ADNc, 19 correspondientes de muestras de tejido sano adyacente y las otras 19 de muestras de tejido tumoral. Pertenecientes a 19 pacientes participantes en este estudio. La cuantificación del gen se efectuó empleando el método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$.

Se esperaban obtener resultados correspondientes a una subexpresión del gen *ARN-lnc ERP44-3* en tejido tumoral, debido a que el análisis de perfiles de expresión mediante microarreglos mostró esta característica frente a la expresión en tejido sano adyacente. El ensayo de qPCR nos permitió determinar que efectivamente este gen no codificante se encuentra subexpresado en la mayoría de las muestras correspondientes a tejido tumoral; específicamente lo encontramos subexpresado en 15 de las 19 muestras de pacientes con CaMa ductal infiltrante, lo cual corresponde a un 80% de estas 19 muestras.

CAPÍTULO X. DISCUSIÓN

El CaMa representa un desafío para la salud pública en nuestro país por la tendencia ascendente en su incidencia y mortalidad, determinadas por el envejecimiento de la población, el aumento en la prevalencia de los factores de riesgo y la falta de un programa nacional de detección oportuna integral, lo cual resulta evidente por el diagnóstico del CaMa en etapas tardías hasta en un 52% (Casbas-Hernández *et al.*, 2015).

El estadio del tumor en las muestras de nuestro estudio resultaron ser en su mayoría de grado II y III en este estudio. Esto significa que los tumores ya se encontraron en estadios más avanzados, tal como se describe anteriormente. Además, de acuerdo con los factores que ya han sido reportados como riesgo para la salud como la obesidad, se observó que la mayoría de las pacientes tenían sobrepeso y obesidad con un IMC \pm 29. Estudios han demostrado que, en las mujeres posmenopáusicas, un mayor IMC representa al final del día un claro aumento en el riesgo de CaMa. Por ejemplo, un aumento de 5 unidades en el IMC se asocia con un aumento del 12% en el riesgo (Renehan *et al.*, 2008). Entre las mujeres posmenopáusicas, aquellas que son obesas poseen entre el 20% y 40% más de riesgo de desarrollar CaMa en comparación con mujeres de peso normal (Munsell *et al.*, 2014). Sin embargo, hace falta terminar de reunir datos para tener una historia clínica completa de cada paciente, a fin de poder realizar las pruebas estadísticas pertinentes y poder discriminar si existe una significancia estadística que correlacione algún dato clínico con el CaMa así como ampliar el número de muestras y poder comprobar que efectivamente exista una correlación en nuestra población.

Varios reportes destacan que las células en la periferia de los tumores se someten a constantes cambios genéticos, los cuales pueden evolucionar a mutaciones que generen cáncer. Se han encontrado distintas características biológicas de cáncer en tejido adyacente dependiendo del tumor y subtipo intrínseco. Esta concordancia entre el tumor y el tejido circundante puede ser la base de distribuciones secundarias con cambios genéticos hacia nuevas células y proporciona explicaciones aceptables para la recurrencia local. Estos resultados también sugieren que los biomarcadores tisulares derivados de tejido adyacente al cáncer pueden ayudar a predecir el riesgo y a definir estrategias quirúrgicas adecuadas y

personalizadas (Casbas-Hernández *et al.*, 2015). Por ello, se decidió realizar un microarreglo de CGH para identificar las CNA presentes en tejido sano adyacente y tumoral en este estudio y observar si podía utilizarse como un control al tejido sano adyacente. Se identificaron 4,155 CNA en tejido tumoral y 493 en tejido sano adyacente, compartiendo 175 CNA entre ambos tejidos. La mayoría de las alteraciones identificadas en tejido sano adyacente eran al azar y en genes sin relación a vías de señalización de cáncer. Además, tanto las muestras tumorales como las de tejido sano adyacente, se compararon contra una referencia de ADN de Agilent, por lo tanto, el componente genético de la referencia es conocido y los cambios corresponden con variantes “normales”. Por ello se concluyó que podía utilizarse como control negativo en los ensayos de expresión génica frente a muestras con CaMa.

Los perfiles de expresión génica se realizaron con un análisis de significancia de $p < 0.01$. Identificándose 99 entidades con importancia estadística (Tabla 3).

Tabla 3. Genes diferencialmente expresados en tejido tumoral vs tejido sano adyacente ($p < 0.01$).

Genes sobreexpresados	<i>ASPM, BCOR, BMP8A, CIQTNF6, COL10A1, CST1, ERMP1, FLVCR1, GJB2, HSD17B6, IGFBP7-AS1, INHBA, KIF26B, lnc-C9orf131-1, lnc-GLB1-1, lnc-SLC25A21-2, LOC101929484, LOC101929504, MGAT4A, MMP1, MMP11, MMP13, NUP50-AS1, PPAPDC1A, SULF1, TMEM206, TUBB3, VGF, XLOC_l2_007767.</i>
Genes subexpresados	<i>ABCA6, ANO3, ARID5B, BMP2, C2orf40, C2orf88, CAPN6, CAT, CRY2, CRYAB, DBX2, DENND2C, DMD, EGFEM1P, EGFR, FAM149A, FBLN5, FIGF, FMO2, FOLH1, FOSB, FXYD1, GPC3, GPIHBP1, GSN, HLF, HOXA7, HSPB6, KLHL29, lnc-BBOX1-1, lnc-ERP44-3, lnc-SPRYD3-1, LOC101927895, LOC729970, MEIS2, MIR143HG, MOB3C, NDRG2, NDRG2, PVRL3, RBPMS-AS1, RSPO3, SCN4B, SDPR, SIK2, SNX1, SOBP, SOX5, SPRY2, SPTBN1, SPTBN1, SRPX, SVEP1, SYN2, SYN2, TMEM246, TMTC1, TNXB, TNXB, TSHZ2, TXNIP, VIT, VSX1, ZFP36.</i>

Las vías de señalización principalmente alteradas por estos genes correspondieron a: adhesión de proteínas y apoptosis, degradación de colágeno, transporte IGF, reparación de proteínas, transporte hacia membrana plasmática, señalización y regulación PI3K/AKT, cascada RAF/MAP Kinasas, motilidad celular, regulación ERBB2, señalización de ERBB4 y ERBB2, así como de señalización aberrante de PI3K en cancer. Sin embargo, la cantidad de alteraciones identificada con estas 99 entidades corresponden a 286 vías alteradas, las cuales se encuentran descritas en el Anexo VI. Muchas de estas vías ya han sido descritas por numerosos grupos de investigación, entre las cuales se pueden destacar alteraciones en la vía de apoptosis, RAF/MAP kinasas, regulación de ERBB2 y PI3K. Sin embargo nos enfocamos en identificar genes que consideráramos de importancia, los cuales no hayan sido descritos o relacionados aún con CaMa. Es importante destacar el papel de ARN no codificantes. Seis ARN largos no codificantes: *lnc-C9orf131-1*, *lnc-SLC25A21-2*, *lnc-ERP44-3*, *lnc-BBOX1-1*, *lnc-SPRYD3-1* y *lnc-GLB1-1* los cuales no se han relacionado con CaMa. Cuatro ARN no codificantes: *LOC101929484*, *LOC101929504*, *LOC101927895* y *LOC729970*.

Posterior al análisis de expresión se realizó el análisis multi-ómico y se identificaron 96 genes que comparten CNA y diferencias en su expresión génica respecto al tejido sano adyacente. A continuación se mencionan aquellos genes más representativos identificados (Figura 32).

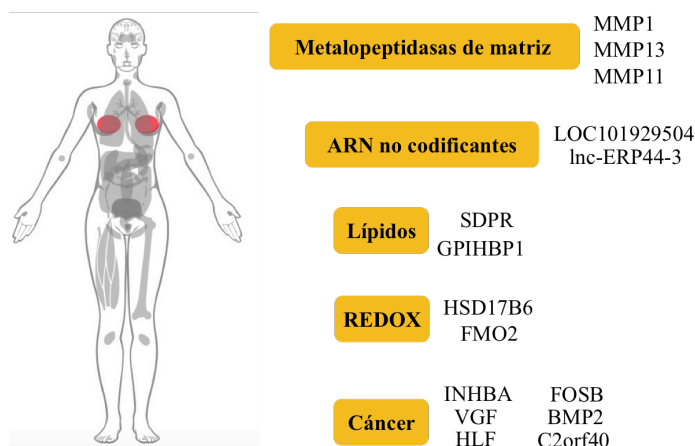


Figura 32. Genes identificados en el análisis multi-ómico (genoma: CNA y transcriptoma: expresión génica) diferencialmente expresados y su participación en procesos moleculares.

Se identificaron dos vías de señalización que contienen genes diferencialmente expresados de acuerdo al análisis multi-ómico, de datos CNA y expresión génica. La vía Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico (EGFR1) y vía del Receptor del factor de crecimiento transformante B (TGFBR). Los genes *EGFR*, *SPRY2*, *FOSB* y *SNX1* se encuentran subexpresados en tejido tumoral (Figura 33).

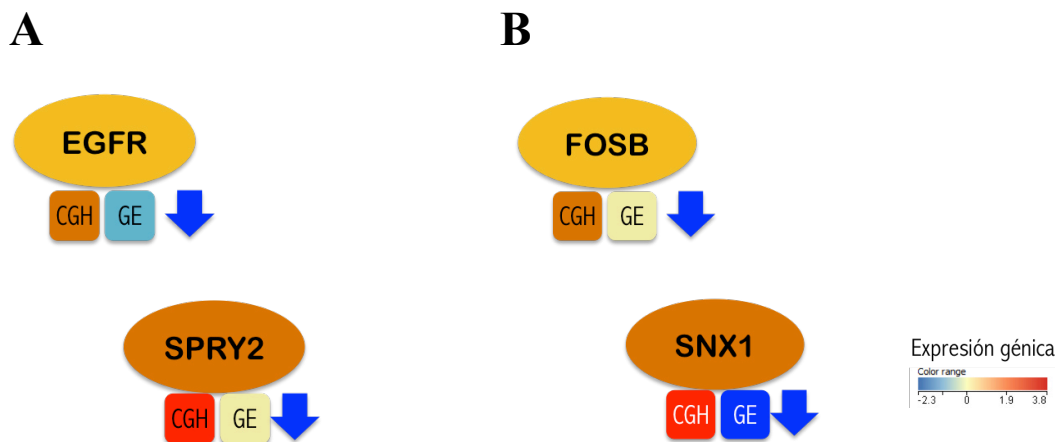


Figura 33. Genes estadísticamente significativos de acuerdo al análisis multi-ómico ($p < 0.05$). A: Vía EGFR1, B: TGFBR.

SPRY2 (Sprouty RTK Signaling Antagonist 2) es un gen codificante que se ha visto asociado a Nefropatía Iga 3 y Adenocarcinoma Cortical Suprarrenal. Entre sus vías relacionadas están la internalización de ErbB1 y la regulación negativa de la señalización FGFR1. Las anotaciones de GO relacionadas con este gen incluyen la unión de proteína cinasa y la actividad de inhibidor de serina / treonina cinasa de proteína.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se une a ligandos de la familia EGF y la activación de varias cascadas de señalización para convertir señales extracelulares en respuestas celulares adecuadas; activa al menos cuatro cascadas principales de señalización río abajo, incluyendo los módulos RAS-RAF-MEK-ERK, PI3 kinasa-AKT, PLCgamma-PKC y STAT. También puede activar la cascada de señalización NF-kappa-B y fosforilar directamente otras proteínas como RGS16, activando su actividad de GTPasa y probablemente acoplando la señalización del receptor de EGF a la señalización del receptor

acoplado a proteína G. También fosforila a MUC1 y aumenta su interacción con SRC y CTNNB1 / beta-catenina.

El gen *SNXI* codifica un miembro de la familia nexina. Los miembros de esta familia contienen un dominio phox (PX), que es un dominio de unión a fosfoinositida, y están implicados en el tráfico intracelular. Se producen en una proteína endosomal que se encarga de regular la expresión de la superficie celular del receptor del factor de crecimiento epidérmico, también tiene un papel en la clasificación del receptor 1 activado por proteasa de los endosomas tempranos a los lisosomas.

Las proteínas FOS han sido implicadas como reguladores de la proliferación, diferenciación y transformación celular. Las enfermedades asociadas con FOSB incluyen la Oclusión de la Arteria Vertebral y la Fascitis Proliferativa. Entre sus vías relacionadas están la respuesta inmune de los receptores DAP12 en las células NK y vías de señalización de los receptores tipo Toll. Las anotaciones de GO relacionadas con este gen incluyen la actividad del factor de transcripción, la unión al ADN de la secuencia específica y la unión del factor de transcripción.

A continuación se destacan los ARN-lnc diferencialmente expresados en el presente estudio, así como la información actual en la investigación (Tabla 4).

Tabla 4. Descripción de ARN-lnc diferencialmente expresados en muestras de CaMa.

<i>Gen</i>	<i>Descripción</i>	<i>Información</i>	<i>Referencia</i>
<i>lnc-BBOX1-1</i> <i>LOC105376671</i>	AF150379 Human mRNA from cd34+ stemcells Homo sapiens cDNA clone CBMAJE07, mRNA sequence [AF150379]	Localización chr 11. No se conocen sus interacciones ni función. Involucrado como una variante para el metabolismo de albuterol utilizado principalmente para el asma.	Mak <i>et al.</i> , 2017
<i>lnc-C9orf131-1</i>	BX108194 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998M065776, mRNA sequence [BX108194]	Sin información	Sin información
<i>lnc-ERP44-3</i>	LNCipedia lincRNA (lnc-ERP44-3), lincRNA [lnc-ERP44-3:6]	Localización chr 9.	LNCipedia.org ID: lnc-ERP44-3:6
<i>lnc-GLB1-1</i>	LNCipedia lincRNA (lnc-GLB1-1), lincRNA [lnc-GLB1-1:1]	Localización chr 3.	LNCipedia.org ID: lnc-GLB1-1:1
<i>lnc-SLC25A21-2</i>	LNCipedia lincRNA (lnc-SLC25A21-2), lincRNA [lnc-SLC25A21-2:1]	Localización chr 14.	LNCipedia.org ID: lnc-SLC25A21-2:1
<i>lnc-SPRYD3-1</i>	RST18499 Athersys RAGE Library Homo sapiens cDNA, mRNA sequence [BG199219]	Localización chr 11. Marcador para Ca de tiroides	Zitzelsberger <i>et al.</i> , 2010
<i>LOC101927895</i>	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101927895 (LOC101927895), transcript variant X1, ncRNA [XR_241220]	Localización chr 1.	
<i>LOC101929484</i> <i>LINC01615</i>	PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC101929484 (LOC101929484), ncRNA [XR_245642]	Localización chr 6.	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>LOC101929504</i> <i>LINC02544</i>	Homo sapiens uncharacterized LOC101929504 (LOC101929504), long non-coding RNA [NR_125863]	Localización chr 6.	Milet <i>et al.</i> , 2016
<i>LOC729970</i>	Homo sapiens hCG2028352-like (LOC729970), long non-coding RNA [NR_033998]	Involucrado en cáncer epitelial de ovario y carcinoma de pulmón de células no pequeñas.	Yu <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2016

Se observó que del *lnc-BBOX1-1* se desconocen sus interacciones y su función, sin embargo, un reciente estudio de farmacogenética lo involucró como una variante para el metabolismo del albuterol el cual se utiliza principalmente para el asma (Mak *et al*, 2017). Por otra parte el gen *SPRYD3* se ha propuesto como nuevo marcador genético de cáncer de tiroides.

Se ha observado la participación del gen *LOC729970* en cáncer epitelial de ovario y una comparación de tejido sano con un tejido tumoral a través de microarreglos y qPCR, reveló que la expresión de *LOC729970* estaba disminuida. También se ha identificado y validado como probable biomarcador en carcinoma de pulmón de células no pequeñas. En el trabajo se realizaron estudios en carcinomas de pulmón mediante microarreglos y mediante el análisis de expresión génica se identificaron y validaron 64 ARN-lnc y se identificó al gen *LOC729970* desregulado significativamente en carcinomas de pulmón de células no pequeñas, en comparación con los otros tejidos pulmonares normales participes del estudio (Hsu, Chiu, Chen, Hsiao, & Chuang, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Los datos identificados en el presente trabajo reflejan que numerosos genes ya han sido asociados a CaMa o demás carcinomas. Sin embargo, abre la puerta al estudio de diversos genes que no se han relacionado a cáncer e incluso a la escasa o nula información respecto a las regiones correspondientes a esos genes. Por ejemplo, a profundizar en el estudio de ARN-lnc los cuales han sido motivo de estudio en numerosas enfermedades y que en los últimos años han tomado un papel innovador como posibles biomarcadores. Este caso no es la excepción, pues efectivamente la participación y expresión diferencial nos permite adentrar a un nuevo panorama de estudio del CaMa en población de la región del noreste del país, ampliando las posibilidades de poder validar como biomarcador alguno de los genes identificados.

CAPÍTULO XI. CONCLUSIONES

- Se identificaron 99 entidades diferencialmente expresadas ($p < 0.01$) en tejido tumoral y sano adyacente. 34 sobrepresadas y 65 subexpresadas.
- Se identificaron ARN-lnc diferencialmente expresados, destacando *lnc-C9orf131-1*, *lnc-SLC25A21-2*, *lnc-ERP44-3*, *lnc-BBOX1-1*, *lnc-SPRYD3-1* y *lnc-GLB1-1*.
- El análisis de CNA mostró un panel de 590 alteraciones en el ADN procedente de CaMa ductal infiltrante.
- Existe una correlación del 42% entre las CNA identificadas y la expresión génica. Lo cual corresponde a 96 genes ($p < 0.01$).
- Las vías de señalización identificadas con importancia estadística de la correlación de datos multi-ómicos son EGFR1 y TGFBR.
- Las CNA presentes en la arquitectura genómica del CaMa, de las muestras analizadas en este estudio, juegan un importante papel en la expresión génica tumoral. Proporcionan cambios en el transcriptoma y contribuyen a la biología tumoral.

CAPÍTULO XII. PERSPECTIVAS

- Validar firmas génicas de CNA que puedan utilizarse como biomarcadores en CaMa, ampliando el número de muestras.
- Ampliar la búsqueda de datos clínicos y realizar un seguimiento de los pacientes, ± 5 años.
- Comprobar mediante modelo *in vitro*, silenciamiento/sobreexpresión, el papel de estos posibles biomarcadores en linaje de CaMa.
- Diseñar un chip de diagnóstico molecular con alta especificidad, bajo costo que represente un beneficio como herramienta diagnóstico genética del CaMa de nuestra región.

CAPÍTULO XIII. REFERENCIAS

- Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int* 2013; 747318.
- Cabrera GDA, de la Rosa MBM, Kuri MPA. Cáncer de mama en México: perfil epidemiológico a partir de los sistemas de información y vigilancia epidemiológica. 1998-2006. *GAMO* 2008; 7(5).
- Casbas-Hernandez P, Sun X, Roman-Perez E, D'Arcy M, Sandhu R, Hishida A, et al. Tumor intrinsic subtype is reflected in cancer-adjacent tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015; 24:406-14.
- Chao H-H, He X, Parker JS, Zhao W, Perou CM. Micro-Scale Genomic DNA Copy Number Aberrations as Another Means of Mutagenesis in Breast Cancer. *PLoS ONE* 7(12): 2012, e51719. doi:10.1371/journal.pone.0051719.
- Ettinger D. *Current Treat Options in Oncology*. 2000 Aug; 1 (3): 199-2009.
- Fajardo GA: Registro de cáncer. Una política que urge implementar en México. *Rev Med IMSS* 2008;46(4):349-350.
- GLOBOCAN. Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 2012. WHO. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp#INCIDENCE>.
- Haverty PM, Fridlyand J, Li L, Getz G, Beroukhim R, Lohr S, Wu TD, Cavet G, Zhang Z, Chant J. High- resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Gene Chromosomes Cancer*. 2008; 47:530–542.
- Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno- Bueno G. “New” molecular taxonomy in breast cancer. *Clinical & translational oncology*. 2008; 10:777-785.
- Hsu, Y., Chiu, Y., Chen, Y., Hsiao, T., & Chuang, E. Y. A gene-set approach to analyze copy number alterations in breast cancer. *Translational Cancer Research*. 2015; 4(2), 291–302. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.05.03>.
- Knaul F, Nigenda G, Lozano R. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Púb Méx* 2009; 51(2): 335-344.

Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes. *Oncol Rep* 2013; 30:1019-1029.

Kumar V, Abbas AK, Asteret JC. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. 8E. Elsevier. 2008.

Mak A, White M, Szpiech Z, Eckalbar WL, Oh S, Pino-Yanes M, et al. Whole Genome Sequencing of Pharmacogenetic Drug Response in Racially and Ethnically Diverse Children with Asthma. *bioRxiv*. 2017. preprint first posted online; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/128116>.

Mendoza-Pérez P, Rivas-Estilla A, Barrera-Saldaña H, García Solís M, Garza-Guajardo R y Córdova-Fletes C. Análisis de alteraciones genómicas focales y amplias en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante. Tesis de Maestría. 2016. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León. México.

Mohar A: Registros hospitalarios y registros de cáncer. *Cancerología* 2007;2:201-202.

Munsell MF, Sprague BL, Berry DA, Chisholm G, Trentham-Dietz A. Body mass index and breast cancer risk according to postmenopausal estrogen-progestin use and hormone receptor status. *Epidemiologic Reviews* 2014; 36:114-136.

National Institutes of Health. Mammography. National Institutes of Biomedical Imaging and Bioengineering. 2013. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/mammography>.

Palacio ML, Lazcano PE, Allen LB, Hernandez AM. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pùb Méx* 2009;51 (Supl 2):s208-s219. <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v51s2/v51s2a11.pdf>.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406:747-752.

Peto R, Davies C, Godwin J. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomized trials. *Lancet* 2012;73:432-444.

Pieter-Jan Volders; Kenneth Verheggen; Gerben Menschaert; Klaas Vandepoele; Lennart Martens; Jo Vandesompele and Pieter Mestdagh *Nucleic Acids Research* 2014; doi: 10.1093/nar/gku1060.

Pollack J, Therese Sørlie, Charles M. Perou, Christian A. Rees, Stefanie S. Jeffrey, Per E. Lonning, Tibshirani R, Botstein D, Børresen-Dale AL, O. Brown P. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *PNAS* 2002 99 (20) 12963-12968.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371(9612): 569-578.

Sánchez E, Sánchez C, Erazo M. *Cáncer de mama: Actualidades y controversias*. Ed Alfil. 2015; 1:1. 13:117.

Sims AH, Howell A, Howell SJ, Clarke RB. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 516–525.

SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD: Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Secretaría de Salud, junio de 2011.

SINAVE/DGE/SALUD/Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2011: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, Anuarios de Morbilidad, 2011.

Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan; 45:D362-68.

Tábar L, Dean PB, Kaufman CS, Duffy SW, Chen NH. A new era in the diagnosis of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2000;9:233-277.

Tábar L, Fagerberg G, Day NE, Duffy SW, Kitchin RM. Natural history of breast cancer. *Lancet* 1992;339:1108.

Wang AG, Yoon SY, Oh JH, Jeon YJ, Kim M, Kim JM, Byun SS, Yang JO, Kim JH, Kim DG, Yeom YI, Yoo HS, Kim YS, Kim NS. Identification of intra-hepatic cholangiocarcinoma related genes by comparison with normal liver tissues using expressed sequence tags. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 345, no. 3, pp. 1022–1032, 2006.

Wang H, Fu Z, Dai C, Cao J, Liu X, Xu J, Xu P. LncRNAs expression profiling in normal ovary, benign ovarian cyst and malignant epithelial ovarian cancer. *Scientific Reports*, 6 (November) 2016. 38983. <https://doi.org/10.1038/srep38983>.

Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, et al. High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression. *Neoplasia*. 2004; 6:240–7.

Yu H, Xu Q, Liu F, Ye X, Wang J, Meng X. Identification and validation of long noncoding RNA biomarkers in human non-small-cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol*. 2015;10:645–54.

Zitzelsberger H, Thomas G, Unger K. Chromosomal aberrations in thyroid follicular-cell neoplasia: in the search of novel oncogenes and tumour suppressor genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Elsevier, 2010, 321.

CAPÍTULO XIV. ANEXOS

Anexo I. Preparación de soluciones.

1.1 EDTA 0.5 M (pH 8.0) para 1L

1. Pesar la cantidad de 186.1 g de EDTA.
2. Añadir 800 ml de agua destilada y tratar de disolver.
3. Ajustar el pH 8.0 con ayuda de un potenciómetro.
4. Aforar a la cantidad de 1L con agua destilada.

1.2 Buffer TBE 10X para 1L

1. Pesar la cantidad de 108 g de TRIS y 55g de ácido bórico.
2. Añadir 800 ml de agua destilada para disolver.
3. Añadir la cantidad de 40 ml de EDTA.
4. Aforar a la cantidad de 1L con agua destilada.

Para preparar buffer TBE 1X es necesario realizar una dilución 1:10 del buffer TBE 10X con agua destilada.

1.3 Gel de agarosa al 1% para 35 ml.

1. Pesar la cantidad de 0.35 g de agarosa (tamaño de fragmentos de 500 pb a 10 Kb).
2. Añadir 35 ml de buffer TBE 1X y disolver.
3. Calentar hasta punto de ebullición la agarosa y que esta se observe completamente disuelta.
4. Esperar aproximadamente 5 minutos a que se atempere el matraz.
5. Añadir 3.5 μ l de SYBR[®] Safe 10,000X y mezcle.
6. Vaciar al molde y colocar el peine del tamaño y cantidad de pocillos deseado.
7. Esperar a que solidifique la agarosa.

1.4 SDS 10X para 1L

1. Pesar la cantidad de 100g de dodecil sulfato (SDS).
2. Disolver en 1L de agua destilada.

1.5 Buffer PBS (pH 7.4) 10X para 1L.

1. Pesar la cantidad de 80 g de cloruro de sodio (NaCl), 2 g de cloruro de potasio (KCl), 2.4 g de fosfato de potasio (KH₂PO₄).
2. Disolver en 800 ml de agua destilada.
3. Añadir 14.4 ml de fosfato de sodio (Na₂HPO₄) y mezclar.
4. Aforar a la cantidad de 1L con agua destilada.

1.6 Reconstitución de buffer de lavados para microarreglos con Triton X-102.

1. Romper sello de las cubetas de lavado del buffer 1 y 2.
2. Anadir 2 ml de Tritón X-102 a cada cubeta de lavado.
3. Mezclar vigorosamente de 5 a 6 veces.
4. Instalar las llaves dispensadoras en cada contenedor.
5. Rotular visiblemente que ya fueron reconstituidos los buffers con Tritón X-102.

Anexo II. Consentimiento informado.

I. Consentimiento informado

Título del Estudio	“Análisis de alteraciones genómicas focales y amplias en pacientes con cáncer de mama ductal infiltrante”
Nombre del Investigador Principal	Manuel de Jesús García Solís
Institución	Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”
Servicio/Departamento	Clínica de mama
Teléfono de Contacto	(81) 8305 5900
Nombre del Investigador Asociado	Carlos Córdova Fletes
Institución	Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León”
Servicio/Departamento	Bioquímica y Medicina Molecular
Teléfono de Contacto	(81) 83294173/4 ext. 2580
Persona de Contacto	8115089539

Esta forma de consentimiento informado puede contener palabras que usted no entienda. Por favor pídale a su médico del estudio o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara. Su participación en este estudio es voluntaria. Es importante que lea y entienda la siguiente explicación de los procedimientos propuestos. Este documento describe el propósito, los procedimientos, beneficios, riesgos conocidos, molestias, precauciones del estudio incluyendo la duración y la naturaleza de su participación.

También describe las terapias o tratamientos alternativos conocidas que pueden estar disponibles y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. No se pueden dar garantías respecto a los resultados del estudio de investigación. Para ingresar al estudio, Usted como sujeto debe de firmar y fechar este documento con la presencia de dos testigos y finalmente recibirá una copia del mismo.

2.1 Propósito del estudio

El propósito de este estudio será analizar el material genético de tumores malignos mamarios de mujeres mexicanas, para buscar las posibles causas de los tumores e intentar hacer una herramienta de apoyo diagnóstico para nuevas pacientes, al cual Ud. está siendo invitada a participar. El material genético del tumor de mama de Ud. será comparado contra el material genético de su sangre venosa (del brazo), es decir, Ud., y cada paciente serán su propio control.

2.2 Criterios de inclusión y exclusión

El médico del estudio verificará que Usted cumpla con los siguientes requisitos antes de considerar su ingreso al estudio de investigación.

1. Que tenga 18 años de edad o más. 2. Que sean candidata para biopsia de tumor mamario maligno y que pueda donar 2 mL de sangre periférica (venosa, del brazo). 3. Que sea mexicana (de cualquier parte de la República). 4. Que cuente con los siguientes datos registrados a la hora de la biopsia, edad, peso, índice de masa corporal (IMC), consumo de hormonas, consumo de alcohol, estadio pre- y postmenopáusico previo a la firma de este consentimiento informado. 5. Si no cuenta con la información mencionada arriba o que las muestras de material genético se encuentren en mal estado para su estudio, o que Ud. quiera retirar sus muestras del estudio, estas serán excluidas de este proyecto.

2.3 Medicamento/dispositivo de estudio

En este estudio Usted No recibirá un medicamento o dispositivo de estudio.

2.4 Procedimientos

Se le realizará una toma de muestra única de su tumor, la cual será obtenida por el médico tratante a través de las tomas de biopsias de rutina. El médico tratante (del Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”) dará una porción de dicha biopsia que será utilizada para este estudio al que está Ud. siendo invitada. Además, el médico tratante en coordinación con enfermería, le tomarán muestra de 2.0 mL de sangre periférica (venosa, del brazo), la cual nos dará para el estudio.

2.5 Terapias alternativas

En este estudio no se ofrece alguna terapia alternativa a la que recibe/recibirá.

2.6 Riesgos y molestias

Se me ha explicado que mi participación consistirá en dar sólo una muestra de 2.0 ml de sangre del brazo que se usará para los análisis del presente estudio. Declaro que el investigador o el médico genetista responsables me han informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: el procedimiento antes mencionado puede implicar alguna molestia en el sitio de la punción, sin otros riesgos mayores a un moretón, enrojecimiento en el área de punción, o un poco de comezón. La muestra de biopsia es de rutina para el servicio de oncología.

2.7 Posibles beneficios

Usted puede verse beneficiado por su participación en este estudio, aunque no hay garantías de que tenga un beneficio directo por participar en este estudio. Ya que los resultados obtenidos y emitidos serán a largo plazo, a partir de la toma de muestras. En tiempo y forma, algunos pacientes podrán beneficiarse de un apoyo diagnóstico molecular el cual será enviado al médico tratante y permitirá darle un consejo genético apropiado.

2.8 Nuevos hallazgos

El médico del estudio le informará a usted o a su representante legal acerca de cualquier hallazgo significativo que se desarrolle durante el transcurso de este estudio que pudiera afectar el deseo de seguir participando en este estudio. Usted tiene el derecho de conocerla y tomar la decisión si continúa o no en el estudio.

2.9 Retiro y terminación

Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento. Si elige no participar o retirarse del estudio, su atención medica presente y/o futura no se verá afectada y no incurrirá en sanciones ni perderá los beneficios a los que usted tendría derecho de algún otro modo.

El médico podrá suspender su participación en el estudio, sin su consentimiento, por cualquiera de las siguientes circunstancias: 1.- Que el patrocinador del estudio cancele el estudio. 2.- Que el médico considere que es lo mejor para Usted. 3.- Que necesita algún procedimiento o medicamento que interfiere con esta investigación. 4.- Su participación se suspende para cumplir con los requisitos del estudio. 5.- Que no ha seguido las indicaciones del médico lo que pudiera traer como consecuencias problemas en Usted.

Si Usted decide retirarse de este estudio, deberá realizar lo siguiente: 1.- Notificar a su médico tratante del estudio 2.- Deberá de regresar todo el material que su médico le solicite (si en dado caso se le fue otorgado). Si su participación en el estudio se da por terminada, cualquier que sea la razón, el médico por su seguridad, continuará con seguimientos clínicos, además de podrá utilizar la información médica que se recabó antes de su terminación.

2.10 Costos, reembolsos y pagos

Los medicamentos, procedimientos y pruebas relacionadas con el estudio no tendrán ningún costo. Los gastos estarán solventados por el proyecto de investigación mismo. En este estudio Ud. no recibirá algún tipo de reembolsos ya que no tendrá costo; tampoco recibirá compensación económica o pago por participar.

2.11 Confidencialidad/expediente clínico

Si acepta participar en la investigación, el médico del estudio recabará y registrará información personal confidencial acerca de su salud y de su tratamiento. Esta información no contendrá su nombre completo ni su domicilio, pero podrá contener otra información acerca de Usted, tal como iniciales y su fecha de nacimiento. Toda esta información tiene como finalidad garantizar la integridad científica de la investigación. Su nombre no será conocido fuera de la Institución al menos que lo requiera nuestra Ley.

Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La solicitud será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo,

cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto con la finalidad de proteger la integridad del Estudio.

La Facultad de Medicina perteneciente a la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”, así como los investigadores principal y asociado serán los responsables de salvaguardar la información de acuerdo con las regulaciones locales. Usted tiene el derecho de solicitar por escrito al medico un resumen de su expediente clínico. La información personal acerca de su salud y de su tratamiento del estudio podrá procesarse o transferirse a terceros en otros países para fines de investigación y de reportes de seguridad, incluyendo Agencias reguladoras (Secretaria de Salud (SSA)) locales así como a comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra Institución.

Para los propósitos de este estudio, autoridades sanitarias como Secretaria de Salud y Comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra Institución podrán inspeccionar el expediente clínico, incluso los que fueron recabados antes de su inicio de participación, los cuales pueden incluir su nombre, domicilio y otra información personal. En caso necesario estas auditorías o inspecciones podrán hacer fotocopias de parto o de todo su expediente clínico. La razón de esto es asegurar que el estudio se está llevando a cabo apropiadamente con la finalidad de salvaguardar sus derechos como pacientes en investigación. Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones o en publicaciones.

La información recabada durante este estudio será recopilada en bases de datos del investigador, los cuales podrán ser usados en otros estudios en el futuro. Estos datos no incluirán información médica personal confidencial. Se mantendrá el anonimato. Al firmar este documento, Usted así como su representante autorizan el uso y revelaciones de la información acerca de su estado de salud y tratamiento identificado en esta forma de consentimiento. No perderá ninguno de sus derechos legales como sujeto de investigación. Si hay cambios en el uso de su información, su médico le informará.

2.12 Intervención del médico familiar

Se le informará a su médico de cabecera acerca de su participación en este estudio, enviándole la información médica pertinente si lo solicita así como cualquier información médica relevante. Para que los médicos de la Institución conozcan de su participación en el estudio, los expedientes clínicos cuentan con un identificador para que el médico de cabecera se ponga en contacto con el Investigador.

2.13 Compensación y tratamiento de lesiones

Si se enferma o se lesiona debido a una complicación o adversidad que sea resultado directo del uso del medicamento/dispositivo o procedimiento en estudio, deberá Usted notificar a su Médico para que el proporcione los cuidados necesarios para el tratamiento de dicha complicación. El tratamiento recibido no tendrá ningún costo y será cubierto por la Institución, así como la indemnización a la cual tendría derecho en caso de requerirla.

2.14 Declaración

Reconozco que me han dado la oportunidad de hacer preguntas relacionadas al estudio de investigación y que todas estas se me han respondido de manera clara y precisa.

Entiendo además si tengo preguntas relacionadas al estudio, así como en el caso de lesiones o complicaciones deberé de notificar de inmediato al investigador con la siguiente información de contacto.

Nombre del Investigador Principal	Carlos Córdova Fletes
Teléfono de Contacto	(81) 83294173/4 ext. 2580
Teléfono de emergencias	8115089539

Al firmar este consentimiento reconozco que mi participación es voluntaria y que puedo negarme a participar o suspender mi participación en cualquier momento sin sanciones ni pérdidas de los beneficios a los que de otro modo tengo derechos.

Acepto además que mi información personal de mi salud puede utilizarse y transferirse para nuevos estudios de investigación clínica con la finalidad de brindar más información y así

contar con nuevas opciones de tratamiento. Entiendo que mi información puede ser auditada o inspeccionada por agencias reguladoras como la Secretaria de Salud así como por la misma Institución.

Se me entrega una copia del consentimiento informado.

2.15 Firmas

<i>Fecha</i>	<i>Firma del Sujeto</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>
--------------	-------------------------	---------------------------------

<i>Fecha</i>	<i>Firma del Primer Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>
--------------	---------------------------------	---------------------------------

Relación del Primer Testigo con el Sujeto del Estudio Dirección

<i>Fecha</i>	<i>Firma del Segundo Testigo</i>	<i>Nombre en letra de molde</i>
--------------	----------------------------------	---------------------------------

Relación del Segundo Testigo con el Sujeto del Estudio Dirección

II. Aseguramiento del investigador o del miembro del equipo

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

<i>Fecha</i>	<i>Firma de la Persona que Obtuvo el Consentimiento</i>	<i>Nombre en letra de molde Investigador Principal</i>
--------------	---	--

Anexo III. Extracción de ARN total

Mediante el kit comercial RNeasy Mini Kit, QIAGEN.

1. Homogeneizar cada tejido mecánicamente mediante un homogeneizador vidrio-vidrio con 600 µl de buffer RLT (QIAGEN). Colocar en tubos de 1.5 ml (Scientific Specialties, Inc.) agitar en vortex a máxima potencia por 30 s cada muestra, para asegurar la lisis completa del tejido. Centrifugar el lisado por 3 min a máxima velocidad utilizando una minicentrífuga (Eppendorf 5415 C) a temperatura ambiente. Cuidadosamente recuperar el sobrenadante con una micropipeta y colocarlo en un tubo nuevo.
2. Agregar 1 volumen de etanol 70% al lisado, mezclar con la micropipeta. No centrifugar.
3. Transferir ≥ 700 µl de la muestra, incluyendo cualquier precipitado, a una columna RNeasy Mini Spin situada en un tubo colector (ya suministrado). Cerrar la tapa y centrifugar por 15 s a ≥ 8000 x g. Descartar el flujo.
4. Anadir 700 µl de buffer RW1 a la columna. Cerrar la tapa y centrifugar por 15 s a ≥ 8000 x g. Descartar el flujo.
5. Anadir 500 µl de buffer RPE a la columna. Cerrar la tapa y centrifugar por 15 s a ≥ 8000 x g. Descartar el flujo.
6. Anadir 500 µl de buffer RPE a la columna. Cerrar la tapa y centrifugar por 15 s a ≥ 8000 x g. Descartar el flujo.
 - a. Opcional: Colocar la columna RNeasy Mini Spin en un nuevo tubo colector de 2 ml (ya suministrado). Centrifugar a máxima velocidad por 1 min para secar la membrana.
7. Colocar la columna RNeasy Mini Spin en un nuevo tubo colector de 1.5 ml (ya suministrado). Agregar de 30 a 50 µl de agua libre de ARNsas directamente a la membrana de la columna. Cerrar la tapa y centrifugar por 1 min a ≥ 8000 x g para eluir el ARN.
8. Si el rendimiento de ARN esperado es > 30 µg, repetir el paso 7 utilizando de 30 a 50 µl de agua libre de ARNsas, o el eluato del paso anterior (si se requiere una concentración mayor de ARN). Reutilice el tubo colector del paso 7.

Anexo IV. Protocolo de microarreglos de expresión un color.

4.1 Preparación de Spike-In un color Cy3.

1. Mezclar vigorosamente el Spike mix en vortex.
2. Calentar ambos a 37°C por 5min y agitar en vortex.
3. Recolectar los componentes de los tubos mediante centrifugación (spin).
4. Realizar 4 diluciones seriadas del Spike mix (1:20, 1:25, 1:20, 1:2) a partir de 50ng de ARN.
5. Almacenar a -80°C.

4.2 Preparación de la reacción de marcaje.

1. Añadir 50ng de ARN total de cada muestra a un tubo estéril de 0.2µL, en un volumen final de 1.5µL.
2. Añadir a cada tubo 2µL de la última dilución del Spike mix (Cy3).
3. Preparar una mezcla para 8.5 reacciones de primer T7 de la siguiente forma:

Tabla 5. Componentes de mix T7.

<i>Componente</i>	<i>Volumen a utilizar por reacción (µL)</i>
T7 primer	0.8
Agua libre de nucleasas	1

4. Añadir 1.8µL de la mezcla de primer T7 a cada tubo.
5. Incubar a 65°C en termociclador, por 10min.
6. Incubar en hielo por 5min.
7. Precalentar el buffer 5x First Strand a 80°C por 3-4min.
8. Preparar la mezcla para ADNc de la forma correspondiente:

Tabla 6. Componentes para retrotranscripción para ADNc.

<i>Componente</i>	<i>Volumen a utilizar por reacción (µL)</i>
Buffer 5x First Strand	2
DTT 0.1M	1
Mezcla de dNTP's 10mM	0.5
Affinity Script RNase	1.2

9. Añadir 4.7µL de la mezcla para ADNc a cada muestra, mezclando por pipeteo.
10. Incubar a 40°C por 2 horas.
11. Incubar a 70°C por 15min.
12. Incubar en hielo por 5min.
13. Preparar la mezcla para transcripción de la siguiente forma:

Tabla 7. Componentes para retrotranscripción para ARNc.

<i>Componente</i>	<i>Volumen a utilizar por reacción (µL)</i>
Agua libre de nucleasas	0.75
Buffer de transcripción 5x	3.2
DTT 0.1M	0.6
Mezcla de NTP's	1
T7 RNA Polymerase Blend	0.21
Cy3	0.24

14. Añadir 6µL de mezcla para transcripción a cada tubo, dependiendo si las muestras serán marcadas con Cy3 o Cy5, mezclando gentilmente por pipeteo.
15. Incubar las muestras a 40°C por 2h.

4.3 Purificación del ARN amplificado y marcado.

1. Añadir 84µL de agua libre de nucleasas a cada muestra.
2. Añadir 350µL de buffer RLT y mezclar bien.
3. Añadir 250µL de etanol absoluto y mezclar por pipeteo.
4. Transferir 700µL de la muestra a una columna del kit RNeasy mini en tubo de colección, y centrifugar a 13,000rpm por 30s, a 4°C. Desechar el flujo y el tubo colector.

5. Transferir la columna a un nuevo tubo colector y añadir 500µL de buffer RPE a la columna. Centrifugar a 13,000rpm por 30s, a 4°C. Desechar el flujo y reutilizar el tubo colector.
6. Añadir otros 500µL de buffer RPE y centrifugar a 13,000rpm por 60s, a 4°C. Desechar el flujo.
7. Transferir la columna a un nuevo tubo colector y centrifugar a 13,000rpm por 30s, a 4°C. Descartar el flujo y el tubo de colección.
8. Colocar la columna en un tubo de recolección y eluir el ARNc añadiendo 30µL de agua libre de nucleasas directamente a la membrana de la columna, incubando 1min, y centrifugando a 13,000rpm por 30s, a 4°C

4.4 Cuantificación del ARNc.

1. Blanquear el Nanodrop con agua libre de nucleasas y cuantificar todas las muestras procesadas.
2. Determinar el rendimiento y la actividad específica mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Rendimiento } (\mu\text{g}) = \frac{(\text{Concentración de ARNc}) \times 30}{1000}$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{(\text{Concentración de Cy3 o 5}) \times 1000}{\text{Concentración de ARNc}}$$

3. Comparar el rendimiento y actividad específicas contra lo recomendado (Rendimiento ≥ 0.825 , Actividad específica ≥ 6), y no proceder si no se cumplen estos parámetros.

4.5 Hibridación de las muestras.

1. En 8 tubos de 0.2µL, añadir los siguientes reactivos, conjuntando cada muestra marcada con un colorante contra el control teñido con el colorante contrario:

Tabla 8. Mix para hibridación en el microarreglo.

<i>Componente</i>	<i>Volumen a utilizar (μL)</i>
ARNc marcado con Cy3	Equiv. 300ng
ARNc marcado con Cy5	Equiv. 300ng
Agente de bloqueo de expresión 10x	5
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 24
Buffer de fragmentación 25x	1μL

2. Incubar a 60°C por 30min para fragmentar el ARNc.
3. Enfriar inmediatamente en hielo por 1min.
4. Añadir 25μL de buffer de hibridación Hi-RPM 2x para detener la fragmentación.
5. Mezclar cuidadosamente por pipeteo, evitando la formación de burbujas.
6. Centrifugar por 1min a temperatura ambiente a 13,000rpm e hibridar 40μL en el microarreglo lo antes posible. Hibridar a 65°C por 17h, en horno rotatorio.

4.6 Lavado del microarreglo.

1. Precalentar previamente el buffer 2 toda la noche a 37°C.
2. Sumergir el microarreglo en el buffer 1, y realizar la separación del gasket.
3. Sumergir el microarreglo en otro recipiente con buffer 1, con agitación, por 1min.
4. Sumergir el microarreglo en el recipiente con el buffer 2 precalentado, con agitación, por 1min.
5. Colocar el microarreglo en un holder y realizar el escaneo lo antes posible.

Anexo V. Validación de un posible biomarcador en CaMa.

5.1 Diseño de primers

Para el diseño de primers del ARN-lnc primeramente se buscó si este ya se encontraba reportado por algún grupo de investigación que lo relacionara con el CaMa. De nuestra búsqueda no se encontró una asociación de este con la enfermedad, sin embargo existe amplia información del papel que tienen los ARN no codificantes en el desarrollo y progresión del CaMa, así como estudios de estos. Lo anterior nos dio pie a decidir validar mediante qPCR este gen para posteriormente estudiar si existe alguna asociación con el CaMa en nuestra población de estudio.

La secuencia y características del lnc-ERP44-3 se obtuvieron de la plataforma LNCipedia 4.0 (Tabla 12), la cual es una base de datos que contiene más de 100,000 ARN largos no codificantes humanos.

Tabla 9. Características del transcrito del ARN-lnc (LNCipedia 4.0).

<i>ID del transcrito</i>	<i>ID del gen</i>	<i>Localización (hg19)</i>	<i>Tamaño del transcrito</i>
lnc-ERP44-3:6	lnc-ERP44-3	chr9:102347606-102535894	1917

A partir de la secuencia del lnc-ERP44-3 obtenida de la base de datos LNCipedia y con ayuda del programa Oligo 7 se diseñaron los primers cumpliendo con las características básicas para su uso. Con una Tm de 58.3 °C y que amplifiquen un fragmento de 111 pb. A continuación se muestran los datos y secuencias de los primers diseñados para este blanco (Tabla 13).

Tabla 10. Características de los primers a utilizar dirigidos a amplificar *Inc-ERP44-3*.

<i>Primers Inc-ERP44-3</i>			
<i>Primer forward</i>		<i>Primer reverse</i>	
5' – CAG CAC ATA AGG CAA GTA CCA T – 3'		5' – AGG AAA ACC CTA CTC TCA AGG C – 3'	
Longitud	22 nucleótidos	Longitud	22 nucleótidos
Posición 5'	733	Posición 3'	833
Tm	57.7°C	Tm	58.9°C
Tamaño del fragmento amplificado		111 pb	

No forman horquillas y las ΔG poseen valores que no interfieren significativamente con la formación de dúplex.

Retrotranscripción

1. En un tubo de 0.2ml añadir 200 ng de ADNc, 250 ng de random primers, 1 μ l de mix de dNTP (10mM), aforar a 13 μ l.
2. Incubar a 65°C por 5 minutos y posteriormente en hielo al menos por 1 minuto.
3. Colectar los componentes del tubo mediante centrifugación y añadir 4 μ l de buffer 5X first strand, 1 μ l de DTT (0.01M), 1 μ l de RNaseOUT™ (si utiliza menos de 50 ng iniciales) y 1 μ l de SuperScript™ III RT (200 unidades/ μ l).
4. Mezclar por pipeteo gentilmente e incubar a 25°C por 5 minutos.
5. Incubar a 50°C por 60 minutos.
6. Inactivar la reacción a 70°C por 15 minutos.

5.2 PCR punto final en gradiente de temperatura.

Para comprobar la correcta hibridación y amplificación de los primers con el ADNc obtenido, se realizó un ensayo de PCR punto final con gradiente de temperatura en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies). Para la reacción de PCR punto final se utilizaron las concentraciones finales de reactivos recomendadas por el fabricante Promega, a un volumen final de 25 μ L (Tabla 10).

Tabla 11. Concentraciones de reactivos que se utilizaron para la PCR punto final.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
Primer F (10µM)	1 µl
Primer R (10µM)	1 µl
ADNc (Equiv. 100ng)	1 µl
Master Mix GoTaq®	12.5 µl
Agua	9.5 µl

Las temperaturas en gradiente utilizadas correspondieron a: 55°C, 57°C, 59°C y 60°C. Se utilizó el siguiente programa de temperaturas para determinar la Tm ideal de alineamiento de los primers:

Tabla 12. Pasos de temperatura para PCR punto final.

	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	3min
2	Desnaturalización	94°C	30s
3	Alineamiento	60°C	45s
4	Extensión	72°C	60s
	Repetir del paso 2 al paso 4, 40 veces.		
5	Extensión final	72°C	10min

Una vez terminados los ciclos de amplificación se realizó una electroforesis, los productos se cargaron en un gel de agarosa al 1% en la cámara de electroforesis y se corrieron a 90V, por aproximadamente 90min, con su respectivo marcador de peso molecular de 100pb a 1500pb (Invitrogen) para comprobar que el tamaño del fragmento amplificado por los primers fuera el deseado. Se observó que la temperatura de 60°C era adecuada para la amplificación de la región de interés.

5.3 qPCR

Los primers que se utilizaron para el ARN-lnc fueron los mismos con los que se realizó la PCR punto final y se optó por seleccionar como gen endógeno GAPDH (Integrated DNA

Technologies) que hibrida en el exón 1 del ARNm de GAPDH de humano de acuerdo con la secuencia de referencia NM_001289746.1 (NCBI) que amplifica un fragmento de 532pb.

Tabla 13. Características de los primers a utilizar dirigidos a amplificar *GAPDH*.

<i>Primers GAPDH</i>			
<i>Primer forward</i>		<i>Primer reverse</i>	
5' – AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG – 3'		5' – GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT – 3'	
Longitud	21 nucleótidos	Longitud	20 nucleótidos
Tm	58.3°C	Tm	58.2°C
Tamaño del fragmento amplificado		532 pb	

Se utilizó el equipo 7500 Fast (Applied Biosystems) para la amplificación, efectuando las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 14. Concentraciones de reactivos a utilizar para la qPCR.

<i>Reactivo</i>	<i>Cantidad</i>
SYBR GreenER 2x	10 µl
Primer Forward 10 µM	1 µl
Primer Reverse 10 µM	1 µl
ADNc	Equiv. 100 ng
Agua	c.b.p. 20 µl

Se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura:

Tabla 15. Pasos de temperatura utilizados para la qPCR.

<i>Paso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1 Activación de la Taq	50°C	2 min
2 Desnaturalización inicial	95°C	10 min
3 Desnaturalización	95°C	15 s
4 Extensión	60°C Teórico	60 s

Repetir del paso 2 al paso 4, 40 veces.

Se optó por establecer el umbral (threshold) determinado por el propio software de manera automática. La eficiencia de los primers se determinó graficando la curva de calibración de Ct vs Log10 [ADNc] y se obtuvo la ecuación de la recta de la cual se utilizó la pendiente posteriormente para determinar la eficiencia con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{-\frac{1}{m}}$$

Se realizó la curva estándar con la finalidad de determinar la concentración de ADN óptima para la amplificación y la eficiencia de amplificación a partir de un pool de muestras correspondientes a tejido sano y otro pool de tumor a diferentes cantidades del ADNc, abarcando concentraciones de 1000ng, 200ng, 40ng, 8ng y 1.6ng, de *GAPDH* (Figura 34) y de *IncERP44* (Figura 35), para poder determinar la eficiencia de amplificación de los primers, así como la concentración de ADNc a usar para la determinación de la expresión diferencial.

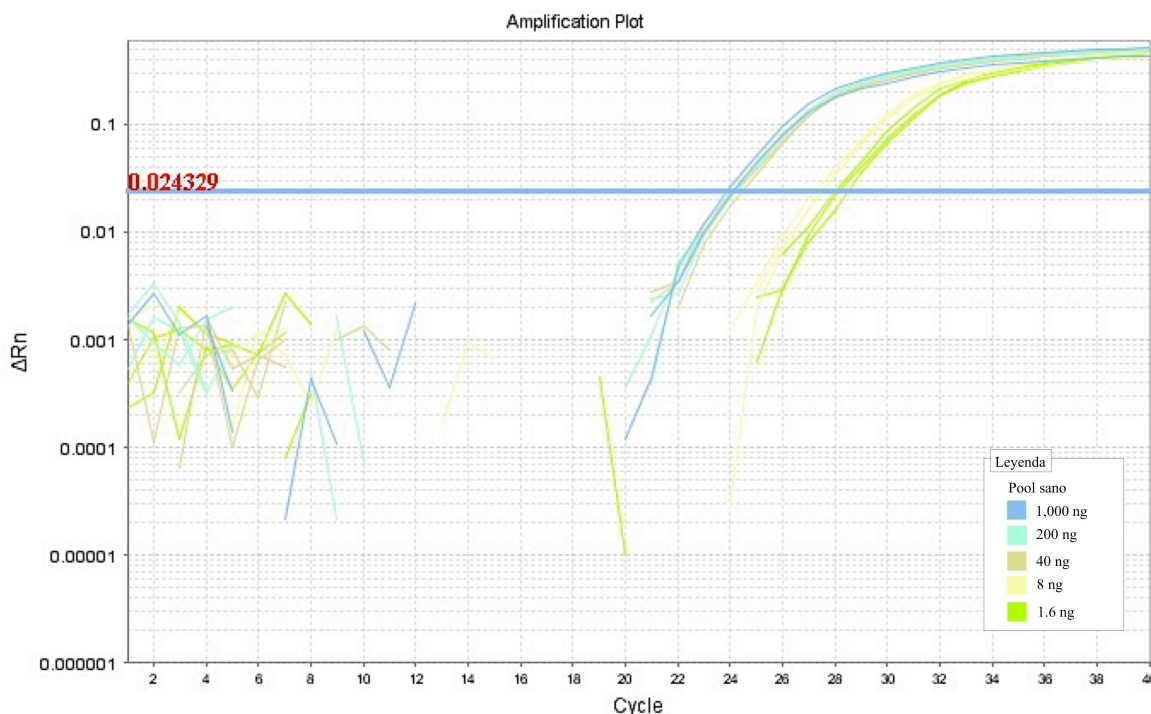


Figura 34. Curva estándar de concentraciones de ADNc para *GAPDH* (Concentraciones 1000ng, 200ng, 40ng, 8ng y 1.6ng).

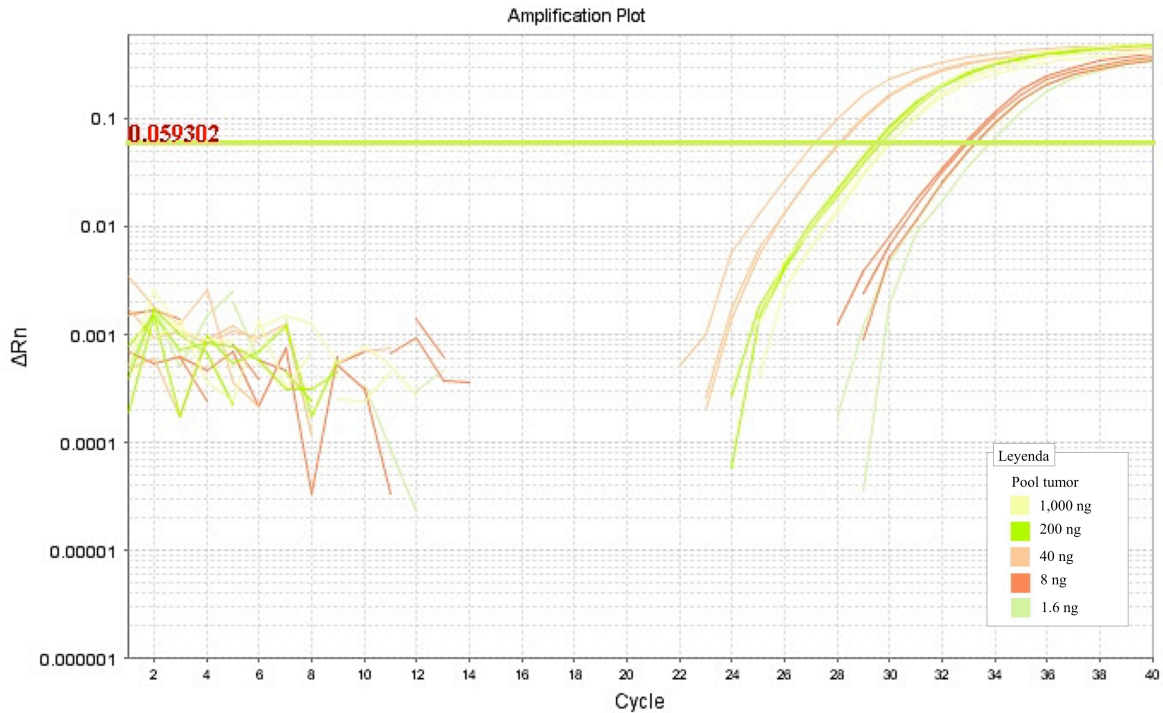


Figura 35. Curva estándar de concentraciones de ADNc para *lncERP44* (Concentraciones 1000ng, 200ng, 40ng, 8ng y 1.6ng).

Para el análisis de expresión diferencial entre tejido sano adyacente y tumoral, se ajustaron todas las concentraciones a la misma relación y que se añadieran 200ng a cada reacción de qPCR. Obteniendo las curvas estándar de *GAPDH* y *lncERP44*, se determinó la eficiencia de amplificación de los primers, siendo ésta de 2.0 para el par de primers que amplifican *lncERP44* y 1.9 para el par de primers que amplifica el gen endógeno *GAPDH*.

Obtenida la eficiencia de los primers, conforme a la curva estándar, se determinó utilizar 200 ng de cada muestra de ADNc para las pruebas de expresión diferencial. Además de esto, se observó la curva de fusión de *lncERP44* y *GAPDH* (Figura 36) y no se encontraron amplificaciones inespecíficas, ni dímeros de primers, por lo que se puede asegurar que los resultados obtenidos dependen solo de la amplificación de *lncERP44*.

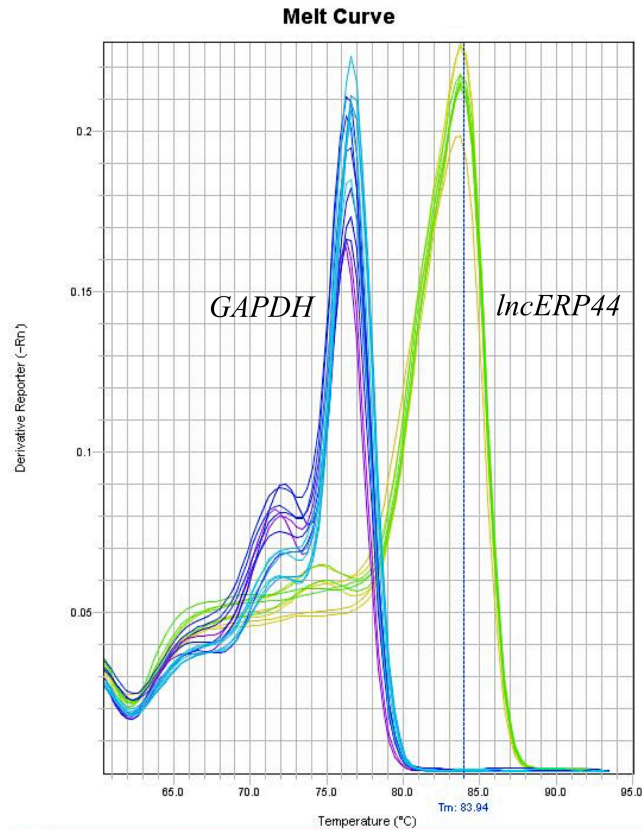


Figura 36. Curva de fusión de *GAPDH* y *lncERP44*.

Una vez verificada la correcta amplificación de los primers y la cantidad de muestra a utilizar, se procedió al análisis de la expresión diferencial de *lncERP44* y el gen endógeno *GAPDH*, en las muestras de tejido sano adyacente y tumoral.

Se utilizó el método de cuantificación relativa o $\Delta\Delta CT$ para determinar el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen en una muestra de referencia para comparar niveles de expresión de un gen en diferentes tejidos. Se realizó el ensayo de qPCR en 38 muestras de CaMa por triplicado utilizando *GAPDH* como gen endógeno. Se analizaron los resultados e identificaron aquellas muestras que se encontraron diferencialmente expresadas en tejido tumoral vs su expresión en tejido sano adyacente.

Anexo VI. Datos clínicos

Tabla 16. Clasificación histopatológica de las pacientes participes en el estudio de expresión génica.

<i>Paciente</i>	<i>Hospital</i>	<i>Estadio</i>	<i>Inmunohistoquímica</i>	<i>Tipo histológico de Ca</i>
LCM34	HU	N.D.	RE +	ACDI
LCM49	HU	IIIB	RE -, PR -, HER2+	ACDI
LCM51	HM	IIA	ER+, EP+, HER ++	ACDI
LCM55	HU	N.D.	N.D.	N.D.
LCM57	HU	IIIB	RE -, PR+, HER2 +++	ACDI
LCM61	HM	IIA	N.D.	ACDI
LCM64	HU	N.D.	RE +, PR+, HER2 -	ACDI
LCM65	HM	IIB	RE +	ACDI
LCM67	HM	N.D.	N.D.	ACDI
LCM76	HM	N.D.	RE +, RP +, HER2 -	ACDI
LCM77	HM	N.D.	RE -, RP +, HER2 +++	CID
LCM78	HM	N.D.	N.D.	N.D.

5.1 Historia clínica

A continuación se brinda una breve historia clínica de las 12 pacientes que participaron en el estudio de expresión génica. Se destacan antecedentes heredo-familiares, antecedentes personales patológicos, antecedentes personales no patológicos, antecedentes gineco-obstétricos, padecimiento actual y reporte patológico.

Tabla 17. Fichas de identificación de las 12 pacientes que participaron en el estudio de expresión génica.

<i>Ficha de identificación</i>			
Nombre: LCM34			
Sexo: Femenino	Edad: 76 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Diabetes mellitus tipo II			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 14 años	Menopausia: 45 años	Primer embarazo: 18 años	Gestas: 4
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenina con antecedente dx de CaMa post operada de mastectomía radical exitosa el 28/septiembre/2017. El reporte de patología reporta inmunohistoquímica con las siguientes características (RE +) actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica: Adenocarcinoma ductal infiltrante		Inmunohistoquímica: RE +	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM49			
Sexo: Femenino	Edad: 46 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Ninguno			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 10 años	Menopausia: no	Primer embarazo: 20 años	Gestas: 3
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada de mastectomía radical exitosa el 18/marzo/2016. El reporte de patología reporta inmunohistoquímica con las siguientes características (ER- PR- HER2 +) actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica: Adenocarcinoma ductal infiltrante		Estadio: IIB Inmunohistoquímica: ER- PR- HER2 +	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM51			
Sexo: Femenino	Edad: 42 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Ninguno			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 15 años	Menopausia: no	Primer embarazo: no	Gestas: 0
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada de mastectomía radial exitosa el 16/marzo/2016. El reporte de patología reporta inmunohistoquímica con las siguientes características (ER +, Her2 +++) actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica: Adenocarcinoma ductal infiltrante		Estadio: IIA Inmunohistoquímica: ER +, Her2 +++	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM55			
Sexo: Femenino	Edad: N.D.	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: N.D.			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
N.D.			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: N.D.	Tabaquismo: N.D.	Drogadicción: N.D.	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: N.D.	Menopausia: N.D.	Primer embarazo: N.D.	Gestas: N.D.
<i>Padecimiento actual</i>			
N.D.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica:		Inmunohistoquímica: N.D.	
N.D.			

Ficha de identificación			
Nombre: LCM57			
Sexo: Femenino	Edad: 78 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Ninguno			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 13 años	Menopausia: 46 años	Primer embarazo: N.D.	Gestas: 4
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada de mastectomía radical exitosa el 19/abril/2016. El reporte de patología reporta inmunohistoquímica con las siguientes características (RE - RP + HER2 +++) actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica:		Estadio: IIIB	
Adenocarcinoma ductal infiltrante		Inmunohistoquímica: RE - RP + HER2 +++	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM61			
Sexo: Femenino	Edad: 53 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Universitario “Dr. Bernardo Sepúlveda”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Negados			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 16 años	Menopausia: 42 años	Primer embarazo: N.D.	Gestas: N.D.
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente dx de CaMa post operada exitosamente. Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada de mastectomía radical exitosa el 3/mayo/2016. Actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica: Adenocarcinoma ductal infiltrante		Estadio: IIA Inmunohistoquímica: N.D.	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM64			
Sexo: Femenino	Edad: 56 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Hipertensión arterial			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 16 años	Menopausia: 52 años	Primer embarazo: N.D.	Gestas: 3
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada de mastectomía simple exitosa el 3/mayo/2016. El reporte de patología reporta inmunohistoquímica con las siguientes características (RE + PR+ HER2-) actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica: Adenocarcinoma ductal infiltrante		Estadio: N.D. Inmunohistoquímica: RE + PR+ HER2-	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM65			
Sexo: Femenino	Edad: 61 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Ninguno			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 14 años	Menopausia: 55 años	Primer embarazo: 34 años	Gestas: N.D.
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada exitosamente el 25/abril/2016. El reporte de patología reporta inmunohistoquímica con las siguientes características (RE +) actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica:		Estadio: IIB	
Adenocarcinoma ductal infiltrante		Inmunohistoquímica: RE +	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM67			
Sexo: Femenino	Edad: N.D.	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Ninguno			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: N.D.	Tabaquismo: N.D.	Drogadicción: N.D.	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: N.D.	Menopausia: N.D.	Primer embarazo: N.D.	Gestas: N.D.
<i>Padecimiento actual</i>			
N.D.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica:		Inmunohistoquímica: N.D.	
N.D.			

Ficha de identificación			
Nombre: LCM76			
Sexo: Femenino	Edad: 63 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Ninguno			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 15 años	Menopausia: 45 años	Primer embarazo: N.D.	Gestas: N.D.
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada de mastectomía y ganglio centinela exitosa el 20/junio/2016. Actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica: Adenocarcinoma ductal infiltrante		Inmunohistoquímica: N.D.	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM77			
Sexo: Femenino	Edad: 47 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Diabetes mellitus tipo II			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 13 años	Menopausia: 40 años	Primer embarazo: 22 años	Gestas: 3
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada exitosamente el 27/junio/2016. Actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica: Adenocarcinoma ductal infiltrante		Inmunohistoquímica: N.D.	

Ficha de identificación			
Nombre: LCM78			
Sexo: Femenino	Edad: 45 años	Nacionalidad: Mexicana	
Adscripción: Hospital Metropolitano “Dr. Bernardo Sepúlveda”			
<i>Antecedentes heredo-familiares</i>			
Crónico degenerativos: ninguno			
<i>Antecedentes personales patológicos</i>			
Ninguno			
<i>Antecedentes personales no patológicos</i>			
Alcoholismo: negado	Tabaquismo: negado	Drogadicción: negado	
<i>Antecedentes gineco-obstétricos</i>			
Menarca: 13 años	Menopausia: no	Primer embarazo: 22 años	Gestas: 3
<i>Padecimiento actual</i>			
Paciente femenino con antecedente diagnóstico de CaMa post operada de lumpectomía exitosa el 8/julio/2016. Actualmente se encuentra bajo seguimiento sin datos de recaída.			
<i>Reporte patológico</i>			
Clasificación histológica:		Inmunohistoquímica: N.D.	
Adenocarcinoma ductal infiltrante			

Anexo VII. Microarreglo de CGH.

6.1 Comparación de tejido sano adyacente vs tejido tumoral.

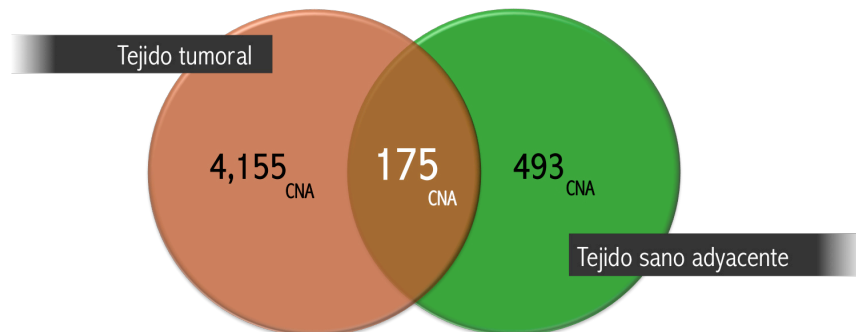


Figura 8. Diagrama de Venn del número de CNA identificadas en tejido tumoral vs tejido sano adyacente y el número de alteraciones que comparten ambos.

Se identificaron 4,155 genes con CNA en tejido tumoral, 493 genes con CNA en tejido sano adyacente y compartían 175 genes con CNA. Estos 175 genes corresponden solamente al 4% de las alteraciones identificadas en tejido tumoral, a continuación se enlistan y se brinda una breve descripción de los genes identificados (Tabla 15).

Tabla 18. Genes de CNA compartidos en tejido tumoral y sano adyacente.

No.	Gen	Descripción
1.	ADAM3A	ADAM metallopeptidase domain 3A (pseudogene)
2.	ADAM5	ADAM metallopeptidase domain 5, pseudogene
3.	ADAM6	ADAM metallopeptidase domain 6, pseudogene
4.	ARHGEF1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
5.	BIN1	bridging integrator 1
6.	CIITA	class II, major histocompatibility complex, transactivator
7.	COL1A1	collagen, type I, alpha 1
8.	CTDP1	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) phosphatase, subunit 1
9.	CTTN	cortactin
10.	ELK2AP	ELK2A, member of ETS oncogene family, pseudogene
11.	ELN	elastin
12.	ERCC2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
13.	GOLGA4P1	golgin A4 pseudogene 1
14.	GOLGA4P2	golgin A4 pseudogene 2
15.	GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide
16.	GTPBP6	GTP binding protein 6 (putative)
17.	HNF1A	HNF1 homeobox A
18.	HOMER2P1	homer homolog 2 (Drosophila) pseudogene 1
19.	HOMER2P2	homer homolog 2 (Drosophila) pseudogene 2
20.	IGHA1	immunoglobulin heavy constant alpha 1
21.	IGHD1-1	immunoglobulin heavy diversity 1-1
22.	IGHD1-14	immunoglobulin heavy diversity 1-14 (non-functional)
23.	IGHD1-20	immunoglobulin heavy diversity 1-20
24.	IGHD1-7	immunoglobulin heavy diversity 1-7
25.	IGHD2-15	immunoglobulin heavy diversity 2-15
26.	IGHD2-2	immunoglobulin heavy diversity 2-2
27.	IGHD2-21	immunoglobulin heavy diversity 2-21

28.	IGHD2-8	immunoglobulin heavy diversity 2-8
29.	IGHD3-10	immunoglobulin heavy diversity 3-10
30.	IGHD3-16	immunoglobulin heavy diversity 3-16
31.	IGHD3-22	immunoglobulin heavy diversity 3-22
32.	IGHD3-3	immunoglobulin heavy diversity 3-3
33.	IGHD3-9	immunoglobulin heavy diversity 3-9
34.	IGHD4-11	immunoglobulin heavy diversity 4-11 (non-functional)
35.	IGHD4-17	immunoglobulin heavy diversity 4-17
36.	IGHD4-4	immunoglobulin heavy diversity 4-4
37.	IGHD5-12	immunoglobulin heavy diversity 5-12
38.	IGHD5-18	immunoglobulin heavy diversity 5-18
39.	IGHD5-5	immunoglobulin heavy diversity 5-5
40.	IGHD6-13	immunoglobulin heavy diversity 6-13
41.	IGHD6-19	immunoglobulin heavy diversity 6-19
42.	IGHD6-6	immunoglobulin heavy diversity 6-6
43.	IGHEP1	immunoglobulin heavy constant epsilon P1 (pseudogene)
44.	IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
45.	IGHG2	immunoglobulin heavy constant gamma 2 (G2m marker)
46.	IGHG3	immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker)
47.	IGHG4	immunoglobulin heavy constant gamma 4 (G4m marker)
48.	IGHGP	immunoglobulin heavy constant gamma P (non-functional)
49.	IGHV1-18	immunoglobulin heavy variable 1-18
50.	IGHV1-2	immunoglobulin heavy variable 1-2
51.	IGHV1-24	immunoglobulin heavy variable 1-24
52.	IGHV1-8	immunoglobulin heavy variable 1-8
53.	IGHV2-26	immunoglobulin heavy variable 2-26
54.	IGHV3-19	immunoglobulin heavy variable 3-19 (pseudogene)
55.	IGHV3-20	immunoglobulin heavy variable 3-20
56.	IGHV3-21	immunoglobulin heavy variable 3-21
57.	IGHV3-22	immunoglobulin heavy variable 3-22 (pseudogene)
58.	IGHV3-23	immunoglobulin heavy variable 3-23
59.	IGHV3-25	immunoglobulin heavy variable 3-25 (pseudogene)
60.	IGHV3-29	immunoglobulin heavy variable 3-29 (pseudogene)
61.	IGHV3-30	immunoglobulin heavy variable 3-30
62.	IGHV3-30-2	immunoglobulin heavy variable 3-30-2 (pseudogene)
63.	IGHV3-32	immunoglobulin heavy variable 3-32 (pseudogene)
64.	IGHV3-33	immunoglobulin heavy variable 3-33
65.	IGHV3-33-2	immunoglobulin heavy variable 3-33-2 (pseudogene)
66.	IGHV3-35	immunoglobulin heavy variable 3-35 (non-functional)
67.	IGHV3-36	immunoglobulin heavy variable 3-36 (pseudogene)
68.	IGHV3-37	immunoglobulin heavy variable 3-37 (pseudogene)
69.	IGHV3-38	immunoglobulin heavy variable 3-38 (non-functional)
70.	IGHV3-41	immunoglobulin heavy variable 3-41 (pseudogene)
71.	IGHV3-42	immunoglobulin heavy variable 3-42 (pseudogene)
72.	IGHV3-43	immunoglobulin heavy variable 3-43
73.	IGHV3-7	immunoglobulin heavy variable 3-7
74.	IGHV4-28	immunoglobulin heavy variable 4-28
75.	IGHV4-31	immunoglobulin heavy variable 4-31
76.	IGHV4-34	immunoglobulin heavy variable 4-34
77.	IGHV4-39	immunoglobulin heavy variable 4-39
78.	IGHV7-27	immunoglobulin heavy variable 7-27 (pseudogene)
79.	IGHV7-34-1	immunoglobulin heavy variable 7-34-1 (pseudogene)
80.	IGHV7-40	immunoglobulin heavy variable 7-40 (pseudogene)
81.	IGHVII-1-1	immunoglobulin heavy variable (II)-1-1 (pseudogene)
82.	IGHVII-20-1	immunoglobulin heavy variable (II)-20-1 (pseudogene)
83.	IGHVII-22-1	immunoglobulin heavy variable (II)-22-1 (pseudogene)
84.	IGHVII-26-2	immunoglobulin heavy variable (II)-26-2 (pseudogene)
85.	IGHVII-28-1	immunoglobulin heavy variable (II)-28-1 (pseudogene)
86.	IGHVII-30-1	immunoglobulin heavy variable (II)-30-1 (pseudogene)
87.	IGHVII-31-1	immunoglobulin heavy variable (II)-31-1 (pseudogene)
88.	IGHVII-33-1	immunoglobulin heavy variable (II)-33-1 (pseudogene)
89.	IGHVII-40-1	immunoglobulin heavy variable (II)-40-1 (pseudogene)
90.	IGHVII-43-1	immunoglobulin heavy variable (II)-43-1 (pseudogene)
91.	IGHVIII-2-1	immunoglobulin heavy variable (III)-2-1 (pseudogene)
92.	IGHVIII-22-2	immunoglobulin heavy variable (III)-22-2 (pseudogene)
93.	IGHVIII-25-1	immunoglobulin heavy variable (III)-25-1 (pseudogene)
94.	IGHVIII-26-1	immunoglobulin heavy variable (III)-26-1 (pseudogene)

95.	IGHVIII-38-1	immunoglobulin heavy variable (III)-38-1 (pseudogene)
96.	IGHVIII-44	immunoglobulin heavy variable (III)-44 (pseudogene)
97.	IGK	immunoglobulin kappa locus
98.	IGKC	immunoglobulin kappa constant
99.	IGKJ1	immunoglobulin kappa joining 1
100.	IGKJ2	immunoglobulin kappa joining 2
101.	IGKJ3	immunoglobulin kappa joining 3
102.	IGKJ4	immunoglobulin kappa joining 4
103.	IGKJ5	immunoglobulin kappa joining 5
104.	IGKV1-5	immunoglobulin kappa variable 1-5
105.	IGKV1-6	immunoglobulin kappa variable 1-6
106.	IGKV1-8	immunoglobulin kappa variable 1-8
107.	IGKV2-4	immunoglobulin kappa variable 2-4 (pseudogene)
108.	IGKV3-7	immunoglobulin kappa variable 3-7 (non-functional)
109.	IGKV4-1	immunoglobulin kappa variable 4-1
110.	IGKV5-2	immunoglobulin kappa variable 5-2
111.	IGKV7-3	immunoglobulin kappa variable 7-3 (pseudogene)
112.	IGL	immunoglobulin lambda locus
113.	IGLC1	immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker)
114.	IGLC2	immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker)
115.	IGLJ1	immunoglobulin lambda joining 1
116.	IGLJ2	immunoglobulin lambda joining 2
117.	IGLL5	immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
118.	IGLV2-11	immunoglobulin lambda variable 2-11
119.	IGLV2-14	immunoglobulin lambda variable 2-14
120.	IGLV2-18	immunoglobulin lambda variable 2-18
121.	IGLV2-5	immunoglobulin lambda variable 2-5 (pseudogene)
122.	IGLV2-8	immunoglobulin lambda variable 2-8
123.	IGLV3-1	immunoglobulin lambda variable 3-1
124.	IGLV3-10	immunoglobulin lambda variable 3-10
125.	IGLV3-12	immunoglobulin lambda variable 3-12
126.	IGLV3-13	immunoglobulin lambda variable 3-13 (pseudogene)
127.	IGLV3-15	immunoglobulin lambda variable 3-15 (pseudogene)
128.	IGLV3-16	immunoglobulin lambda variable 3-16
129.	IGLV3-17	immunoglobulin lambda variable 3-17 (pseudogene)
130.	IGLV3-19	immunoglobulin lambda variable 3-19
131.	IGLV3-2	immunoglobulin lambda variable 3-2 (pseudogene)
132.	IGLV3-4	immunoglobulin lambda variable 3-4 (pseudogene)
133.	IGLV3-6	immunoglobulin lambda variable 3-6 (pseudogene)
134.	IGLV3-7	immunoglobulin lambda variable 3-7 (pseudogene)
135.	IGLV3-9	immunoglobulin lambda variable 3-9 (gene/pseudogene)
136.	IGLV4-3	immunoglobulin lambda variable 4-3
137.	IGLVI-20	immunoglobulin lambda variable (I)-20 (pseudogene)
138.	JAK3	Janus kinase 3
139.	KLC3	kinesin light chain 3
140.	LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
141.	LINC00221	long intergenic non-protein coding RNA 221
142.	LINC00226	long intergenic non-protein coding RNA 226
143.	LINC00685	long intergenic non-protein coding RNA 685
144.	LOC100420967	chromosome 2 open reading frame 27B pseudogene
145.	LOC100505585	uncharacterized LOC100505585
146.	LOC100507221	uncharacterized LOC100507221
147.	LOC101927130	uncharacterized LOC101927130
148.	LOC101928457	uncharacterized LOC101928457
149.	LOC390705	protein phosphatase 2, regulatory subunit B", beta pseudogene
150.	LOC390937	Ets2 repressor factor-like
151.	LRRC14	leucine rich repeat containing 14
152.	MFI2	antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5
153.	MFI2-AS1	MFI2 antisense RNA 1
154.	MIR4673	microRNA 4673
155.	MIR650	microRNA 650
156.	MKL1	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1
157.	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
158.	MTCO2P2	MT-CO2 pseudogene 2
159.	NF1	neurofibromin 1
160.	NOTCH1	notch 1
161.	PGBD4P5	piggyBac transposable element derived 4 pseudogene 5

162.	PLCXD1	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1
163.	PPP2R3B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B", beta
164.	PRDM16	PR domain containing 16
165.	RECQL4	RecQ protein-like 4
166.	RNF213	ring finger protein 213
167.	RPS8P1	ribosomal protein S8 pseudogene 1
168.	SEPT5-GP1BB	SEPT5-GP1BB readthrough
169.	SEPT5.	septin 5
170.	SEPT9.	septin 9
171.	SGSM3	small G protein signaling modulator 3
172.	SHOX	short stature homeobox
173.	SLC20A1P2	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1 pseudogene 2
174.	TP53TG3D	TP53 target 3D
175.	TSC2	tuberous sclerosis 2

Anexo VIII. Microarreglos de expresión génica.

8.1 Posicionamiento de muestras

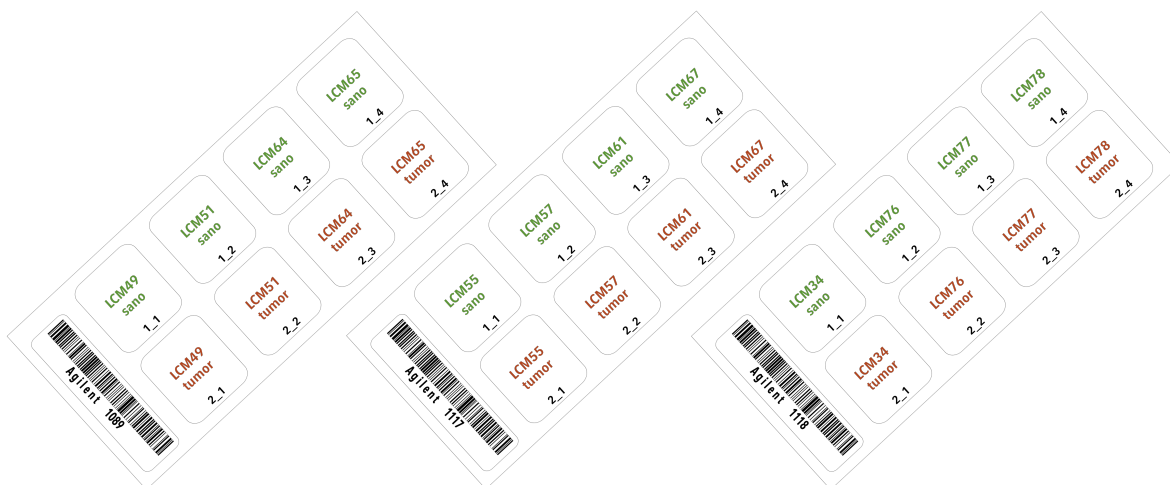


Tabla 19. Distribución de las muestras en los microarreglos de expresión génica SurePrint G3 Human Gene Exp v3, 8x60K un color con su respectivo número de identificación y localización (Agilent Technologies).

8.2 Control de calidad

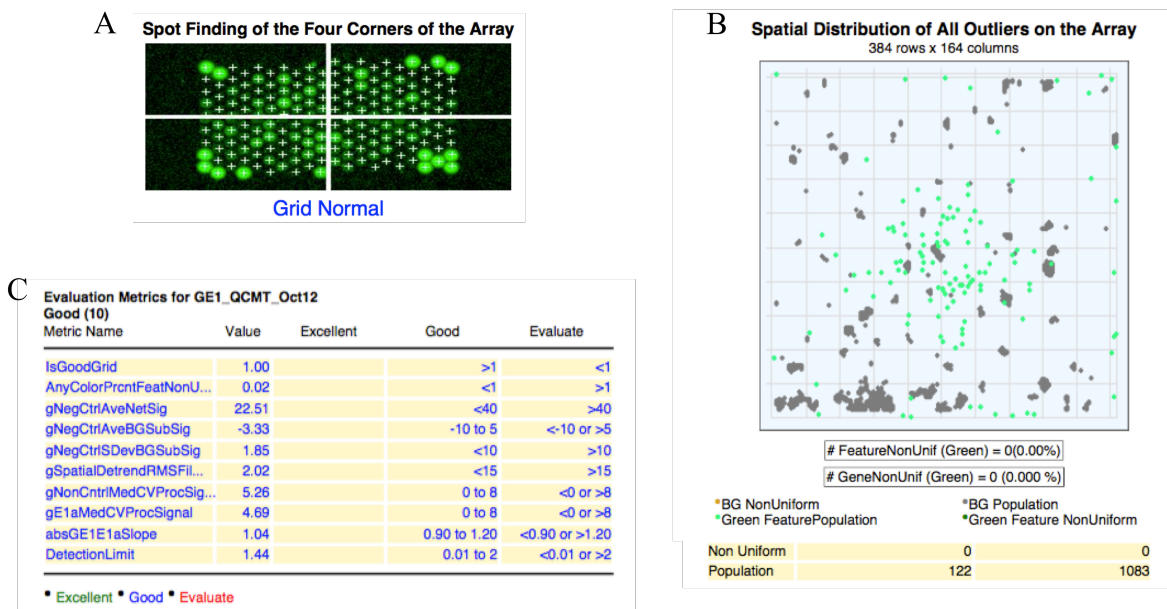


Figura 37. Reporte de control de calidad de microarreglos de expresión génica generado por el software Future Extraction (Agilent Technologies), imagen representativa. (A) Alineamiento y detección de las cuatro esquinas del microarreglo. (B) Distribución espacial de los valores atípicos del microarreglo y estadísticas atípicas. (C) Métricas del control de calidad.

8.3 Análisis de datos

Tabla 20. Genes diferencialmente expresados en tumor respecto al tejido sano adyacente ($p < 0.01$).
 FC: Fold change, Log FC: Logaritmo del fold change, EG: expresión génica, ↑: sobreexpresado,
 ↓: subexpresado.

No.	No. de prueba	FC	Log FC	EG	Gen	Nombre del gen	Cromosoma	Coordenadas cromosómicas	Cito banda
1.	A_23_P1691	45.320	5.502	↑	<i>MMP1</i>	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	chr11	chr11:102660756-102660697	hs 11q22.2
2.	A_23_P214144	29.835	4.899	↑	<i>COL10A1</i>	collagen, type X, alpha 1	chr6	chr6:116441120-116441061	hs 6q22.1
3.	A_24_P810290	24.176	4.596	↑	<i>PPAPDC1A</i>	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A	chr10	chr10:122349102-122349161	hs 10q26.12
4.	A_23_P204947	19.729	4.302	↑	<i>GJB2</i>	gap junction protein, beta 2, 26kDa	chr13	chr13:20761974-20761915	hs 13q12.11
5.	A_33_P3221203	19.724	4.302	↑	<i>MMP13</i>	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	chr11	chr11:102813832-102813773	hs 11q22.2
6.	A_23_P57417	15.944	3.995	↑	<i>MMP11</i>	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	chr22	chr22:24126273-24126332	hs 22q11.23
7.	A_23_P77493	11.658	3.543	↑	<i>TUBB3</i>	tubulin, beta 3 class III	chr16	chr16:90002437-90002496	hs 16q24.3
8.	A_23_P122924	10.062	3.331	↑	<i>INHBA</i>	inhibin, beta A	chr7	chr7:41729305-41729246	hs 7p14.1
9.	A_33_P3276703	10.019	3.325	↑	<i>VGF</i>	VGF nerve growth factor inducible	chr7	chr7:100805858-100805799	hs 7q22.1
10.	A_22_P00016075	9.966	3.317	↑	<i>LOC101929504</i>	uncharacterized LOC101929504	chr6	chr6:169575672-169575613	hs 6q27
11.	A_23_P25030	8.179	3.032	↑	<i>HSD17B6</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6	chr12	chr12:57180933-57180992	hs 12q13.3
12.	A_23_P112859	7.964	2.994	↑	<i>CST1</i>	cystatin SN	chr20	chr20:23731379-23731320	hs 20p11.21
13.	A_21_P0014753	7.506	2.908	↑			chr2	chr2:216226694-216226753	hs 2q35
14.	A_33_P3288159	7.242	2.856	↑	<i>ASPM</i>	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	chr1	chr1:197057458-197057399	hs 1q31.3
15.	A_23_P43164	6.028	2.592	↑	<i>SULF1</i>	sulfatase 1	chr8	chr8:70572195-70572254	hs 8q13.3
16.	A_33_P3382565	6.025	2.591	↑	<i>KIF26B</i>	kinesin family member 26B	chr1	chr1:245865842-245865901	hs 1q44
17.	A_23_P85922	5.141	2.362	↑	<i>BMP8A</i>	bone morphogenetic protein 8a	chr1	chr1:39994944-39995003	hs 1p34.3
18.	A_33_P3267760	4.929	2.301	↑	<i>BCOR</i>	BCL6 corepressor	chrX	chrX:39909128-39909069	hs Xp11.4
19.	A_24_P211565	4.301	2.105	↑	<i>CIQTNF6</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 6	chr22	chr22:37576349-37576290	hs 22q12.3
20.	A_19_P00319917	4.255	2.089	↑	<i>NUP50-AS1</i>	NUP50 antisense RNA 1 (head to head)	chr22	chr22:45529898-45529839	hs 22q13.31
21.	A_21_P0008423	4.124	2.044	↑	<i>lnc-SLC25A21-2</i>	lnc-SLC25A21-2:1	chr14	chr14:38066433-38066374	hs 14q21.1
22.	A_21_P0004807	4.109	2.039	↑	<i>LOC101929484</i>	uncharacterized LOC101929484	chr6	chr6:169558421-169558362	hs 6q27
23.	A_33_P3560679	3.761	1.911	↑			chr16	chr16:88211069-88211010	hs 16q24.2
24.	A_22_P00011004	3.746	1.905	↑			chr16	chr16:26596140-26596081	hs 16p12.1
25.	A_22_P00012133	3.641	1.864	↑	<i>IGFBP7-AS1</i>	IGFBP7 antisense RNA 1	chr4	chr4:58071358-58071417	hs 4q12
26.	A_22_P00010589	3.478	1.798	↑			chr14	chr14:21384984-21384925	hs 14q11.2
27.	A_22_P00003128	3.441	1.783	↑	<i>lnc-C9orf131-1</i>	lnc-C9orf131-1:1	chr9	chr9:35098067-35098126	hs 9p13.3
28.	A_33_P3373991	3.034	1.601	↑			chr2	chr2:233285490-233285431	hs 2q37.1
29.	A_23_P717	2.918	1.545	↑	<i>TMEM206</i>	transmembrane protein 206	chr1	chr1:212538264-212538205	hs 1q32.3
30.	A_21_P0003110	2.880	1.526	↑	<i>lnc-GLB1-1</i>	lnc-GLB1-1:1	chr3	chr3:33002691-33002632	hs 3p22.3
31.	A_23_P12113	2.762	1.466	↑	<i>FLVCRI</i>	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor 1	chr1	chr1:213068636-213068695	hs 1q32.3

No.	No. de prueba	FC	Log FC	EG	Gen	Nombre del gen	Cromosoma	Coordenadas cromosómicas	Cito banda
32.	A_23_P28507	2.761	1.465	↑	<i>MGAT4A</i>	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase isozyme A	chr2	chr2:99242256-99242197	hs 2q11.2
33.	A_23_P169154	2.481	1.311	↑	<i>ERMP1</i>	endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	chr9	chr9:5785753-5785694	hs 9p24.1
34.	A_21_P0011873	2.046	1.033	↑	<i>XLOC_12_007767</i>		chr2	chr2:220362985-220363044	hs 2q35
35.	A_22_P00010200	-2.127	-1.089	↓	<i>LOC101927895</i>	uncharacterized LOC101927895	chr1	chr1:19567119-19567178	hs 1p36.13
36.	A_33_P3375809	-2.396	-1.261	↓	<i>LOC729970</i>	hCG2028352-like	chr1	chr1:95428751-95428810	hs 1p21.3
37.	A_33_P3249364	-2.459	-1.298	↓	<i>TMTC1</i>	transmembrane and tetra-tryptophan repeat containing 1	chr12	chr12:29812873-29812814	hs 12p11.22
38.	A_23_P166	-2.523	-1.335	↓	<i>MOB3C</i>	MOB kinase activator 3C	chr1	chr1:47073825-47073766	hs 1p33
39.	A_23_P127394	-2.541	-1.345	↓	<i>CRY2</i>	cryptochrome circadian clock 2	chr11	chr11:45904680-45904739	hs 11p11.2
40.	A_23_P401547	-2.629	-1.394	↓	<i>PVRL3</i>	poliovirus receptor-related 3	chr3	chr3:110852740-110852799	hs 3q13.13
41.	A_23_P46315	-2.672	-1.418	↓	<i>DENN2C</i>	DENN/MADD domain containing 2C	chr1	chr1:115125613-115125554	hs 1p13.2
42.	A_33_P3268716	-2.788	-1.479	↓	<i>SNX1</i>	sorting nexin 1	chr15	chr15:64436277-64436336	hs 15q22.31
43.	A_33_P3423959	-2.804	-1.487	↓	<i>DBX2</i>	developing brain homeobox 2	chr12	chr12:45408598-45408539	hs 12q12
44.	A_33_P3324980	-2.823	-1.497	↓	<i>ARID5B</i>	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	chr10	chr10:63852693-63852752	hs 10q21.2
45.	A_23_P156907	-3.248	-1.699	↓	<i>SOBP</i>	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)	chr6	chr6:107980433-107980492	hs 6q21
46.	A_33_P3332337	-3.249	-1.700	↓	<i>FOLH1</i>	folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1	chr11	chr11:49204761-49204702	hs 11p11.12
47.	A_23_P88602	-3.252	-1.701	↓	<i>MEIS2</i>	Meis homeobox 2	chr15	chr15:37183612-37183553	hs 15q14
48.	A_21_P0004312	-3.259	-1.705	↓	<i>MIR143HG</i>	MIR143 host gene (non-protein coding)	chr5	chr5:148804865-148804924	hs 5q32
49.	A_23_P39237	-3.351	-1.745	↓	<i>ZFP36</i>	ZFP36 ring finger protein	chr19	chr19:39899758-39899817	hs 19q13.2
50.	A_23_P20743	-3.467	-1.794	↓	<i>TMEM246</i>	transmembrane protein 246	chr9	chr9:104237694-104237635	hs 9q31.1
51.	A_23_P105138	-3.607	-1.851	↓	<i>CAT</i>	catalase	chr11	chr11:34493034-34493093	hs 11p13
52.	A_23_P131990	-3.617	-1.855	↓	<i>VSX1</i>	visual system homeobox 1	chr20	chr20:25057152-25057093	hs 20p11.21
53.	A_33_P3284763	-3.852	-1.945	↓	<i>DMD</i>	dystrophin	chrX	chrX:31152279-31152220	hs Xp21.2
54.	A_33_P3216933	-3.991	-1.997	↓	<i>SIK2</i>	salt-inducible kinase 2	chr11	chr11:111597570-111597629	hs 11q23.1
55.	A_22_P00007468	-4.014	-2.005	↓	<i>RBPMS-AS1</i>	RBPMS antisense RNA 1	chr8	chr8:30239702-30239643	hs 8p12
56.	A_23_P416965	-4.028	-2.010	↓	<i>FAM149A</i>	family with sequence similarity 149, member A	chr4	chr4:187088233-187088379	hs 4q35.1
57.	A_33_P3258467	-4.044	-2.016	↓	<i>SPTBN1</i>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	chr2	chr2:54889385-54889444	hs 2p16.2
58.	A_23_P97700	-4.102	-2.036	↓	<i>TXNIP</i>	thioredoxin interacting protein	chr1	chr1:145442447-145442506	hs 1q21.1
59.	A_23_P128698	-4.515	-2.175	↓	<i>SPRY2</i>	sprouty homolog 2 (Drosophila)	chr13	chr13:80910681-80910622	hs 13q31.1
60.	A_24_P643601	-4.532	-2.180	↓	<i>lnc-BBOX1-1</i>	lnc-BBOX1-1:1	chr11	chr11:27497697-27497756	hs 11p14.1
61.	A_33_P3258472	-4.572	-2.193	↓	<i>SPTBN1</i>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	chr2	chr2:54898523-54898582	hs 2p16.2
62.	A_23_P70968	-4.583	-2.196	↓	<i>HOXA7</i>	homeobox A7	chr7	chr7:27194490-27194431	hs 7p15.2
63.	A_23_P255884	-4.972	-2.314	↓	<i>GSN</i>	gelsolin	chr9	chr9:124094771-124094830	hs 9q33.2
64.	A_33_P3383233	-4.974	-2.314	↓	<i>NDRG2</i>	NDRG family member 2	chr14	chr14:21485301-21485242	hs 14q11.2
65.	A_23_P500400	-5.171	-2.371	↓	<i>ABCA6</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	chr17	chr17:67074908-67074849	hs 17q24.2
66.	A_24_P27234	-5.204	-2.380	↓	<i>SOX5</i>	SRX (sex determining region Y)-box 5	chr12	chr12:23685353-23685294	hs 12p12.1

No.	No. de prueba	FC	Log FC	EG	Gen	Nombre del gen	Cromosoma	Coordenadas cromosómicas	Cito banda
67.	A_24_P106542	-5.259	-2.395	↓	<i>RSPO3</i>	R-spondin 3	chr6	chr6:127476517-127476576	hs 6q22.33
68.	A_33_P3334515	-5.283	-2.401	↓	<i>NDRG2</i>	NDRG family member 2	chr14	chr14:21484991-21484932	hs 14q11.2
69.	A_23_P151805	-5.333	-2.415	↓	<i>FBLN5</i>	fibulin 5	chr14	chr14:92336140-92336081	hs 14q32.12
70.	A_33_P3381183	-5.416	-2.437	↓	<i>EGFEM1P</i>	EGF-like and EMI domain containing 1, pseudogene	chr3	chr3:168237350-168237409	hs 3q26.2
71.	A_23_P209360	-5.558	-2.474	↓	<i>KLHL29</i>	kelch-like family member 29	chr2	chr2:23931309-23931368	hs 2p24.1
72.	A_23_P215790	-5.566	-2.477	↓	<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	chr7	chr7:55274841-55274900	hs 7p11.2
73.	A_23_P143247	-5.663	-2.502	↓	<i>TSHZ2</i>	teashirt zinc finger homeobox 2	chr20	chr20:51872631-51872690	hs 20q13.2
74.	A_23_P17130	-5.851	-2.549	↓	<i>C2orf88</i>	chromosome 2 open reading frame 88	chr2	chr2:191064495-191064554	hs 2q32.2
75.	A_22_P00015350	-6.087	-2.606	↓	<i>lnc-SPRYD3-1</i>	lnc-SPRYD3-1:6	chr12	chr12:53408499-53408440	hs 12q13.13
76.	A_23_P35725	-6.108	-2.611	↓	<i>ANO3</i>	anoctamin 3	chr11	chr11:26684671-26684730	hs 11p14.2
77.	A_24_P185854	-6.284	-2.652	↓	<i>DMD</i>	dystrophin	chrX	chrX:31137408-31137349	hs Xp21.2
78.	A_23_P56578	-6.350	-2.667	↓	<i>VIT</i>	vitrin	chr2	chr2:37041766-37041825	hs 2p22.2
79.	A_33_P3326634	-6.435	-2.686	↓	<i>GPC3</i>	glypican 3	chrX	chrX:132730535-132730476	hs Xq26.2
80.	A_23_P96383	-6.664	-2.736	↓	<i>SRPX</i>	sushi-repeat containing protein, X-linked	chrX	chrX:38008772-38008713	hs Xp11.4
81.	A_24_P308029	-6.804	-2.766	↓	<i>HSPB6</i>	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6	chr19	chr19:36246079-36246020	hs 19q13.12
82.	A_23_P303833	-6.853	-2.777	↓	<i>SCN4B</i>	sodium channel, voltage gated, type IV beta subunit	chr11	chr11:118004356-118004297	hs 11q23.3
83.	A_23_P217570	-7.867	-2.976	↓	<i>CAPN6</i>	calpain 6	chrX	chrX:110488476-110488417	hs Xq23
84.	A_33_P3317613	-8.851	-3.146	↓	<i>SYN2</i>	synapsin II	chr3	chr3:12232848-12232907	hs 3p25.2
85.	A_33_P3228435	-9.441	-3.239	↓	<i>FXYD1</i>	FXYD domain containing ion transport regulator 1	chr19	chr19:35630984-35631043	hs 19q13.12
86.	A_23_P216596	-9.446	-3.240	↓	<i>SVEP1</i>	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	chr9	chr9:113137663-113132253	hs 9q31.3
87.	A_33_P3381338	-9.496	-3.247	↓	<i>TNXB</i>	tenascin XB	chr6	chr6:32009196-32009137	hs 6p21.33
88.	A_23_P156708	-10.15	-3.344	↓	<i>TNXB</i>	tenascin XB	chr6	chr6:32009022-32008964	hs 6p21.33
89.	A_33_P3275702	-10.21	-3.352	↓	<i>FMO2</i>	flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	chr1	chr1:171179869-171179928	hs 1q24.3
90.	A_23_P72697	-11.16	-3.480	↓	<i>GPIHBP1</i>	glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1	chr8	chr8:144298966-144299025	hs 8q24.3
91.	A_23_P72668	-11.89	-3.573	↓	<i>SDPR</i>	serum deprivation response	chr2	chr2:192700161-192700102	hs 2q32.3
92.	A_33_P3237150	-12.52	-3.647	↓	<i>BMP2</i>	bone morphogenetic protein 2	chr20	chr20:6760810-6760869	hs 20p12.3
93.	A_21_P0006303	-13.16	-3.719	↓	<i>lnc-ERP44-3</i>	lnc-ERP44-3:6	chr9	chr9:102347964-102347905	hs 9q22.33
94.	A_23_P429998	-13.40	-3.744	↓	<i>FOSB</i>	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	chr19	chr19:45978205-45978264	hs 19q13.32
95.	A_33_P3317618	-13.53	-3.759	↓	<i>SYN2</i>	synapsin II	chr3	chr3:12227160-12227219	hs 3p25.2
96.	A_33_P3400578	-15.13	-3.920	↓	<i>HLF</i>	hepatic leukemia factor	chr17	chr17:53402334-53402393	hs 17q22
97.	A_33_P3289121	-20.48	-4.357	↓	<i>C2orf40</i>	chromosome 2 open reading frame 40	chr2	chr2:106694463-106694522	hs 2q12.2
98.	A_24_P206776	-21.51	-4.427	↓	<i>CRYAB</i>	crystallin, alpha B	chr11	chr11:111779635-111779576	hs 11q23.1
99.	A_23_P45185	-26.62	-4.735	↓	<i>FIGF</i>	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	chrX	chrX:15363842-15363783	hs Xp22.2

Anexo IX. Análisis multi-ómico

9.1 CNA focales y amplias

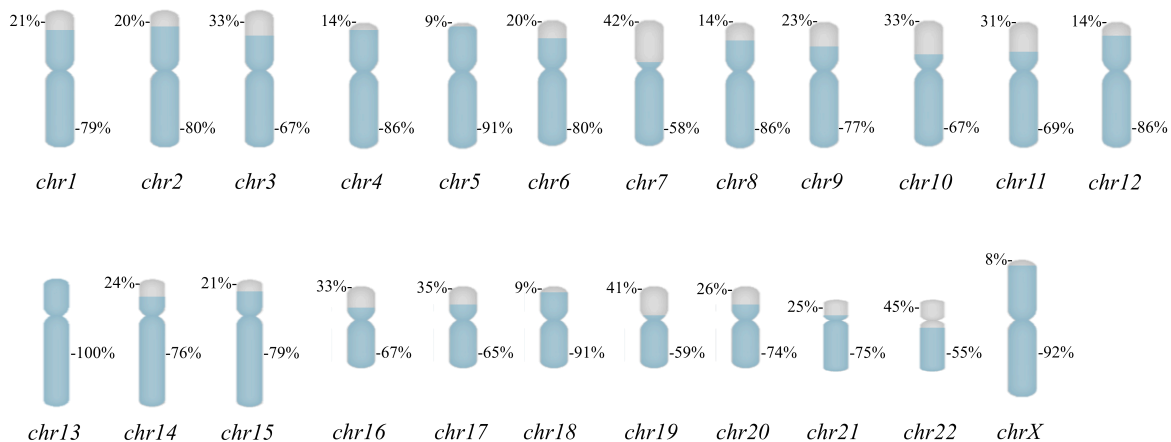


Figura 38. Distribución cromosómica del porcentaje de CNA focales y amplias con aCGH. Focales: color gris, Amplias: color azul.

9.2 Multi-ómico

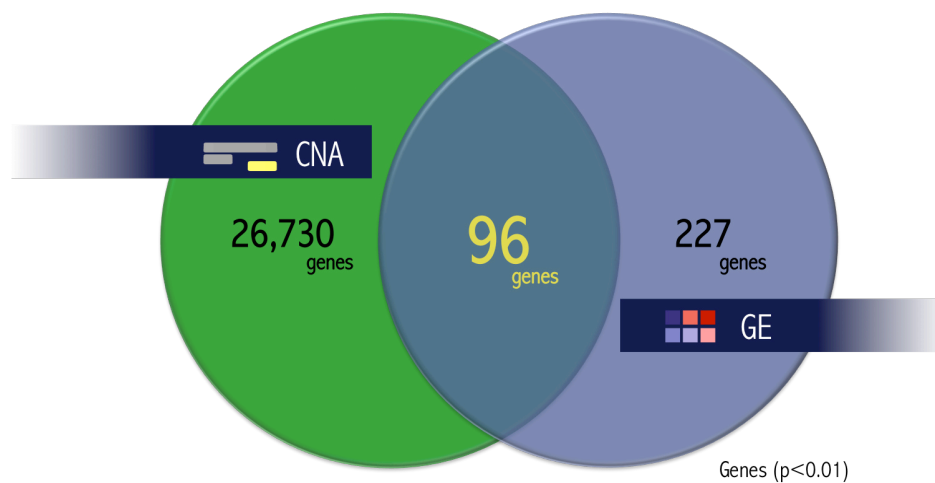


Figura 39. Diagrama de Venn integración de CNA y expresión génica identificadas en tejido tumoral y el número de genes que comparten ambos.

Anexo X. Análisis genómico y de expresión de cada paciente como muestras independientes.

Se muestran datos correspondientes a los genes diferencialmente expresados, el valor de p, las vías de señalización alteradas identificados mediante microarreglos de expresión génica; así mismo las ganancias o pérdidas de material genético identificadas mediante microarreglos de CGH.

Expresión génica				CGH	
ID	Genes diferencialmente expresados	Valor de p	Vía de señalización involucrada	Ganancia ADN	Pérdida ADN
LCM34	<i>IL7R, JAK3, IL2RG, STAT5A, IRS2, BCL2L11, PIK3R1</i>	0.017	IL-7	<i>JAK3</i>	
	<i>IL9, IRS2, IL2RG, GRB2, PIK3R1, JAK3</i>	0.013	IL9	<i>JAK3</i>	
LCM49	<i>IL1RN, TAB2, SYP, IL1B</i>	0.009	TCR		
LCM51	<i>SAP18, IHH, SMO, SUFU, GLI3, CDK1, HHIP, SKI, GAS1, GLI2, PTCH1, GLI1, CCNB1</i>	2.60E-05	Hedgehog		<i>SUFU</i>
	<i>MT1F, MT1X, TAGLN, MT1G, MT1E, MT1H</i>	0.008	Vía de metales pesados-MT		<i>TAGLN</i>
	<i>ERBB2, RWHAH, PIK3R1, VIM, MET, COL17A1, RPSA, MBP, CLCA1, EIF4E, ITGA6, CASP3, CLCA2, SMAD2, ITGB4, ABL1, DST, EGFR, MMP7</i>	0.007	α -6- β -4 Integrina	<i>ERBB2</i>	<i>COL17A1, MBP, CLCA1, CLCA2, SMAD2, ITGB4,</i>
LCM55	<i>JAK1, FYN, IL2RA, ICAMI, STAT5A, LYN, SYK, IRS2, GAB2, ITM2B, STAT5B, LCK, ETS2, CRK, BCL2, RELA, CRKL, NR3C1, IL2RB, STAM, MAPK3, STAT3, SOCS3, PRKCZ, NGFR</i>	0.002	IL2	<i>IRS2</i>	<i>CRK, SOCS3</i>
	<i>ERAS, BTK, NCOA1, GPI, VAV1, JAK1, RAC1, HNF1A, FES, SOCS3, HCK, IL6R, GAB2, PRKCD, CEBPB, STAT3, IL6, ERBB3, SGK1, FOS,LYN, ERBB2</i>	0.006	IL6		<i>ERAS, BTK, SOCS3,</i>
	<i>VAV3, ABL1, NFAM1, DNM2, PPP3CB, WASF2, PKNI, ZAP70, STAT5A, CRK, ENAH, DTX1, MUC1, SH2D3C, SYP, GRAP2, CISH, LYN, FYN, LAX1, LCP2, RASGRP2, RAPGEF1, DBNL, ACPI, TUBA4A, GAB2, STAT5B, DUSP3, CEBPB, SYK, SKAP2, ARHGEF6,LCK, SLA, CD247, TRAT1, VAV1, MAP4K1, CD3E, MAP2K1, ITK, SH2D2A, CD2AP, FOS, ARHGEF7, PXN, CBLB, DOCK2, CRKL, PTPRC</i>	1.32E-04	TCR	<i>ARHGEF7</i>	<i>NFAM1, CRK, SYP, GRAP2, ARHGEF6, CD3E,</i>
	<i>MT1X, MT1G, MT1E, MT1H, MT1A, MT1M, MT1B</i>	0.004	Vía de metales pesados-MT		
	<i>DOK1, NFATC1, PDK2, BTK, MAP4K1, FOXO1, CYCS, RAPGEF1, HCK, PLCG2, ITK, CD79B, HCLSI, ZAP70, DAPPI, LCP2, CRK, PRKCB, VAV1, SYK, CD72, DOK3, CRKL, BCL2L11, FYN, BANK1, ATP2B4, IGHM, BCL2, LYN, BLNK, NFATC3, BRAF, PIP4K2A, PRKCD, BCL6,</i>	0.002	BCR	<i>FOXO1</i>	<i>BTK, CRK, SYP</i>

	<i>CCNA2, GAB2, CCND3, MAPK3, PTPRC, FCGR2B, CD81, PIK3AP1, CDK7, CCND2, CBLB, LCK, RELA, IKKKB, SYP,</i>				
	<i>TAX1BP3, HIPK2, CDC25C, NKD1, WNT5A, PPP2R5B, WNT4, CDH1, PRKCB, ARRB1, LEF1, FZD4, GPI, TFAP2A, SOX1, SFRP2, MAP3K4, MYB, MAGI3, SFRP1, RAC1, FZD5, DLG2, AXIN2, CDK1, SENP2, ROR2, VANGL2, CTNNBIP1, CSNK1A1, PARI, LRP1, PAX2, LRP5, TCF4, CTBP2, RUNX2, FAP, BCL9</i>	0.006	Wnt	<i>SOX1</i>	<i>TAX1BP3, FZD4, DLG2</i>
	<i>JAK1, BCL2, HCK, BCL2L11, FES, SYK, MAPK3, SOCS3, BAD, LILRB3, LYN, VCL, STAT5B, IL3RA, DNMI, PXN, FYN, PRKCB, CISH, VAV1, MAP2K1, SYP, RAPGEF1, STAT3, LCK, PRKACA, CRKL, KITLG, STAT5A, PKN1, GAB2, CRK</i>	4.69E-04	IL3		<i>SOCS3, SYP, CRK</i>
	<i>RTKN, TP73, ERBB2, YWHAE, PRKCD, VIM, POLDIP3, RPSA, RAC1, MBP, SFN, FYN, ITGA6, CASP3, CLCA2, CD151, PKN1, MST1R, ABL1, BAD, DST, EGFR, MMP7</i>	0.003	α -6, β -4 Integrina		<i>POLDIP3, MMP7</i>
	<i>PXN, MAP3K1, ARAF, PLCG2, FOS, GAB2, CBLC, STXBPI, SOCS3, MAP2K1, DOK2, KRT17, EPS15, SH3KBP1, KLF11, PRKCC, MYC, CEBPB, STAT5B, STAT5A, PTK6, CRK, MAP3K3, ELF3, PLSCR1, PTPNA, CBLB, MAP3K4, PEBP1, POLDIP3, ERRF1, GRB14, SNCA, MAPK3, PKN1, CAV2, GIT1, STAT3, RAC1, RPS6KA5, EPPK1, EGFR, KRT8, KRT18, RGS6, PRKCB, VAV1, MAPK7, SEP8, TKR7, TNIP1, WNK1, EPN1, DNMI, SPRY2, FOXO1, DUSP1, JAK1, VAV3, CABPA, EGF, CTNND1, RPS6KA3, CRKL</i>	0.001	EGFR1	<i>SPRY2, FOXO1</i>	<i>ARAF, SOCS3, SH3KBP1, CRK, PTPNA, POLDIP3, MAPK7, RPS6KA3,</i>
LCM57	<i>JUP, PIAS4, FRAT2, RUVBL1, DLG4, FZD9, WNT5A, CUL1, FHL2, PPP2R5B, TCF7L2, CDH1, RHOA, LEF1, EP300, WNT1, NLK, TFAP2A, TCF3, SFI, NR5A1, CTNNB1, SOX1, SFRP2, FRAT1, MAP3K4, AKT1, MYB, CXXC4, CDX1, DLG2, MAPK8, CDK1, ROR2, PRKCG, VANGL2, CSNK1A1, F2R, PARI, GPR172A, PAX2, SUMO2, DKK1, FZD1, BTRC, CSNK1E, CTBP2, DVLI, CEL, FAP, BCL9, AXIN1, WNT7A, SUMO1</i>	0.381	Wnt		
LCM61	<i>RPS6, PIP5K1A, NFATC1, NEDD9, PDK2, HNRNPK, MAP4K1, FOXO1, CYCS, CSK, RAPGEF1, PTPN18, CARD11, PLCG2, PIP4K2B, JUN, INPP5D, CR2, GTF2I, CD79B, HDAC5, HCLS1, PTPN6, PLEKHA1, CD79A, CRK, NFKBIA, CD19, PRKCB, REL, CD5, CD72, RPS6KB1, CRKL, BCL2L11, FYN, CD22, BANK1, ELK1, BLK, PIGU, ATP2B4, IGHM, BCL2, BLNK, CREB1, PPP3R1, NFATC3, PIP4K2A, PRKCD, NFATC2, BCL6, BCAR1, CCND3, PLCG1, VAV2, MAPK4, PTK2B, PTPRC, CD81, CCND2, CBLB, PIP5K1B, LCK, RELA, RASGRP3, ITPRI, SYP</i>	0.107	BCR	<i>CARD11, BCAR1, LCK</i>	<i>CD5, CRKL, BCL2, MAPK4, PTK2B, ITPRI</i>

LCM64	<i>PIK3R1, JAK1, SOCS2, BCL2L11, FES, VCL, GATA1, MAPK8, GATA2, SLC2A1, PTPN11, FYN, PRKCB, CISH, VAV1, TEC, MAP2K1, PRKACA, KITLG, STAT5A, PKN1, PIK3CD, GAB2, CRK</i>	0.009	IL3		
	<i>MAP3K1, ARAF, REPS2, FOS, GAB2, CBLC, STXBPI, ELK1, MAP2K1, DOK2, KRT17, SH3KBP1, KLF11, PRKCZ, STAT5A, PTK6, CRK, ELF3, MAP3K4, PEBP1, BCARI, PIK3C2B, GRB7, GRB14, SNCA, PKN1, CAV2, MAPK8, PKN2, RPS6KA5, EPPK1, PIK3R1, EGFR, KRT8, KRT18, RGS6, PRKCB, VAV1, RGS16, KRT7, TNIP1, WNK1, PTPN11, OCA2, SPRY2, FOXO1, TNK2, DUSP1, JAK1, VAV3, CEBPA, JUN, PRKD1</i>	0.002	EGFR1		<i>BCARI</i>
LCM65	<i>MT1X, MT1G, MT1E, MT1H, MT1A, MT1M, MT1B</i>	0.001	Vía de metales pesados-MT		
	<i>FZD6, HIPK2, CDC25C, NKD1, FZD8, TCF7L2, CDH1, PRKCB, ARRB1, LEF1, FZD4, WNT1, GPI, WNT2, TFAP2A, FRAT1, MYB, CXXC4, CDX1, MAGI3, SFRP1, FZD2, FZD5, CDK1, ROR2, PRKCG, VANGL2, CTNNBIP1, CSNK1A1, NR1I2, PARI, LRP1, LRP5, TCF4, DKK1, CTBP2, RUNX2, GLMN, FAP, WNT7A</i>	9.78E-05	Wnt		<i>PRKCB, WNT2, SFRP1</i>
	<i>ERBB2, PIK3R1, VIM, SMAD3, MET, RPSA, MBP, SFN, TFDPI, CLCA1, FYN, ITGA6, CASP3, CLCA2, CD151, MST1R, BAD, DST, EGFR, MMP7</i>	0.005	α -6, β -4 Integrina		<i>ERBB2, MET, TFDPI, FYN</i>
LCM67	<i>MT1G, MT1H</i>	0.282	Vía de metales pesados-MT		
LCM76	<i>MT1F, MT1X, MT1G, MT1E, MT1H, MT1A, MT1M, MT1B</i>	2.91E-05	Vía de metales pesados-MT		
	<i>PIGU, PXN, REPS2, FOS, NCK2, CBLC, KCNH8, MAP2K1, RALGDS, KRT17, TGIF1, EPS15, SOCS1, MYC, PTK6, GJA1, CEACAM1, SH3GL2, ERFFI1, GRB14, MAP3K2, PKN1, MAP2K3, CA5A, CAV2, GIT1, STAT3, CDC42, RAC1, EPPK1, PIK3R1, MAP2K2, EGFR, PRKCB, EPS8, PTPN6, KRT7, EPS15L1, SPRY2, DUSP1, VAV3, JUN, RPS6KA3, PRKCA, PRKD1</i>	0.004	EGFR1	<i>SOCS1</i>	<i>FOS</i>
LCM77	<i>JUP, PIAS4, FZD6, HIPK2, CDH1, LEF1, FZD4, WNT2, TCF3, MAP1B, SFRP2, FRAT1, CXXC4, FZD5, FZD7, AXIN2, CTNNBIP1, LRP1, PAX2, DKK1, AXIN1</i>	0.036	Wnt		
LCM78	<i>IL1R2, PELI1</i>	0.006	EGFR1		

Anexo XI. Vías de señalización alteradas de acuerdo al perfil de expresión génica en CaMa ($p < 0.01$).

Pathway name	Pathway name
A tetrasaccharide linker sequence is required for GAG synthesis	Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding
ABC transporters in lipid homeostasis	COPI-dependent Golgi-to-ER retrograde traffic
ABC-family proteins mediated transport	COPI-independent Golgi-to-ER retrograde traffic
Activation of Matrix Metalloproteinases	COPI-mediated anterograde transport
Adaptive Immune System	Cytokine Signaling in Immune system
Adherens junctions interactions	Defective B3GALT6 causes EDSP2 and SEMDJL1
Amino Acid conjugation	Defective B3GAT3 causes JDSSDHD
Amino acid synthesis and interconversion (transamination)	Defective B4GALT7 causes EDS, progeroid type
Amyloid fiber formation	Degradation of the extracellular matrix
Apoptosis	Detoxification of Reactive Oxygen Species
Apoptotic cleavage of cellular proteins	Developmental Biology
Apoptotic execution phase	Disease
ARMS-mediated activation	Diseases associated with glycosaminoglycan metabolism
Asparagine N-linked glycosylation	Diseases of glycosylation
Assembly of active LPL and LIPC lipase complexes	Diseases of signal transduction
Basigin interactions	Dopamine Neurotransmitter Release Cycle
Biological oxidations	Downregulation of ERBB2 signaling
Carboxyterminal post-translational modifications of tubulin	Downregulation of ERBB2:ERBB3 signaling
Cardiac conduction	Downregulation of ERBB4 signaling
Cargo recognition for clathrin-mediated endocytosis	ECM proteoglycans
Cell Cycle	EGFR interacts with phospholipase C-gamma
Cell Cycle, Mitotic	EGFR Transactivation by Gastrin
Cell junction organization	ER to Golgi Anterograde Transport
Cell surface interactions at the vascular wall	ERBB2 Activates PTK6 Signaling
Cell-Cell communication	ERBB2 Regulates Cell Motility
Cell-cell junction organization	Extracellular matrix organization
Cellular response to heat stress	Factors involved in megakaryocyte development and platelet production
Cellular responses to external stimuli	Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis
Cellular responses to stress	Formation of tubulin folding intermediates by CCT/TriC
Centrosome maturation	Frs2-mediated activation
Chaperonin-mediated protein folding	G2/M Transition
Chondroitin sulfate/dermatan sulfate metabolism	GAB1 signalosome
Chromatin modifying enzymes	Gene expression (Transcription)
Chromatin organization	Generic Transcription Pathway
Cilium Assembly	Glycosaminoglycan metabolism
Circadian Clock	Golgi-to-ER retrograde transport
Clathrin-mediated endocytosis	GRB2 events in EGFR signaling
Collagen biosynthesis and modifying enzymes	GRB2 events in ERBB2 signaling
Collagen chain trimerization	GRB7 events in ERBB2 signaling
Collagen degradation	HDMs demethylate histones
Conjugation of carboxylic acids	Hedgehog 'off' state
Constitutive Signaling by Aberrant PI3K in Cancer	Hemostasis
Constitutive Signaling by EGFRvIII	Heparan sulfate/heparin (HS-GAG) metabolism
Constitutive Signaling by Ligand-Responsive EGFR Cancer Variants	

Pathway name
HS-GAG biosynthesis
HS-GAG degradation
HSF1-dependent transactivation
HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)
IGF1R signaling cascade
Immune System
Inflammasomes
Innate Immune System
Insulin receptor signalling cascade
Integrin cell surface interactions
Interleukin receptor SHC signaling
Interleukin-17 signaling
Interleukin-2 signaling
Interleukin-3, 5 and GM-CSF signaling
Interleukin-4 and 13 signaling
Intra-Golgi and retrograde Golgi-to-ER traffic
Intraflagellar transport
Ion channel transport
Ion homeostasis
Ion transport by P-type ATPases
Iron uptake and transport
IRS-mediated signalling
IRS-related events triggered by IGF1R
M Phase
MAPK family signaling cascades
MAPK1/MAPK3 signaling
Membrane Trafficking
Metabolism
Metabolism of amino acids and derivatives
Metabolism of carbohydrates
Metabolism of fat-soluble vitamins
Metabolism of proteins
Metabolism of RNA
Metabolism of vitamins and cofactors
MHC class II antigen presentation
Microtubule-dependent trafficking of connexons from Golgi to the plasma membrane
Mitotic Anaphase
Mitotic G2-G2/M phases
Mitotic Metaphase and Anaphase
Mitotic Prometaphase
Muscle contraction
N-Glycan antennae elongation
N-glycan antennae elongation in the medial/trans-Golgi
NCAM signaling for neurite out-growth
Negative regulation of FGFR1 signaling
Negative regulation of FGFR2 signaling
Negative regulation of FGFR3 signaling
Negative regulation of FGFR4 signaling
Negative regulation of the PI3K/AKT network
Nephrin interactions
Neuronal System
Neurotransmitter release cycle
Neutrophil degranulation

Pathway name
Nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor (NLR) signaling pathways
Organelle biogenesis and maintenance
Peptide hormone metabolism
Phase 0 - rapid depolarisation
Phase I - Functionalization of compounds
Phase II - Conjugation of compounds
PI3K events in ERBB2 signaling
PI3K events in ERBB4 signaling
PI3K/AKT activation
PI3K/AKT Signaling in Cancer
PI5P, PP2A and IER3 Regulate PI3K/AKT Signaling
PIP3 activates AKT signaling
Plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance
Plasma lipoprotein remodeling
Platelet activation, signaling and aggregation
Platelet degranulation
Post-chaperonin tubulin folding pathway
Post-translational modification: synthesis of GPI-anchored proteins
Post-translational protein modification
Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC
Programmed Cell Death
Prolonged ERK activation events
Protein folding
RA biosynthesis pathway
RAB GEFs exchange GTP for GDP on RABs
RAF/MAP kinase cascade
Recruitment of mitotic centrosome proteins and complexes
Recruitment of NuMA to mitotic centrosomes
Recycling pathway of L1
Regulation of FZD by ubiquitination
Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements
Resolution of Sister Chromatid Cohesion
Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺
RET signaling
RHO GTPase Effectors
RHO GTPases Activate Formins
RHO GTPases activate IQGAPs
RNA Polymerase II Transcription
Role of phospholipids in phagocytosis
Sema4D in semaphorin signaling
Sema4D induced cell migration and growth-cone collapse
Semaphorin interactions
Separation of Sister Chromatids
Serotonin Neurotransmitter Release Cycle
SHC1 events in EGFR signaling
SHC1 events in ERBB2 signaling
SHC1 events in ERBB4 signaling
Signal Transduction

Pathway name
Signal transduction by L1
Signaling by BMP
Signaling by EGFR
Signaling by EGFR in Cancer
Signaling by EGFRvIII in Cancer
Signaling by ERBB2
Signaling by ERBB4
Signaling by FGFR
Signaling by FGFR1
Signaling by FGFR2
Signaling by FGFR3
Signaling by FGFR4
Signaling by GPCR
Signaling by Hedgehog
Signaling by Leptin
Signaling by Ligand-Responsive EGFR Variants in Cancer
Signaling by PTK6
Signaling by Retinoic Acid
Signaling by Rho GTPases
Signaling by Type 1 Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R)
Signaling by VEGF
Signaling by Wnt
Signalling to ERKs
Signalling to p38 via RIT and RIN
Signalling to RAS
SOS-mediated signalling
Stimuli-sensing channels
Striated Muscle Contraction
TCF dependent signaling in response to WNT
TFAP2 (AP-2) family regulates transcription of growth factors and their receptors
The NLRP3 inflammasome
The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint
Transcriptional regulation by the AP-2 (TFAP2) family of transcription factors
Translocation of GLUT4 to the plasma membrane
Transmission across Chemical Synapses
Transport of connexons to the plasma membrane
Transport of small molecules
Transport to the Golgi and subsequent modification
Tristetraprolin (TTP, ZFP36) binds and destabilizes mRNA
VEGFR2 mediated cell proliferation
Vesicle-mediated transport