

Departamento & medicina
Facultad & medicina



Universidad & salamanca

**Estudio de polimorfismos de genes reparadores del
ADN en cáncer de mama**

Autor:

Elena Castro Marcos

Directores:

Prof. Juan Jesús Cruz Hernández

Prof. Rogelio Gonzalez Sarmiento

Salamanca, 22 & octubre 2010

A mis padres,
que han hecho todo por mí.

A mis abuelos,
que no pudieron estudiar
y siempre me insistieron en la importancia de que yo lo hiciera.

A David,
sin quien nada sería lo mismo.

Agradezco a mis supervisores de tesis, así como a mis compañeros del Servicio de Oncología y del laboratorio, la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos científicos:

- 2010 ASCO Annual Meeting (*American Society of Clinical Oncology*)
4-8 Junio 2010, Chicago, Illinois (EEUU)

General Poster Session, Breast Cancer, Adjuvant therapy.

Póster. Abstract: 619

Título: *Germline single nucleotide polymorphisms (SNPs) in XRCC3, XRCC1, and XPD, and survival outcomes after adjuvant chemotherapy (CT) in early breast cancer (EBC) patients (pts).*

Publicado en: *Journal of Clinical Oncology* 28:15s, 2010 (abst r619)

- IMPAKT 2010 Breast Cancer Conference (*European Society of Medical Oncology*)
6-8 Mayo, 2010, Bruselas (Bélgica)

Póster. Adjuvant Medical Therapy Session.

Abstract: 67

Título: *Germline single nucleotide polymorphisms in XRCC3, XRCC1, and XPD, and survival outcomes after adjuvant chemotherapy in early breast cancer patients.*

Publicado en: *Annals of Oncology*, 21: 4s, 2010 (suppl, abstr 67)

- XI congreso ASEICA, 2007 (*Asociación Española para la Investigación del Cáncer*)
10-12 Mayo, 2007, Las Palmas de Gran Canaria (España)

Póster. Breast Cancer

Abstract: 104

Título: *Polymorphisms in DNA repair genes, risk of breast cancer and longevity.*

Publicado en: *Clinical and Translational Oncology*, vol 9, extraordinary 1, May 2007 (abstract 104)

Premios:

- El trabajo presentado en IMPAKT 2010 Breast Cancer Conference fue merecedor de *Travel Grant/Merit Award*

Índice

Listado de abreviaturas	7
INTRODUCCIÓN	9
1. CÁNCER DE MAMA	10
1.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	10
1.2. FACTORES DE RIESGO.....	11
1.2.1. Factores hormonales y reproductivos	12
1.2.2. Factores de riesgo ligados al estilo de vida y la dieta	14
1.2.3. Antecedentes personales	16
1.2.4. Exposiciones ambientales y ocupacionales	17
1.2.5. Susceptibilidad genética.....	18
1.2.6. Modelos predictivos del riesgo de cáncer de mama	20
1.3 CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA DE MAMA.....	21
1.3.1. Clasificación histológica	21
1.3.2. Clasificación del cáncer de mama según patrones de expresión génica	22
1.3.3. Clasificación TNM.....	24
2. GENES Y SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER.....	26
2.1. CÁNCER COMO ENFERMEDAD GENÉTICA	26
2.2. GENES DE ALTA PENETRANCIA	28
2.3. GENES DE BAJA PENETRANCIA	29
2.4. POLIMORFISMOS	31
2.4.1. Estudio de polimorfismos en genes de baja penetrancia.....	32
2.4.1.1. Estudios de desequilibrio de ligamiento	33
2.4.1.2. Estudios de Asociación Genética.....	33
3. MECANISMOS DE REPARACION DEL ADN.....	35
3.1. REPARACIÓN DE ALINEAMIENTOS ERRÓNEOS (Mismatch Repair - MMR).....	37
3.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES (Base Escisión Repair-BER).....	40
3.3. REPARACIÓN DE LESIONES POR ROTURA DE DOBLE CADENA (DSBR	42
3.3.1. Recombinación homóloga	43
3.3.2. Recombinación no homóloga (NHEJ)	46
3.4. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS	47
4. XRCC1 Arg399Gln, XRCC3 Thr241Met y XPD Lys751Gln	50
4.1. XRCC1 Arg399Gln	50
4.2. XRCC3Thr241Met.....	51
4.3. XPD Lys751Gln	52
OBJETIVOS	54
MATERIAL Y MÉTODOS.....	56
1. MUESTRA	57
1.1. Pacientes	57
1.2. Controles	59
2. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO	60
3. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS XRCC3Thr241Met, XPD Lys751Gln y XRCC1 Arg399Gln	62
3.1. Discriminación alélica mediante PCR-RFLP.....	62
3.1.1. Análisis del polimorfismo Thr 241Met del gen XRCC3	64
3.1.2. Análisis del polimorfismo Lys751Gln del gen XPD	66
3.2. Discriminación alélica mediante qRT-PCR	68
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73

RESULTADOS	76
1. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS.....	77
1.2. CLASIFICACION TNM DE LOS TUMORES DE LA MUESTRA	78
1.3. TRATAMIENTO.....	79
1.3.1. TRATAMIENTO LOCAL	79
1.3.1.1. Tratamiento Quirúrgico	79
1.3.1.2. Tratamiento radioterápico.....	81
1.3.2. TRATAMIENTO SISTÉMICO	82
1.3.2.1. Tratamiento Quimioterápico.....	82
1.3.2.2. Hormonoterapia	84
2. ESTUDIO DE XPDlys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met	86
2.1. Estudio de XPDlys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met en casos y controles	86
2.2. Estudio de XPDlys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met en relación con la edad en los grupos caso y control	87
2.2.1. Controles	88
2.2.2. Casos	88
2.3. Estudio de XPDlys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met en relación con el tratamiento radioterápico	90
2.3.1. Toxicidad cutánea aguda post-radioterapia.....	90
2.3.2. Toxicidad crónica post-radioterapia	93
2.3.3. Recidiva local tras RT.....	94
3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	95
3.1. PACIENTES CON ENFERMEDAD LOCAL	96
3.1.1. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE)	96
3.1.1.1. Afectación de ganglios axilares	96
3.1.1.2. Tamaño tumoral	97
3.1.1.3. Grado tumoral	98
3.1.1.4. Receptores hormonales.....	98
3.1.1.5. HER2	99
3.1.1.6. Edad	100
3.1.1.7. Otros.....	100
3.1.1.8. Análisis de XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln en relación con SLE en los estadios tempranos de cáncer de mama	101
3.1.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL	102
3.1.2.1. Afectación de ganglios axilares.....	102
3.1.2.2. Tamaño tumoral	102
3.1.2.3. Grado tumoral	103
3.1.2.4. Receptores hormonales	104
3.1.2.5. HER2	104
3.1.2.6. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln en relación con SG	105
3.1.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES TRATADAS CON ANTRACICLINAS EN ADYUVANCIA O NEOADUVANCIA	106
3.1.3.1. SLE en pacientes tratadas con antracilinas en adyuvancia o neoadyuvancia	108
3.1.3.2. SG en las pacientes tratadas con antracilinas en adyuvancia o neoadyuvancia	111
3.1.3.3. Pacientes tratadas con antracilinas en adyuvancia y neoadyuvancia excluyendo las que recibieron taxanos.....	114
3.1.3.3.1. Supervivencia Libre de Enfermedad	114
3.1.3.3.2. Supervivencia Global	116
3.2. PACIENTES CON ENFERMEDAD METASTÁSICA	118
DISCUSIÓN.....	121
1. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN EN CASOS Y CONTROLES.....	123
1.1. XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln, XPDlys751Gln como modificadores del riesgo de cáncer de mama	125
1.2. XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln, XPDlys751Gln en relación con la edad	126
1.1.1. Grupo Control	128
1.1.2. Casos	129
2. ANALISIS RADIO Y FARMACOGENÓMICO DE LAS VARIANTES XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln, XPDlys751Gln EN CÁNCER DE MAMA	131

2.1. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln y radioterapia	132
2.2. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln XPDlys751Gln en relación con el tratamiento con antraciclinas en pacientes con cáncer de mama temprano.....	135
CONCLUSIONES	143
SUMMARY	145
BIBLIOGRAFÍA	171

Listado de abreviaturas

5-FU: 5-Fluoruracilo	IGF-1: <i>Insulin Growth Factor 1</i>
A: adenina	LHRH: Hormona Liberadora de gonadotropina
ADN: Ácido desoxirribonucleico	LIG I, III: Ligasa I y III
AJCC: <i>American Joint Committee on Cancer</i>	LKB1/STK11: <i>Serin -Treonin kinase11</i>
Arg: Arginina	Lys: Lisina
ARN: Ácido ribonucleico	M: Metástasis
ATM: <i>Ataxia-teleangiectasia mutated</i>	Met: Metionina
ATP: Adenosín trifosfoato	Min: minutos
BER: Reparación por escisión de bases	MLH1: <i>MutL homolog 1</i>
BGC: Biopsia del Ganglio Centinela	MMR: <i>Mismatch Repair</i>
BRCA1, 2: <i>Breast Cancer 1, 2</i>	MRN : Complejo <i>NBS1/ Mre11/ RAD50</i>
BRCT: Extremo C-terminal de <i>BRCA</i>	MSH2: <i>MutS homolog 2</i>
C: Citosina	MSH6: <i>MutS homolog 6</i>
Ca. Mama: Cáncer de mama	MSI: inestabilidad de microsatélites
CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante	Mut.: Mutación
CLI: Carcinoma Lobulillar Infiltrante	N: Ganglios
CS: Síndrome de Cockayne	NER: Reparación por escisión de nucleótidos
Des. Stand: Desviación estándar de la media	NHEJ: <i>Non-homologous end joining</i>
DL: Desequilibrio de ligamiento	NSB1: <i>Nibrina</i>
dNTP: Desoxinucleotido trifosfato	PARP: <i>Poli ADP ribose polymerase</i>
DSBR: Reparación de roturas de doble cadena	Pb: pares de bases
E2F1: <i>E2F transcription factor 1</i>	Pb: Pares de bases
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico	PCNA: <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
EXO11: Exonucleasa 11	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
G: Guanina	PK: Proteína kinasa
GG-NER: <i>Global Genomic Repair</i>	PMS2: <i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
Gln: Glutamina	PNK: <i>Polinucleotide Kinase</i>
GWAs: <i>Genome Wide Association studies</i>	POL β , δ , λ , μ : Polimerasa β , δ , λ , μ
Gy: Gray	PTEN: <i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
HER2: <i>Human Epidermal Receptor 2</i>	RAD51: <i>RecA homolog</i>
HNPCC: Cáncer de colon hereditario no polipósico	RE: Receptor de estrógenos
HR: Hazard Ratio	RFC: <i>Replication factor C</i>
HR: Recombinación Homóloga	RFLP: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
	RH: Receptores Hormonales

RP: Receptor de progestagenos
RT: Radioterapia
RTOG: *Radiation Therapy Oncology Group*
RT-PCR: PCR en tiempo real
SDSA: *Synthesis Depending Strand Annealing*
Sec: Segundos
SG: Supervivencia global
SG_M: Supervivencia Global desde la Metástasis
SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad
SNP: Single nucleotide polymorphisms
ssADN: ADN de cadena sencilla
T: Tamaño tumoral
T: timina
TASPE: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica
TCR-NER: *Transcription coupled nucleotide excision repair*
Tdp1: *Tyrosil-DNA phosphodiesterase*
TFIIH: *Transcription Factor IIH*
Thr: Treonina
Topo II: Topoisomerasa II
TTD: Tricotodistrofia
UICC: *Union Internationale Contre le Cancer*
UNG: Uracil-N-glicosilasa
UV: ultravioleta
Wrn: *Werner syndrome*
XP: Xeroderma Pigmentoso
XPD: *Xeroderma Pigmentoso D*
XRCC: *X-ray repair cross complementation group*

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE MAMA

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es el tumor más frecuente entre las mujeres occidentales y se estima que representa el 25-20% de todos los nuevos casos de cáncer diagnosticados en mujeres. La incidencia y mortalidad por esta patología presentan una gran variabilidad geográfica, observándose una mayor incidencia en Norte América, Australia, Países Nórdicos, Europa occidental y Argentina^{1,2}. En la Unión Europea, según los datos presentados en 2010 por la Dirección General para la Salud y los Consumidores, el cáncer de mama es el cáncer más frecuente entre las europeas, ya que supone el 30% de todos los nuevos casos de neoplasias en mujeres, y la principal causa de muerte por cáncer antes de los 75 años en todos los países miembros de la Unión³. En España, afecta a una de cada trece mujeres, se diagnostican entorno a 16000 casos al año y produce anualmente la muerte de unas 6000 mujeres⁴. El cáncer de mama constituye, sin ninguna duda, un importante problema de salud pública.

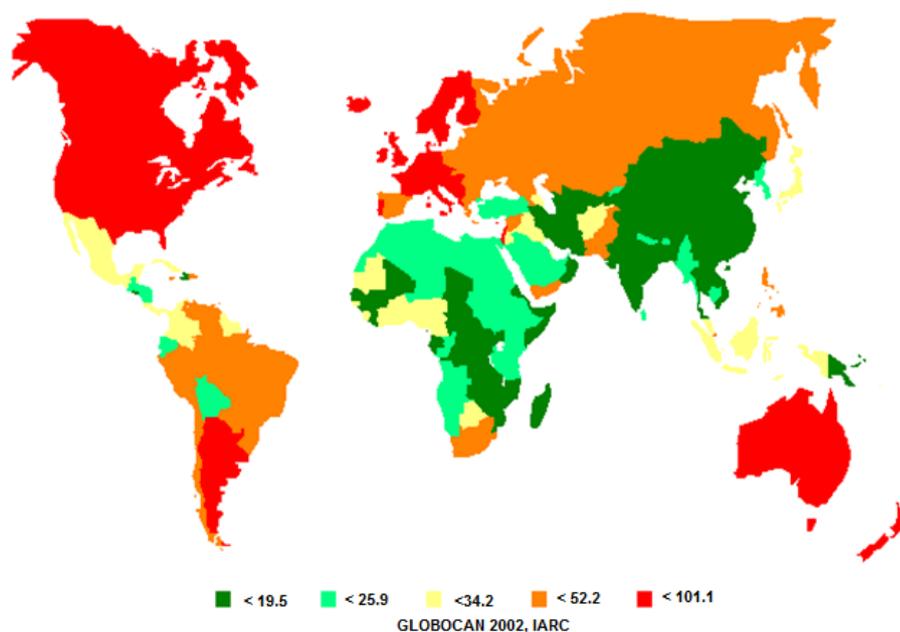


Figura 1: Tasas de incidencia de cáncer de mama estandarizadas por edad en el mundo. Estimación de los casos anuales por cada /10000 mujeres-año en el 2002 ⁵

A lo largo del siglo XX se produjo un paulatino incremento de la incidencia, motivado tanto por los cambios en los hábitos de vida, como por el aumento de los diagnósticos debido a la introducción de los programas de cribado y a la mejora de las técnicas diagnósticas. En las últimas décadas del siglo asistimos un aumento en países que tradicionalmente mostraban las tasas más bajas y una estabilización en aquellos en los que las tasas de incidencia habían sido mayores en los años previos, atenuándose las diferencias geográficas observadas hasta entonces⁶.

La mortalidad también ha tenido una evolución llamativa. En la mayoría de los países desarrollados, sufrió un importante aumento desde los años 50 hasta la década de los 80⁶, sin embargo, los programas de diagnóstico precoz y el éxito de los nuevos tratamientos han hecho que esta tendencia comenzara a invertirse desde los años 90. En Europa, la supervivencia a 5 años aumentó entre 1992 y 2002 en un 1,6% anual, situándose actualmente entorno al 83%, si bien aún existen diferencias entre los países de la Unión Europea, oscilando entre el 73% de Polonia y el 85% de Suecia^{3,7,8}.

La evolución de los datos de incidencia y mortalidad por cáncer de mama en España ha sido paralela a la del resto de países desarrollados y actualmente, supone casi el 25% de todas las neoplasias malignas diagnosticadas en mujeres españolas. Mientras que la incidencia aumenta a un ritmo del 2-3% anual, la tasa de mortalidad comenzó a descender en 1992 en torno al 1.8-2% anual. Este descenso, aunque se produce en todos los grupos de edad, es más acusado en las menores de 45 años. La tasa ajustada de mortalidad en 2006 se situaba en 18.6 casos por 100.000 mujeres/año, inferior a la estimada para el conjunto de Europa. Al mismo tiempo, la supervivencia a los 5 años es del 83%, entre las más altas de la Unión Europea⁴.

1.2. FACTORES DE RIESGO

El incremento en riesgo de desarrollar cáncer de mama, se ha asociado a múltiples factores como la edad, la historia familiar o la dieta, aunque los principales son aquellos que guardan relación con el carácter hormonodependiente de este tumor, y la mayoría de los factores conllevan un riesgo de pequeño a moderado de desarrollar esta patología⁹. Habitualmente no es

posible señalar una única causa como origen del cáncer de mama en una determinada paciente, ni siquiera en aquellas que portan mutaciones en genes de alta penetrancia rantica (p.e. BRCA1 y BRCA2) y debemos entender que éste es debido a la interacción de una serie de factores hormonales, dietéticos, de hábitos de vida y genéticos (Tabla 1).

Tabla 1. Magnitud del riesgo relativo de cancer de mama estimado para diferentes factores⁹

Riesgo Relativo <2	Riesgo Relativo 2-4	Riesgo Relativo ≥4
Menarquía temprana Menopausia tardía Nuliparidad Terapia Hormonal Sustitutiva Alcohol Tabaco Obesidad Edad >55 años Variantes genes de susceptibilidad	Familiares de 1 ^{er} grado con ca. mama Primípara >35 años Hiperplasia sin atipia Mamas mamográficamente densas Variantes genes de baja penetrancia	Mutación en BRCA1 y 2 Mut. otros genes de alta penetrancia Carcinoma Lobulillar in situ Hiperplasia atípica de la mama Radiaciones ionizantes Varios familiares con ca. mama

1.2.1. Factores hormonales y reproductivos

El cáncer de mama es 150 veces más frecuente en las mujeres que en los hombres y su incidencia aumenta exponencialmente con la edad, elevándose de forma gradual desde los 30 años hasta los 50-60, en que alcanza su máxima incidencia y se estabiliza, posiblemente debido a la caída de los niveles de estrógeno circulantes en las mujeres⁹. Los datos epidemiológicos, junto con las evidencias experimentales involucran claramente a estas hormonas en la etiopatogenia de la enfermedad. El mecanismo por el que los estrógenos ejercen su función en los tejidos hormonsensibles no se conoce por completo. Juegan un importante papel en la carcinogénesis, clásicamente atribuido a la promoción de la división celular que tiene lugar tras la unión de estas hormonas a sus receptores¹⁰. Sin embargo, este no es el único mecanismo, dado que la metabolización de los estrógenos origina quinonas, semiquinonas, y radicales libres, que a su vez, inducen la formación de aductos y otras mutaciones en el ADN¹¹, que si no son correctamente reparadas, pueden conducir a una proliferación y diferenciación celular no reguladas¹⁰.

Los factores reproductivos son factores de riesgo bien establecidos, debido a que condicionan la exposición a estrógenos a lo largo de la vida y la estimulación estrogénica prolongada incrementa el riesgo de cáncer de mama^{10,12}. La actividad hormonal endógena es, con mucho, la más importante desde el punto de vista patogénico, si bien, la implicación de las fuentes exógenas, es ampliamente reconocida. En relación a las fuentes hormonales endógenas, destacan tres fenómenos: la duración del periodo fértil, el número de embarazos a término así como la edad a la que se producen y la lactancia.

La duración del periodo fértil está directamente relacionada con el riesgo de cáncer de mama, de modo que la menarquia temprana, sobre todo antes de los 12 años aumenta el riesgo 1'5 veces mientras que cada año de retraso de la menarquia, lo reduce un 4%¹³. La menopausia tardía duplica el riesgo respecto a la menopausia precoz, mientras que la privación estrogénica prematura, como se ha observado en las mujeres sometidas a ooforectomía, lo reduce^{12,13}.

En cuanto a la relación entre el embarazo a término y el desarrollo de cáncer de mama, se ha demostrado que las mujeres nulíparas presentan un riesgo 1'5 a 3 veces mayor, si bien, parece que las primíparas de más de 35 años tendría un riesgo igual o mayor que aquellas mujeres que no tienen descendencia^{13,14}. El embarazo tiene un efecto doble, a corto y largo plazo, ya que se asocia un incremento del riesgo inicial ligado al aumento de las hormonas circulantes, pero a la larga constituye un factor de protección, debido a la maduración del tejido mamario¹⁴. La mama puberal y la de las mujeres nulíparas están constituidas principalmente por estructuras lobulares y conductos indiferenciados. Los estudios con modelos animales han demostrado que las células epiteliales mamarias indiferenciadas tienen mayor susceptibilidad a la transformación neoplásica por acción de los carcinógenos que las células bien diferenciadas^{10,11}. Por tanto, un embarazo a término es un factor de protección frente al cáncer de mama porque provoca la diferenciación final del tejido mamario^{10,12}. Esta maduración se produce muy tardíamente en el caso de las primíparas mayores de 35 años, lo que sumado al incremento de los niveles circulantes de estrógenos propio de la gestación, hace que estas mujeres no se beneficien del efecto protector del embarazo a corto plazo.

En relación con la lactancia, se ha visto que está asociada a un menor riesgo de cáncer de mama antes de la menopausia y que la magnitud del efecto protector guarda relación con la duración del período de lactancia^{15,16}.

La implicación de los estrógenos exógenos ha sido muy discutida, si bien en la actualidad es ampliamente aceptada. La relación entre la terapia hormonal sustitutiva y el desarrollo de cáncer de mama ha sido objeto de gran controversia. Actualmente se acepta que este tipo de tratamiento conlleva un pequeño pero significativo incremento del riesgo, cuya magnitud estaría en relación con el tipo de terapia, la duración y la dosis de la misma^{9,13,17,18}. En cuanto al papel de los anticonceptivos hormonales se han publicado datos en uno y otro sentido, si bien parece que estos preparados confieren un moderado incremento del riesgo de desarrollar cáncer de mama que desciende progresivamente al suspender su uso y que desaparece a los 10 años de finalizado el tratamiento^{9,12,13,15,19}.

Otra hormona, en este caso no esteroidea, que se ha relacionado con el cáncer mama es la somatomedina o IGF-I (*Insulin Growth Factor I*), que estimula la proliferación de las células mamarias. La relación entre los niveles plasmáticos de IGF-I, su proteína transportadora IGFBP-3 y el cáncer de mama ha sido evaluada en estudios recientes, con resultados positivos en mujeres premenopáusicas^{20,21}.

1.2.2. Factores de riesgo ligados al estilo de vida y la dieta

El estilo de vida desempeña un papel, si no más, al menos tan importante como los factores genéticos.

Debido a que la dieta supone la exposición a una gran variedad de compuestos cancerígenos y anticancerígenos, los factores dietéticos han sido ampliamente estudiados. La asociación entre la elevada ingesta de grasas y el riesgo de cáncer de mama fue sugerido por varios estudios epidemiológicos que describieron una mayor incidencia de cáncer de mama en los países con elevado consumo de grasas^{15,22,23}, si bien algunos trabajos posteriores no han podido confirmar esta observación^{23,24}. Mediante estudios con modelos animales se ha demostrado que el

consumo excesivo de grasas poliinsaturadas se asocia a la elevación de los niveles circulantes de estrógenos y progestágenos¹². Esta discordancia puede deberse a la dificultad para evaluar la exposición individual a los factores dietéticos. No queda claro si el incremento del riesgo se debe únicamente al consumo total de grasas o a una ingesta calórica excesiva, casos en los que se ha observado una resistencia a la insulina debido a unos niveles permanentemente elevados de la hormona y de IGFs, que favorecen el recambio celular en la mayoría de los tejidos, y que se ha asociado con el desarrollo de cáncer de mama²⁰. También se ha propuesto que el consumo de frutas y verduras sería beneficioso debido a que la fibra inhibe la reabsorción de estrógenos en el tracto digestivo^{25, 26}, si bien no hay estudios concluyentes^{9,23}.

Los estudios epidemiológicos y experimentales en relación con los alimentos que contienen fitoestrógenos son contradictorios y sus resultados no permiten obtener conclusiones firmes. Estos compuestos, de débil actividad estrogénica pueden interferir con la acción y el metabolismo de los estrógenos endógenos. De hecho, existen distintos mecanismos de acción que harían preveer un efecto protector de estas sustancias. En cambio, estudios con animales muestran un efecto proliferativo sobre tumores homonosensibles²³.

La obesidad se asocia al cáncer de mama principalmente en mujeres postmenopáusicas¹³ debido a que en ellas la grasa periférica es la principal fuente de estrógenos^{12,15,20,23}. El aumento de peso que tiene lugar durante el período reproductivo de la edad adulta también se ha asociado con el desarrollo de cáncer de mama en la menopausia²⁷, sin que haya podido demostrarse claramente que la obesidad en el periodo infantil se asocie con esta patología^{20,23}.

El ejercicio físico moderado y regular disminuye el riesgo de cáncer de mama en todas las edades, mediante mecanismos como el retraso de la menarquía, la reducción del número de ciclos ovulatorios, el descenso en la concentración de insulina, la disminución de la producción ovárica de estrógenos, el peso y la grasa corporal²⁰.

La ingesta excesiva de alcohol aumenta la frecuencia de cáncer de mama, en función de la dosis²⁸. Entre los mecanismos propuestos se incluyen la influencia que ejerce sobre las concentraciones de estrógenos, la producción de radicales libres y metabolitos tóxicos como el acetaldehído y la alteración de la capacidad de reparación del ADN. Los polimorfismos de genes

implicados en su metabolización, como GST (glutathion-S-transferasas), también parecen estar implicados^{12,20}.

Los estudio epidemiológicos que han tratado de evaluar la asociación entre el hábito tabáquico y el cáncer de mama han vertido resultados contradictorios, probablemente debidos a la variabilidad en el diseño de los estudios, de la población incluida y de la evaluación de la exposición¹². Sin embargo, parece que el tabaco produce un incremento del riesgo en aquellas mujeres que empezaron a fumar en los cinco años siguientes a la menarquia, debido a que los carcinógenos del tabaco actuarían sobre la mama en desarrollo, pero no en aquellas que comienzan a fumar tras el parto, puesto que la mama habría completado su formación. No se ha demostrado ninguna asociación en el caso de las mujeres postmenopáusicas²⁹.

1.2.3. Antecedentes personales

Las lesiones benignas de la mama sin un componente proliferativo no parecen asociarse a una mayor incidencia de cáncer de mama. De este modo, la enfermedad fibroquística conlleva un aumento del riesgo de cáncer de mama bilateral únicamente en los casos en que se acompaña de hiperplasia ductal atípica.⁹

El carcinoma ductal *in situ* es considerado el paso previo del carcinoma invasivo, transformación que precisa una media de 6 a 10 años. En cambio, el carcinoma lobulillar *in situ* suele ser multicéntrico y bilateral y no se considera estrictamente un lesión precancerosa, sino un marcador de riesgo de padecer cáncer de mama³⁰.

Tras haber desarrollado un cáncer de mama, el riesgo de afectación contralateral se incrementa hasta 10 veces⁹.

La presencia de un patrón mamográfico de alta densidad es un factor de riesgo al que se le concede una importancia creciente. Varios estudios epidemiológicos describen un aumento del riesgo de entre 1'8 a 6 veces en las mujeres con patrones mamográficos más densos³¹⁻³³. Este incremento del riesgo se ha relacionado con el hecho de que las mamas más densas

desarrollarían con más frecuencia lesiones premalignas del tipo hiperplasia ductal atípica, y con la presencia de una aromatasa hiperactiva en la mama que incrementaría la producción local de estrógenos^{31,32}. Esta densidad mamaria depende de los niveles hormonales, por lo que varía en función de las variables reproductivas y de otros factores ambientales como la dieta, pero por otro lado, tiene también un fuerte componente genético, como demuestran los estudios en gemelos homo y heterocigotos³⁴.

Una historia familiar de cáncer de mama, aumenta la probabilidad individual de padecerlo, si bien la magnitud del riesgo varía dependiendo del grado de parentesco con el familiar afecto, de su estado hormonal y de si la enfermedad es o no bilateral³⁵. Así en mujeres cuya madre o hermana han padecido cáncer de mama, la probabilidad de padecerlo ellas mismas se incrementa hasta 3 veces, aumentando hasta 9 veces en el caso de que el familiar de primer grado sea una mujer premenopáusica con afectación bilateral³⁰.

1.2.4. Exposiciones ambientales y ocupacionales

La exposición a radiaciones ionizantes, antes de los 40 años, principalmente durante la infancia y la adolescencia, cuando las glándulas mamarias no han alcanzado aún su madurez, es un importante factor de riesgo. Se ha establecido una relación lineal entre la dosis total recibida y el incremento del riesgo^{9,36}.

Mediante modelos animales se han identificado más de 200 sustancias que actúan como carcinógenos mamarios y unas 250 que mimetizan o interfieren con la actividad de los estrógenos. Las sustancias más estudiadas han sido los compuestos orgánicos persistentes, principalmente los PCBs (Policloruro de Bifenilo), donde se incluyen el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) y sus metabolitos. Aunque los resultados de los estudio epidemiológicos son poco consistentes sugieren que la exposición al PCB podría incrementar hasta en un 10-15% el riesgo de desarrollar un cáncer de mama en las mujeres portadoras de algunas variantes genéticas responsables de su metabolización^{37 38}.

Otras exposiciones ocupacionales de riesgo incluyen el estireno, los solventes orgánicos, el óxido de etileno, y los campos electromagnéticos^{37,38}.

1.2.5. Susceptibilidad genética

Como se apuntó anteriormente, una historia familiar de cáncer de mama es uno de los factores de riesgo más importantes para desarrollar la enfermedad. Ya en 1866 el anatomista francés Pierre Paul Broca publicó el caso de la familia de su esposa en la que 10 de sus miembros, a lo largo de cuatro generaciones, habían fallecido a consecuencia de un cáncer de mama³⁹. Desde entonces, se han realizado numerosos trabajos para tratar de estimar el riesgo de una mujer de padecer este tipo de cáncer, en función del número de familiares afectas, del grado de parentesco y de la edad al diagnóstico. Así, hoy sabemos que si una mujer tiene un cáncer de mama, el riesgo de sus familiares de primer grado es el doble de la población general, mientras que si hay tres o más familiares de primer grado diagnosticados de cáncer de mama, el riesgo relativo es de cuatro^{35,40}. Factores como la juventud al diagnóstico o la bilateralidad, incrementan aún más el riesgo, que puede ser hasta 9 veces más alto que el de una mujer sin antecedentes familiares de cáncer de mama^{41,42} (Figura 2.)

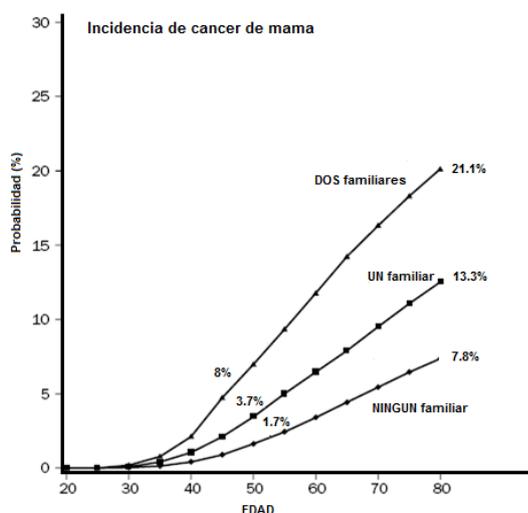


Figura 2: Probabilidad de que una mujer desarrolle cáncer de mama a lo largo de su vida según el número de familiares afectados³⁵

Observaciones similares llevaron a Penrose en 1948 a plantearse la existencia de una posible alteración genética heredable como responsable de la agregación familiar⁴³, hecho que en parte se confirmó cuando a mediados de los años 90, se descubrió que mutaciones en los genes BRCA 1 y 2 (*Breast Cancer 1 y 2*) eran responsables del síndrome de cáncer de mama y ovario hereditarios ^{44 45}. Actualmente se considera que sólo el 5-10% de los cánceres de mama son hereditarios y que las mutaciones en BRCA 1 y BRCA 2 únicamente explican el 15-20% de todos los casos. Otros genes alterados en síndromes de cáncer familiar son p53, PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) y AMT (*Ataxia-Teleangiectasia Mutated*) que explicarían menos de un 10% de los cánceres de mama familiares ^{41,46}. Existe, por tanto, un gran porcentaje de familias con historia de cáncer de mama en varios de sus miembros en los que no se encuentra mutación en ninguno de los genes de alta penetrancia descritos. Esta agregación podría deberse a tanto a factores genéticos como ambientales, si bien los estudios en gemelos, la incidencia de afectación contralateral en las pacientes con cáncer de mama y el patrón de herencia familiar, resaltan el papel de los genes ⁴⁷, que podría deberse a la existencia de un hipotético “BRCA X” no identificado hasta la fecha ⁴¹, si bien esta hipótesis parece cada vez menos probable⁴⁸.

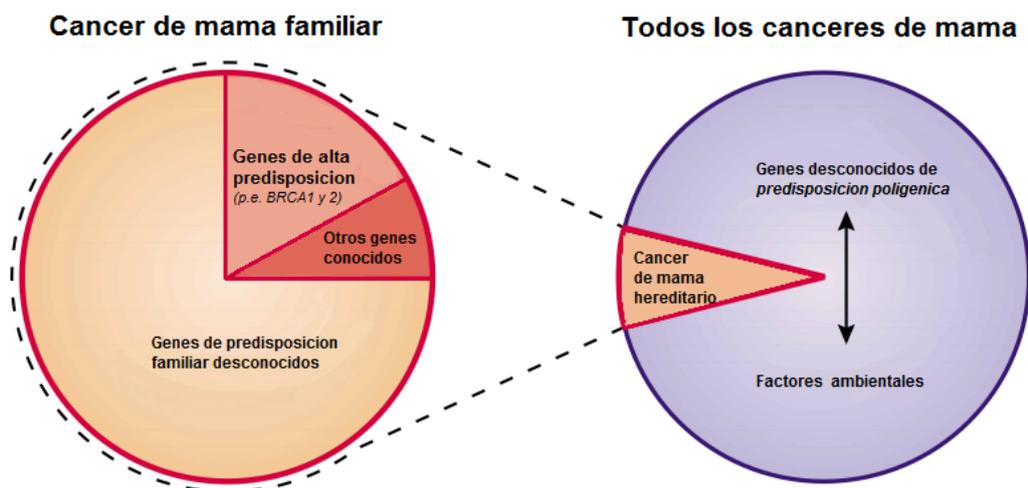


Figura 3: Susceptibilidad genética al cáncer de mama⁴⁶

Pero la explicación más ampliamente aceptada para esta agregación familiar y para la gran mayoría de los casos esporádico se encuentra en el Modelo Poligénico de susceptibilidad al cáncer, según el cual, la susceptibilidad heredada al cáncer de mama de un individuo no dependería de un único gen de alta predisposición sino que estaría determinada por la herencia de un conjunto de variantes alélicas de múltiples genes de baja predisposición^{48,49}. Este modelo se discute con mayor detalle en el apartado 2 de la Introducción (Genes y susceptibilidad al cáncer).

1.2.6. Modelos predictivos del riesgo de cáncer de mama

Con la intención de establecer las medidas de prevención primaria más adecuadas a cada caso, en las últimas décadas se han desarrollado varios modelos, tanto estadísticos como empíricos, que permiten estratificar a las mujeres según su riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida.

La mayoría de ellos sólo tienen en cuenta los antecedentes familiares, y únicamente los modelos de Gail⁵⁰ y Tyrer-Cuziack⁵¹ incluyen otros factores de riesgo no hereditarios para el cálculo. El hecho de que el riesgo estimado por unos y otros modelos sea en ocasiones discordante, y la necesidad de programas de cálculo complejos, ha limitado el uso de estos algoritmos en la práctica clínica diaria.

El primero de estos modelos lo publicó Michelle Gail en 1989⁵⁰. Gail analizó el riesgo de que una mujer de una determinada edad, desarrollara un carcinoma invasor o *in situ* a lo largo de la vida. En su estudio sólo incluyó mujeres caucásicas que participaban en un programa de cribado del cáncer de mama mediante mamografía anual. Encontró que los mejores predictores del riesgo de cáncer de mama en esta población eran: el número de familiares de primer grado con antecedentes de cáncer de mama, la edad de la menarquía y del primer embarazo a término y la realización de biopsias previas de la mama⁵². Validaciones posteriores de este algoritmo en otras poblaciones encontraron que el modelo era muy bueno para predecir la probabilidad de cáncer de mama al estratificar para un determinado factor de riesgo, pero su capacidad de predecir el riesgo de una mujer en particular era mucho más modesto⁵³. Con intención de mejorar la capacidad predictiva del modelo, Gail añadió recientemente la información del genotipado de siete y

posteriormente de diez polimorfismos en diferentes genes que previamente habían sido asociados con el cáncer de mama, pero esto no se tradujo en un aumento significativo de la capacidad predictora del modelo^{54,55}, probablemente debido a que los datos de incidencia y prevalencia de cáncer de mama que utiliza son los de los años ochenta y noventa⁵⁶.

El modelo de Claus, publicado en 1990⁵⁷ y modificado en 1994⁴⁰, estima el riesgo de cáncer de mama en función del número de familiares de primer grado afectas y de la edad de diagnóstico, pero no incluye ningún de los factores no hereditarios.

BRCAPRO⁵⁸ se desarrolló tras el descubrimiento de BRCA1 y 2 y estima la probabilidad de encontrar una mutación en estos genes en una determinada familia, pero no incluye ningún otro factor. BOADICEA⁵⁹ tampoco incluye ningún factor no hereditario, pero en cambio añade el efecto de un componente poligénico, que explicaría los casos de agregación familiar que no se deben a mutaciones en BRCA.

El modelo más reciente es el denominado Tyrer-Cuzick⁵¹ en el que se integran factores genéticos tales como la historia familiar y la prevalencia de mutaciones de BRCA en la población y otros genes de baja penetrancia, marcadores surrogados de la exposición endógena a estrógenos (edad de la menarquía y menopausia, paridad y edad del primer embarazo a término), el Índice de Masa Corporal y la presencia de lesiones benignas en la mama. Los estudios de validación sugieren que en general, éste es el modelo que mejor predice el riesgo de cáncer de mama⁵⁶, sin embargo, sobreestima el riesgo en las mujeres con hiperplasia atípica de la mama⁶⁰.

1.3 CLASIFICACIÓN DEL CARCINOMA DE MAMA

1.3.1 Clasificación histológica

Atendiendo a exclusivamente a características morfológicas, el cáncer de mama se ha clasificado en los grupos histológicos que se muestran en la Tabla 2. El tipo más frecuente es el Carcinoma Ductal Infiltrante, que supone entorno al 70% de todos los casos, pero se distinguen hasta 20 tipos, algunos con muy baja incidencia. Los carcinomas tubulares, cribiformes y coloides,

se caracterizan por tener un buen pronóstico, mientras que en el caso de los carcinomas inflamatorio o metaplásico éste es bastante peor ⁹.

Tabla 2: Clasificación histológica del carcinoma de mama⁹.

Tipos histológicos	Frecuencia
Ductal	75%
Lobulillar	5-10%
Mucinoso (Coloide)	3-5%
Tubular	5%
Medular	5-7%
Inflamatorio	1-3%
Metaplásico	<1%
Paget	<1%
Tumores derivados de estructuras no glandulares: sarcomas, cutáneos, linfomas	1%
Metástasis de otros tumores	<1%

1.3.2. Clasificación del cáncer de mama según patrones de expresión génica

Tradicionalmente, el cáncer de mama se clasificaba únicamente en función de la morfología celular, de la determinación inmunohistoquímica de los receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), así como de la amplificación del *Human Epidermal Receptor 2* (HER2) y de parámetros clínicos como el tamaño tumoral, la afectación de ganglios linfáticos y la presencia de metástasis. En base a esto, se obtenían grupos con implicaciones pronósticas y terapéuticas, observándose que pacientes de un mismo grupo y tratadas de igual modo, presentaban distinta evolución, sin que pudieran establecerse las causas de tan diferente comportamiento.

Aunque la caracterización de los tumores de mama que expresan marcadores propios de célula basal y sus implicaciones pronósticas fueron descritas hace más de veinte años ^{8,61}, la clasificación de los carcinomas invasivos de la mama según patrones de expresión molecular no ha recibido atención por parte de la comunidad científica hasta su re-descubrimiento en los estudios de microarrays, cuando Perou et al⁶² propusieron que la variedad fenotípica y de comportamiento de los tumores de la mama podría correlacionarse con diferencias en los patrones de expresión génica, de modo que una vez determinados éstos, los tumores pudiesen ser

clasificados en subgrupos más homogéneos. Así, los tumores de la mama se clasifican actualmente en cuatro categorías principales atendiendo al patrón de expresión génica: Basal Like, Her2, Luminal A y Luminal B (Tabla 3).

Tabla 3: Clasificación del cáncer de mama según los grupos de expresión génica⁶³

SUBGRUPOS	EXPRESIÓN GÉNICA
Basal- Like	RE-, RP-, HER2-, CK 5/6+, CK17+ c-KIT+/-, EGFR+/-, integrina β 4, laminina, moesina, vimentina, P-cadherina, CAV1 y 2
HER2+	RE-, HER2+, (importante expresión de genes próximos a HER2)
Luminal A	RE++, RP +/-, HER2- CK 8+, CK 18+
Luminal B	RE+ , RP +/-, HER2+/-, alta expresión de Ki67 (Expresión moderada/baja de genes específicos del patrón luminal)

Los tumores luminales, reciben este nombre por su similitud con las células epiteliales que recubren la luz de los conductos mamarios. El patrón de expresión génica de los tumores de fenotipo basal-like remeda al de las células mioepiteliales del epitelio basal mamario normal, por lo que se supone que su origen se encuentra precisamente en tales células. En el trabajo inicial de Perou ya se constató que los tumores basalioides expresaban RE, RP y HER2 con mucha menor frecuencia que el resto de tumores no seleccionados y que lo inverso sucedía con EGFR, c-KIT^{62,64-67}. Nielsen⁶⁸ demostró que es posible distinguir los grupos luminales, basales y HER2 utilizando técnicas inmunohistoquímicas en vez de perfiles de expresión génica.

Estudios posteriores han corroborado los resultados de Perou⁶⁸⁻⁷⁰, han aumentado la lista de genes con expresión diferencial en los distintos grupos⁷¹⁻⁷⁴, han establecidos las diferencias pronósticas de estos subgrupos y han evaluado su respuesta a las diferentes opciones terapéuticas actualmente disponibles⁷⁵⁻⁷⁸.

1.3.3. Clasificación TNM

En la Tabla 4 se muestra la clasificación TNM (UICC-AJCC), que atendiendo al tamaño tumoral (T), las metástasis en ganglios regionales (N) y la existencia o no de metástasis a distancia, establece diferentes grupos con significación pronóstica (Tabla 5).

Tabla 4: Clasificación TNM del cáncer mama. 6ª edición, 2003. (www.UICC.org)

TUMOR PRIMARIO (T)	
Tx: Tumor primario no puede ser valorado	
T0: Sin evidencia de tumor primario	
Tis: Carcinoma <i>in situ</i> :	
	Tis (DCIS): Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
	Tis (LCIS): Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
	Tis (Paget): Enfermedad de paget del pezón sin tumor
T1: Tumor ≤ 2 cms	
	T1mic: Microinvasión ≤ 1 cm
	T1a: Tumor >0.1 y ≤ 0.5 cm
	T1b: Tumor >0.5 y ≤ 1 cm
	T1c: Tumor >1 y ≤ 2 cm
T2: Tumor >2cms y ≤ 5 cms	
T3: Tumor >5 cms	
T4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a :	
	T4a: Pared torácica, sin incluir músculo pectoral
	T4b: Piel con edema, ulceración o nódulos dérmicos satélites
	T4c: T4a + T4b
	T4d: Carcinoma inflamatorio
GANGLIOS LINFÁTICOS (pN)	
pNx : Los ganglios no pueden ser evaluados (extirpados previamente)	
pN0: No metástasis histológicas en ganglios	
pN1: Metástasis en 1 a 3 gl axilares y/o en gl de la mamaria interna con enfermedad microscópica en el ganglio centinela (GC), clínicamente no aparente:	
	pN1mic: Micrometástasis (>0.2 mm y ≤2.0mm)
	pN1a: Metástasis de 1 a 3 ganglios axilares
	pN1b: Mts en gl de la mamaria interna con enfermedad microscópica en el GC extirpado
	pN1c: Mts en 1-3 gl axilares y en gl de la mamaria interna con enfermedad microscópica en el GC
pN2: Metástasis de 4 a 9 ganglios axilares o ganglios de la mamaria interna aparentes clínicamente, en ausencia de ganglios axilares metastáticos:	
	pN2a: Mts en 4 a 9 ganglios axilares (uno al menos con tumor > 2 mm)
	pN2b: Mts en gl de la mamaria interna clínicamente aparentes, en ausencia de mts en gl axilares.
pN3: Mts en 10 o más gl axilares, o en gl infraclaviculares, o en gl de la mamaria interna clínicamente aparentes en presencia de 1 o más gl axilares, o más de 3 gl axilares con gl de la mamaria interna microscópicamente negativos, o con gl supraclaviculares ipsilaterales:	
	pN3a: Mts en 10 o más gl axilares, o mts en gl infraclaviculares.
	pN3b: Mts en gl ipsilaterales de la mamaria interna clínicamente aparentes en presencia de ≥ 1 gl axilares positivos, o > 3 gl axilares con gl de la mamaria interna con enfermedad microscópica en el GC extirpado, no aparente clínicamente.
	pN3c: Mts en gl supraclaviculares ipsilaterales
METÁSTASIS	
Mx: La metástasis no pueden ser evaluadas	
M0: No existen metástasis a distancia	
M1: Presencia de metástasis a distancia	

Tabla 5: Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) a 5 años según el Estadio TNM ³⁰

ESTADIO	TNM	% SLE a 5 años
Estadio I	T1N0M0 (incl T1mic)	80
Estadio IIA	T0N1M0	75
	T1N1M0	
	T2N0M0	
Estadio IIB	T2N1M0	75
	T3N0M0	
Estadio IIIA	T0N2M0	55
	T1N2M0	
	T2N2M0	
	T3N1M0	
	T3N2M0	
Estadio IIIB	T4N0M0	35
	T4N1M0	
Estadio IIIC	T4N2M0	25
Estadio IV	Cualquier T, N3M0	10
Global	Cualquier M1	65

2. GENES Y SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER

2.1. Cáncer como enfermedad genética

El cáncer es una enfermedad compleja y heterogénea que surge por las interacciones de factores genéticos y ambientales tras los cuales una célula escapa de los controles sobre su división y diferenciación. Durante el proceso, la célula adquiere nuevas características que le conducirán a proliferar muy rápidamente, evadiendo las señales de apoptosis. Así mismo, inicia un proceso de dediferenciación y adquiere la capacidad de dividirse de forma indefinida, al tiempo que es capaz de alcanzar nuevos tejidos y órganos e invadirlos. Algunas de estas células tumorales, son capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, abandonar el tumor primario y atravesar la matriz extracelular que las rodea, alcanzar el torrente circulatorio, sobrevivir en él y posteriormente abandonarlo atravesando las paredes de los capilares localizadas en lugares distantes del organismo, invadiendo nuevamente la matriz extracelular e iniciando en la nueva localización, un tumor secundario⁷⁹.

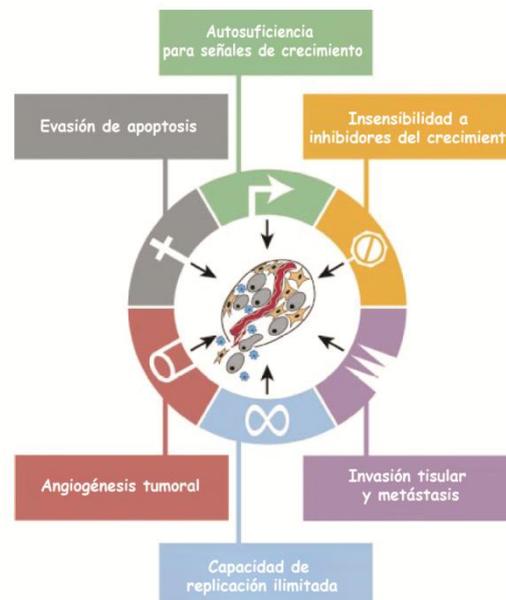


Figura 4: Propiedades que adquieren las células durante la transformación tumoral ⁷⁹

Finalmente, esta metástasis, inicialmente microscópica, continuará su división ilimitada hasta formar una nueva masa tumoral. Para ello, requerirá la formación de nuevos vasos que le permitan crecer y diseminar sus células para dar lugar a la aparición de nuevas metástasis a distancia. (Figura 4) ⁷⁹.

El proceso de la transformación tumoral de una célula, puede iniciarse por la alteración de los genes que conocemos como Oncogenes y genes Supresores, pero rara vez un único defecto es suficiente para el desarrollo de un tumor. Para que las células adquieran todas las capacidades anteriormente descritas necesitan de la adición sucesiva de numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas que aún no han sido bien caracterizadas. Estas alteraciones afectan tanto a diferentes funciones de la célula tumoral como a las células de su entorno⁷⁹.

Los Proto-oncogenes son genes que, en las células normales, promueven el crecimiento y la proliferación celular o inhiben la muerte celular programada (apoptosis). En un sentido más amplio, podrían incluirse a todos aquellos genes que inhiben procesos de diferenciación y los que promueven procesos como la angiogénesis, invasividad, metástasis, etc. Las mutaciones en ellos producen una ganancia en su actividad, pasando a denominarse oncogenes^{80,81}.

Los genes supresores son aquellos que frenan la proliferación celular, ya que regulan de forma negativa la división y el crecimiento de las células. Para que favorezcan el desarrollo tumoral es necesario que las proteínas codificadas por ellos no sean funcionales lo que supone que o bien se alteren los dos alelos o que la mutación de uno de uno de ellos dé lugar a una proteína que inactive la del alelo normal, por lo que las alteraciones de estos genes se consideran recesivas. A su vez, se dividen en “*gatekeepers*” y “*caretakers*”. Los primeros, están directamente implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Cuando se produce la pérdida de función, fallan los mecanismos de control y la célula adquiere una ventaja proliferativa respecto al resto. Los genes “*caretakers*” en cambio, controlan la replicación del ADN, la transcripción, la reparación del ADN y los *checkpoints* del ciclo celular. Estos genes son por tanto, los encargados de mantener la integridad del genoma⁸⁰⁻⁸².

2.2. Genes de alta penetrancia

De forma general, las células de un tumor se originan mediante la expansión clonal de una única célula, y las células hijas heredan las mutaciones de la madre. Pero estas alteraciones genéticas no son transmitidas por un progenitor a sus hijos, a menos que estén presentes en las células germinales, en cuyo caso estaríamos ante un síndrome hereditario de predisposición al cáncer⁸³.

Por otro lado, el hecho de heredar una mutación patogénica en uno de los genes críticos del cáncer, ya sea un oncogen o un gen supresor, no implica que el individuo vaya a desarrollar de un tumor. Se define como penetrancia genética la proporción de individuos de una población que, presentando un determinado genotipo (mutación en un alelo), expresa un determinado fenotipo (en este caso cáncer). Cuando todos los portadores de la mutación desarrollan cáncer, se dice que la penetrancia es completa, y en caso contrario incompleta, pudiendo ser más alta o más baja.

Si bien la mayoría de los síndromes de cáncer familiar se deben a mutaciones en genes de alta penetrancia, principalmente genes supresores, solamente las mutaciones de p53 (Síndrome de Li-Fraumeni) y del gen APC (Síndrome de Poliposis Adenomatosa Familiar) presentan una penetrancia completa. Las mutaciones de BRCA, en cambio, tienen una penetrancia entorno al 60-80% dependiendo de las poblaciones⁸⁴.

BRCA1 y BRCA2 fueron los dos primeros genes de alta penetrancia relacionados con el cáncer de mama hereditario y aunque en un principio se pensó que sería posible encontrar mutaciones de estos genes en todos los casos de cáncer de mama familiar, hoy sabemos que sólo son responsables del 15-20% de los casos^{44,85,86}. La probabilidad de encontrar una mutación en estos genes en una familia aumenta con el número de miembros afectados, de manera que se han encontrado en el 80% de las familias con más de 6 casos de cáncer de mama y en un tercio de las familias con 4 o 5 casos⁸⁷. Los primeros estudios sobre la incidencia de cáncer de mama en las portadoras de mutación en los genes BRCA 1 y 2, estimaban entorno al 75-80% la probabilidad de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida, mientras que en trabajos posteriores, este porcentaje varía ostensiblemente⁴¹. En población española, la probabilidad de desarrollar cáncer

de mama de las mujeres portadoras de mutaciones en BRCA1, se ha estimado entorno al 52% y al 48% si el gen alterado es BRCA2⁸⁸. Por tanto, aunque la penetrancia de estos genes es muy alta, no es completa y a pesar de que se ha sugerido podría estar modulada por diferentes genes como NAT2, CYP1A1, GSTT1 o por la presencia de polimorfismos en diferentes genes, el mecanismo que regula la penetrancia de los genes BRCA no ha sido aún establecido^{41,89}.

Se han descrito otros genes de alta penetrancia responsables de diferentes síndromes hereditarios que cursan con cáncer de mama como son p53, PTEN y AMT (Tabla 5) que explicarían en conjunto otro 10% de los casos de cáncer de mama familiar ^{41,46}.

Tabla 5. Síndromes de cáncer hereditario que presentan cáncer de mama⁴²

Síndrome	Gen	Otras neoplasias asociadas
Cáncer de mama y ovario hereditario	BRCA1 y 2	Ovario, próstata, páncreas, vía biliar, SNC.
Li-Fraumeni	P53	Sarcomas óseos y de partes blandas, leucemia, SNC y adrenocorticales
Cowden	PTEN	Tiroides, ovario, trichilemoma facial y papilomas orales
Muir-Torre	MSH2, MLH1	Colorrectal, Genitourinario.
Peutz-Jeghers	STK1, LKB1	Pólipos hamartomatosos, colon, estómago, páncreas, tiroides, pulmón, útero y ovario
Ataxia-Teleangiectasia	ATM	Leucemia y linfoma.

2.3. Genes de baja penetrancia

Los estudios en cáncer familiar y la identificación de genes de alta susceptibilidad han contribuido a un mayor entendimiento de los mecanismos de carcinogénesis y de la biología tumoral, pero solamente el 5-10% de los tumores tiene un componente hereditario, de modo que las variante alélicas implicadas en estos casos tienen un gran impacto para el individuo, pero su contribución a la incidencia del cáncer a nivel poblacional es muy pequeña. Los estudios realizados en gemelos homo y heterocigotos demostraron que la agregación familiar que se

observa en el cáncer de mama se debe principalmente a factores genéticos heredados, más que a factores ambientales o al estilo de vida⁴⁷, y se sugirió que debía existir otro grupo de genes que, predisponiendo al cáncer, presentasen una baja penetrancia.

Para explicar la incidencia de los tumores esporádicos, estos genes deberían presentar variaciones estructurales que alterasen su función con una frecuencia mucho mayor que las mutaciones patogénicas de los genes de alta penetrancia. El análisis de estas variantes polimórficas ha sido, y sigue siendo, la única estrategia viable para identificar estos genes de baja penetrancia⁹⁰. Así, mediante diferentes tipos de estudios de asociación y en menor medida mediante estudios de ligamiento, se han identificado multitud de polimorfismos, principalmente en genes que intervienen en funciones celulares como la reparación del ADN o el metabolismo de carcinógenos tanto endógenos como exógeno, aunque también en genes supresores de tumores e incluso en oncogenes, si bien son mucho menos frecuentes⁹¹. Cada una de estos genes de baja penetrancia confiere un riesgo individual ≤ 1.3 , pero su efecto podría ser aditivo o incluso multiplicativo⁹², de modo que cada vez parece ser más aceptado que la principal fuente de predisposición heredada al cáncer se debe al efecto de la combinación de diferentes variantes genéticas en múltiples loci, lo que se conoce como Modelo Poligénico de susceptibilidad al cáncer^{48,93,94}.

Por otro lado, cada vez hay más estudios que analizan el efecto de estos genes sobre la incidencia de cáncer en relación con la exposición a diferentes factores ambientales como el tabaco o la radiación ultravioleta, corroborados mediante modelos animales^{91,94}. La susceptibilidad del individuo a desarrollar cáncer tras la exposición a diferentes carcinógenos del ambiente, estaría condicionada, por ejemplo, por la capacidad de reparar el ADN que tenga la combinación de genes reparadores que haya heredado de sus padres⁹³, lo que explicaría por qué no todos los individuos expuestos a un factor de riesgo asociado con un determinado tipo de tumor lo desarrollan.

En relación con el cáncer de mama, puede que la respuesta a por qué ni todas las nulíparas obesas, ni todas las fumadoras con terapia hormonal sustitutiva (THS) desarrollan cáncer de mama a pesar de que la nuliparidad, la obesidad, el hábito tabáquico y la THS son

conocidos factores de riesgo, esté en las variantes funcionales de los genes modificadores, lo que se conoce como.

La mayoría de estas variantes confieren un riesgo individual ≤ 1.3 , pero su efecto podría ser aditivo o incluso multiplicativo ⁹² y su interés radica en el hecho de que combinados, podrían utilizarse para establecer modelos que estimen el riesgo individual, y adecuar a cada caso las medidas de prevención primarias y secundarias⁹⁵⁻⁹⁷. De hecho, la predisposición al cáncer debida a la combinación de estas variantes podría ser de mayor interés para la salud pública que la predisposición debida a los genes de alta penetrancia⁹⁴.

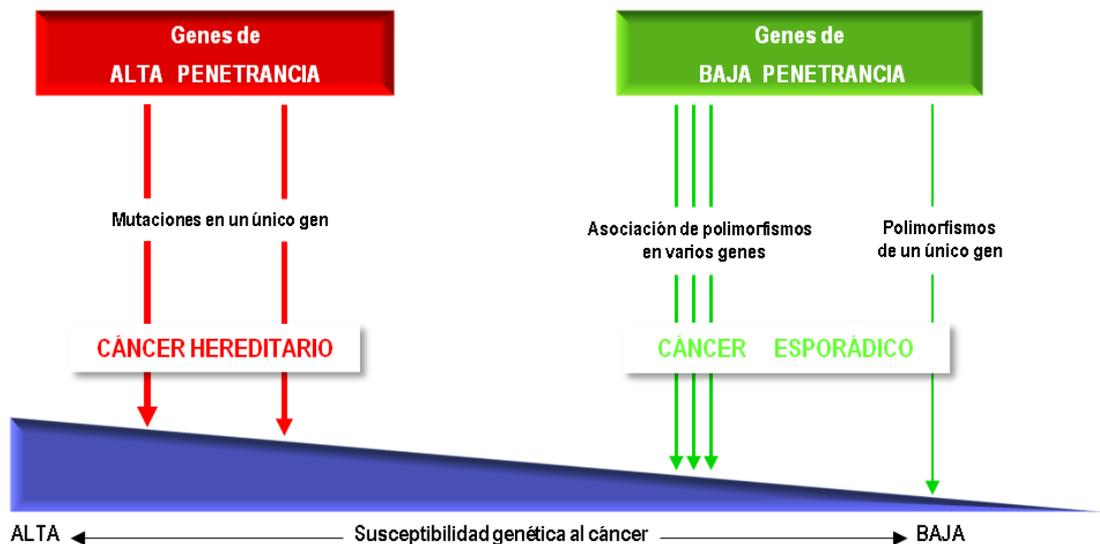


Figura 5: Esquema de la susceptibilidad heredada al cáncer

2.4. Polimorfismos

Un polimorfismo se define como la existencia de dos o más formas alternativas de un gen en una población, de modo que la variante menos frecuente no pueda ser explicada por una mutación patogénica recurrente, para lo cual, debe estar presente en más del 1% de los individuos⁹⁸.

Se estima que existen más de 10 millones de polimorfismos en el genoma humano, que aparecen con una frecuencia relativamente alta en la población, y a diferencia de las mutaciones patogénicas, conllevan un escaso o nulo incremento del riesgo de cáncer por sí mismas. Es necesaria la concurrencia de varios polimorfismos que actúen de forma sinérgica o de mutaciones patogénicas en otros genes o de determinadas circunstancias ambientales, (p.e. exposición a carcinógenos) para que estos modificadores tengan algún efecto sobre el desarrollo de cáncer, sobre la agresividad del fenotipo o sobre la respuesta al tratamiento quimioterápico⁴⁶.

Los polimorfismos, al igual que las mutaciones, pueden consistir en la sustitución de un nucleótido por otro, en la inserción de uno o varios nuevos o en la delección de nucleótidos previamente existentes. Estos procesos pueden afectar a un número variable de bases, pero lo más frecuente es que sólo se afecte uno, lo que se denomina *Single Nucleotide Polymorphism* o SNP⁹⁹.

Los polimorfismos pueden localizarse en regiones codificantes o no codificantes del ADN. A aquellos que en las regiones codificantes producen un cambio de aminoácido se les denomina no sinónimos. Si este cambio introduce un codón de parada, se llama entonces polimorfismo *nonsense*, mientras que si codifica un nuevo aminoácido, será un polimorfismo de cambio de sentido (*missense*). Si el polimorfismo al traducirse no produce ninguna alteración en la secuencia aminoacídica se dice que es sinónimo o silente. Los polimorfismos de las zonas no codificantes son también muy importantes porque pueden producir una alteración del *splicing*, o impedir la unión de factores de transcripción⁹⁹.

Los polimorfismos no sinónimos que inducen un cambio de aminoácido son los que más fácilmente alteran la función de la proteína, y en consecuencia, son los más estudiados.

2.4.1. Estudio de polimorfismos en genes de baja penetrancia

Como se señaló anteriormente, la mejor forma de identificar los genes de baja penetrancia es mediante el estudio de sus polimorfismos, que puede llevarse a cabo mediante dos tipos de análisis: el estudio del desequilibrio de ligamiento (DL) o estudios de asociación en casos y controles.

2.4.1.1. Estudios de desequilibrio de ligamiento:

En el genoma existen genes separados por cientos o incluso miles de bases en la cadena del ADN que se segregan de forma conjunta durante la meiosis, lo que se conoce como desequilibrio de ligamiento. Lo mismo sucede con algunos polimorfismos. Cuando estas variantes aparecen en los individuos que padecen una determinada enfermedad con más frecuencia que en aquellos que no la padecen, pensaremos que de uno u otro modo esos polimorfismos están implicados en dicha patología. Si las variantes no implican un cambio funcional del gen que pueda explicar la aparición de la enfermedad, cabe pensar que la causa sea algún otro gen de los que se encuentran en el espacio que separa los dos polimorfismos que se segregan conjuntamente¹⁰⁰.

Los estudios de DL se realizan mediante el análisis del ADN en familias con varios casos de la enfermedad o en parejas de gemelos donde uno está afecto y el otro no y tienen gran capacidad para detectar alelos poco frecuentes pero de alta predisposición con un mecanismo de herencia mendeliano. Pero para detectar el efecto de alelos comunes con escasa influencia sobre la enfermedad se precisa de muestras mucho mayores, de tamaño casi prohibitivo. Por ello, han sido muy utilizados para encontrar genes implicados en enfermedades monogénicas, pero han tenido menos éxito en el estudio de enfermedades multigénicas como el cáncer, a excepción de los síndromes de cáncer hereditario, donde permitieron la caracterización de BRCA1 y 2^{91,101}.

2.4.1.2. Estudios de Asociación Genética:

Los estudios de asociación buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado. Se trata generalmente de estudios de cohortes prospectivas o de casos-contróles en los que se establece el peso relativo del componente genético con respecto a otros factores como puede ser el ambiente en el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Estos estudios buscan relacionar un marcador genético particular con una enfermedad a través de una población, más que dentro de una familia. Precisan de muestras más pequeñas que

los estudios de DL y su poder estadístico para detectar los efectos de las variantes comunes es bastante mayor.

Existen dos acercamientos para establecer la asociación entre variantes genéticas y el riesgo de enfermedad: El estudio del “SNP candidato” y la “asociación indirecta”.

El primero es un test directo de asociación entre una variante potencialmente funcional y el riesgo de padecer una enfermedad. Se establece por tanto un gen candidato de antemano en base a estudios previos o de evidencia experimental biológica¹⁰⁰. Los SNP's son elegidos fundamentalmente en base a cuatro criterios: 1) el conocimiento previo de que son funcionales, 2) las variaciones de tipo *missense*, 3) que exista DL con las variables causales y 4) que exista un tecnología que permita el estudio.¹⁰⁰ Los polimorfismos *missense* son los que tienen más posibilidades de representar un cambio funcional, ya sea de pérdida o ganancia, por lo que la mayoría de los estudios se centran en ellos. Las variantes que no causan cambio de aminoácido pueden tener un impacto sobre la capacidad de reparación, si se sitúan en entrones reguladores de splicing o si causan inestabilidad del ARN, pero el uso de variantes no codificantes para determinar cambios en la función es mucho más complejo por el limitado conocimiento que tenemos sobre las secuencias reguladoras¹⁰².

En cambio, la asociación indirecta consiste en testar un mapa denso de SNP's bajo la suposición de que si existe un polimorfismo de riesgo este será o bien tipificado directamente o se encontrará en fuerte DL con uno de los SNP's estudiados. La ventaja de este último método es que no precisa la determinación de qué SNP's pueden ser funcionalmente importantes. La desventaja es que precisa el estudio de un número mucho mayor de SNP's. Los estudios de genotipado masivo (GWAs, *Wide Genome Association studies*) permiten el screening extenso y de alta densidad del genoma completo, para lo que utilizan cientos de miles de SNPs marcadores, de modo que inicialmente se genotipan entorno a 250.000 polimorfismos en miles de individuos (*fase I*). Después se seleccionan únicamente los SNP's que demuestran ser más significativos (unas decenas de miles) estudiándolos en nuevas cohortes (*fase II*) y finalmente se realiza un mapeo fino de los polimorfismos adyacentes a los validados, si se considera que estos no son los implicados en la patología pero que pudiera existir un DL (*fase III*)^{92,96,100,103,104}.

3. MECANISMOS DE REPARACION DEL ADN

La supervivencia a largo plazo de una especie puede aumentar gracias a cambios genéticos favorables en el proceso de selección natural, pero la supervivencia de cada individuo en particular requiere una estabilidad genética que le salvaguarde del desarrollo de tumores. La exposición a diferentes factores del medio ambiente o incluso del medio intracelular puede originar daños al ADN, pero sin duda, la principal fuente de mutaciones proviene de errores espontáneos durante la replicación del material genético. Para evitarlo, junto a mecanismos extremadamente precisos de replicación del ADN son necesarios otros que reparen las lesiones que se producen en él constantemente. Así, al igual que los genomas de otras especies, el humano codifica sistemas que le permiten mantener su propia integridad. Las enzimas reparadoras de ADN supervisan continuamente los cromosomas para corregir los daños en los nucleótidos producidos por factores ambientales como la radiación solar ultravioleta, radiaciones ionizantes o el humo del tabaco; productos del metabolismo celular normal como el agua oxigenada, las moléculas de oxígeno reactivas y ciertos metabolitos que actúan como agentes alquilantes; o la desaminación espontánea o inducida de citosina, adenina y guanina. Se estima que cada día se alteran unas 25000 bases por célula del total de 3×10^9 que contiene el genoma humano. Estos sistemas de reparación consiguen que menos de 1/1000 alteraciones accidentales se transformen en mutación que se transmita a las células hijas^{61,90,99,105}.

Se han descrito cuatro mecanismos principales de reparación del ADN: Mismatch Repair (MMR), Reparación por escisión de bases (BER), Reparación de rotura de doble cadena (DSBR), y Reparación por excisión de nucleótidos (NER). Son más de 130 los genes implicados en estos procesos, en los que se han identificado un gran número de polimorfismos, muchos de ellos con implicaciones funcionales^{102,106,107}.

Los genes que codifican las proteínas que reconocen el daño en el genoma y los encargados de repararlo, interactúan con los responsables del control del ciclo celular, de manera que la replicación y división de la célula se posterga hasta que las lesiones se hayan reparado. Si esto no se logra, se induce la apoptosis celular, evitando la transmisión del error a las células

hijas. Cuando estos mecanismos fallan y el daño permanece sin que la célula muera, ésta la transmitirá a sus células descendientes, pudiendo iniciarse la transformación tumoral¹⁰⁸. Los genes que intervienen en los diferentes mecanismos de reparación se comportan como “*caretakers*”, y su pérdida de función puede afectar directamente a la estabilidad de otros genes, incluidos los “*gatekeepers*”, ya que si se produce una mutación en un gen supresor que no es correctamente reparada, puede llevar a la pérdida de función supresora y a la carcinogénesis.

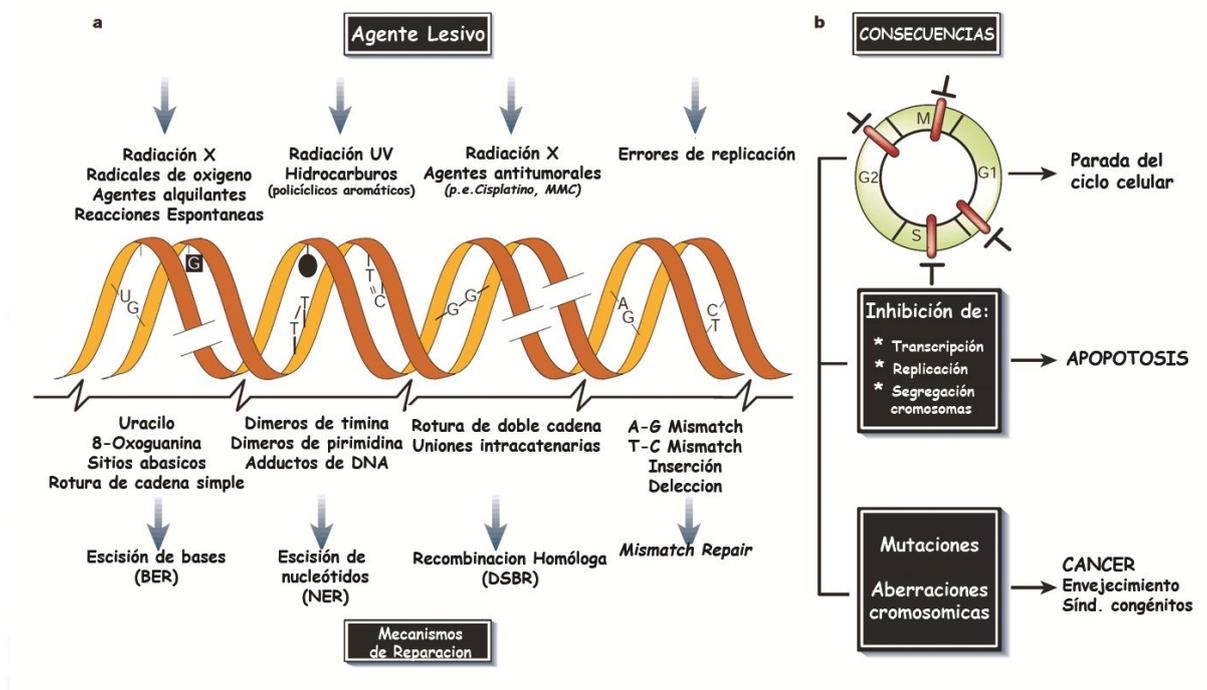


Figura 6: Diferentes mecanismos de reparación del ADN

La funcionalidad de cada una de estas vías en un individuo determinado es independiente, y se han caracterizado varios síndromes hereditarios con una alta predisposición al cáncer debidos a defectos en los genes que participan en estas vías (Tabla 6). Ahora bien, la gran mayoría de los tumores son esporádicos y tal y como se comentó en el punto 2.4. al explicar el modelo poligénico, lo que cada persona hereda es un conjunto de variantes en los genes reparadores de ADN que explicarían la susceptibilidad individual a desarrollar un determinado tipo de cáncer al exponerse a diferentes carcinógenos⁴⁶.

Tabla 6: Síndromes hereditarios por defectos en los mecanismos de reparación del ADN ⁴⁶

SÍNDROME	Mecanismo de reparación afectado	Alteración genómica observada	Tipos de cáncer más frecuentes
Xeroderma Pigmentoso	NER	Mut. Puntuales	Cutáneos
Cockayne	TCR	Mut. Puntuales	Ninguno
Tricotodistrofia	NER/TCR	Mut. Puntuales	Ninguno
Ataxia-Teleangiectasia	DSB	Alt. Cromosómicas	Linfomas
Nijmegen	DSB	Alt. Cromosómicas	Linfomas
BRCA1/BRCA2	HR	Alt. Cromosómicas	Mama y Ovario
Werner	HR	Alt. Cromosómicas	Varios
Bloom	HR	Alt. Cromosómicas	Leucemia, linfoma
Rothmund-Thomson	HR	Alt. Cromosómicas	Osteosarcoma
HNPCC	MMR	Mut. Puntuales	Colorrectal

MMR: Mismatch Repair; DSB: rotura de doble cadena; NER: Reparación por escisión de nucleótidos; HR: Recombinación Homóloga; TCR: Transcription-coupled repair; HNPCC: Cáncer de colon hereditario no polipósico

3.1. REPARACIÓN DE ALINEAMIENTOS ERRÓNEOS (Mismatch Repair - MMR)

La importancia del sistema MMR para mantener la estabilidad del genoma bacteriano se demostró hace más de 30 años con la observación de que defectos en estas vías se asociaban a una alta tasa de mutaciones espontáneas. Poco después se comprobó que los defectos en MMR en células humanas producían un aumento de la inestabilidad de todo el genoma, incluyendo unas regiones altamente repetitivas denominadas microsatélites, y que ésto se asocia con el desarrollo de tumores tanto hereditarios como esporádicos¹⁰⁹. La capacidad de este sistema para mantener la estabilidad genómica se ha asociado con la corrección de emparejamientos que se producen de forma errónea durante la replicación del ADN y el bloqueo de la recombinación entre secuencias similares pero no idénticas (Recombinación no Homóloga). Se ha visto que el sistema MMR

interviene también en los puntos de control del ciclo celular y en la muerte celular programada en respuesta a ciertos daños en el ADN¹¹⁰.

Este sistema de reparación, en el que intervienen una docena de genes, se inicia con el reconocimiento por parte del complejo hMutS, de los pequeños bucles generados por la inserción, deleción e incorporación errónea de bases y nucleótidos durante la replicación. La unión de hMSH2 con MSH6 forma hMutS α , que reconoce bucles de 1 o 2 nucleótidos, mientras que la unión de hMSH2 con MSH3, forma hMutS β , que identifica estructuras más complejas, si bien, existe cierta redundancia entre las funciones de ambos heterodímeros¹¹¹⁻¹¹³. hMLH1 interactúa con hPMS2, hMLH3, hPMS1 para formar tres posibles heterodímeros, denominados hMutL α , hMutL β y hMutL γ , respectivamente. Estos Thrs complejos tienen actividad ATPasa y actúan como nexos con las proteínas responsables de la escisión y síntesis.

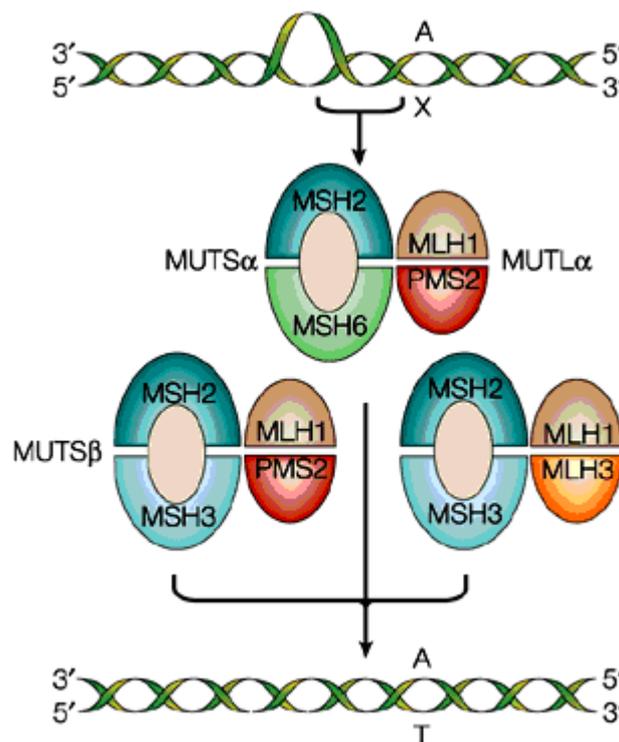


Figura 7. Principales genes implicados en el mecanismo MMR de reparación de ADN¹⁰⁵

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) favorece la unión de hMutS α y hMutS β al lugar del daño. Además interviene como enlace entre estos complejos y la ADN polimerasa en la horquilla de replicación, posiblemente facilitando el reconocimiento y reparación de la nueva

cadena. Para ello precisa de RFC (*Replication Factor C*), que facilita su unión al ADN ¹⁰⁵. La exonucleasa EXO1 escinde las secuencias erróneas, tras lo que las ADN polimerasas δ , α y ϵ , sintetizan la nueva cadena¹¹². Las ADN ligasas que finalizan el proceso no han sido bien caracterizadas hasta el momento.

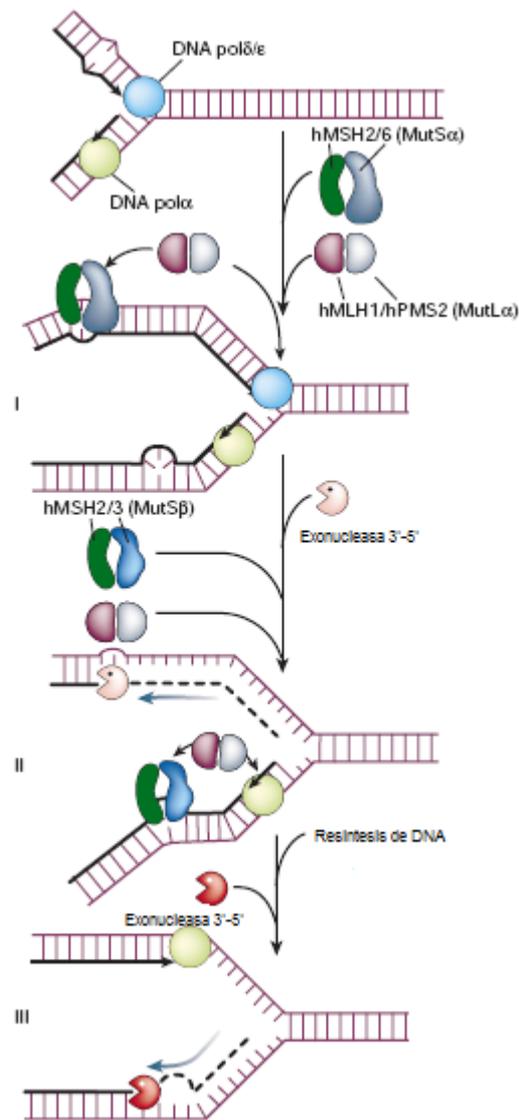


Figura 8: Esquema que representa la reparación por la vía MMR ¹⁰⁸

Los primeros estudios de inestabilidad genética, observaron que cuando el sistema MMR no funcionaba adecuadamente, se producía un aumento, una alteración en el número de repeticiones de los microsatélites. Dicha inestabilidad (MSI), se asoció inicialmente con el desarrollo de cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) debido a la presencia de una mutación inactivante en los genes MLH1, MSH2, MLH3, MSH6 y más rara vez en PMS2¹¹⁴. Trabajos posteriores demostraron que las formas esporádicas de cáncer de colon presentaban con cierta frecuencia alteraciones estructurales¹¹² o inactivaciones epigenéticas¹¹³ en estos mismos genes. Esta pérdida de MMR se ha observado también en tumores de endometrio, ovario, gástrico, cérvix, piel, pulmón, próstata, vejiga, mama y linfomas¹¹⁵. Por otro lado, se han publicado varios estudios que demuestran la importancia de MMR en la resistencia a quimioterápicos como temozolamida, cisplatino o 5-fluoruracilo ¹¹⁶.

3.2. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES (Base Escisión Repair-BER)

Algunos productos del metabolismo celular normal suponen una amenaza constante para la integridad del genoma, entre los que se incluyen las especies reactivas de oxígeno (aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) derivados de la respiración oxidativa y de la peroxidación de los lípidos. Además, algunas uniones químicas pueden romperse de forma espontánea en condiciones fisiológicas, como sucede con la hidrólisis de nucleótidos a 37°C^{107,117}.

La escisión de bases (BER) es el principal mecanismo de eliminación de bases alteradas o añadidas erróneamente. El reconocimiento de la lesión y la rotura del enlace N-glicosil entre la base nitrogenada y la desoxirribosa-fosfato se realizan a través de un conjunto de glicosilasas, enzimas clave de este proceso. Presentan gran especificidad de sustrato, aunque se ha descrito cierta redundancia. La más abundante es UNG, que elimina los residuos de uracilo que han sido incorporados en vez de timina. Poseen un dominio catalítico de hasta 250 residuos y utilizan las regiones amino y carboxilo terminales para realizar interacciones adicionales con la cadena complementaria. La eliminación de las bases nitrogenadas, puede suceder también de forma espontánea¹⁰⁸ (Figura 9).

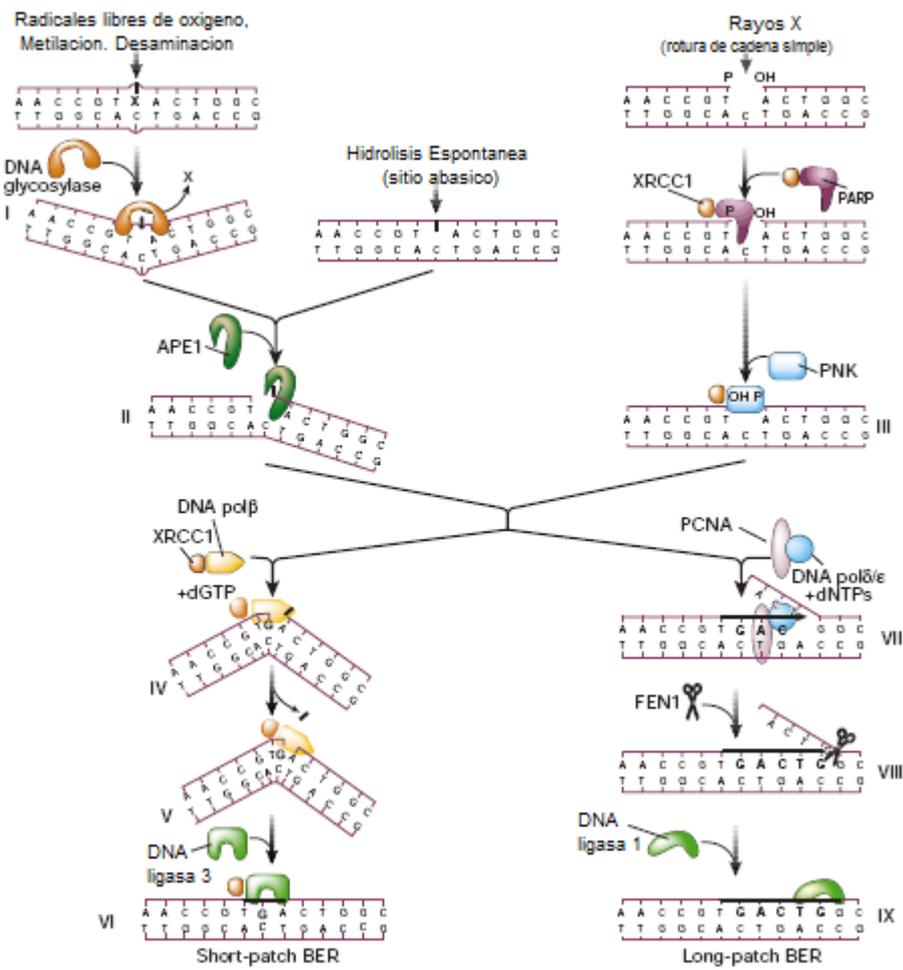


Figura 9: Mecanismo de reparación por Escisión de Bases ¹⁰⁸

La endonucleasa APE1 rompe el enlace fosfodiéster en el lugar donde se ha eliminado la base. En el caso de que la lesión sea una rotura de cadena simple inducida, por ejemplo, por radiación ionizante, PARP y PNK se unen a los extremos de la cadena de ADN a fin de protegerlos.

A partir de aquí, se conocen dos posibles vías de reparación: *Long-patch*, cuando se afectan varios nucleótidos y *Short-patch*, cuando solo se implica uno. Short-patch es el mecanismo

más frecuente, y en ella interviene POL β , que posee dos dominios que le confieren funciones diferentes: un pequeño dominio terminal NH $_2$ con actividad AP liasa y que sustrae el residuo de azúcar-fosfato abásico y otro dominio polimerasa propiamente dicho, con el que añade el nucleótido correcto. Además, interactúa con el complejo formado por XRCC1 y ADN ligasa III. XRCC1 actúa como proteína estabilizadora permitiendo la unión de la polimerasa y la ligasa al sitio de reparación, al tiempo que se une al ADN por su región amino-terminal ¹⁰⁸

En los casos en los que el residuo de azúcar-fosfato es estructuralmente más complejo y por tanto resistente a la actividad liasa de POL β , se emplea el mecanismo Long-patch, en el que la exonucleasa FEN1 elimina la región desplazada, evitando la formación de bucles durante la subsiguiente síntesis de ADN y la polimerasa POL δ es la encargada de incorporar los nucleótidos que faltan. PCNA estimula estas reacciones estabilizando las diferentes proteínas al igual que XRCC1 lo hacía en la ruta anterior. Finalmente, intervendría la ADN ligasa I (LIGI) ^{108,118}

Este mecanismo de reparación actúa a lo largo de todo el genoma, produciéndose en ocasiones el bloqueo de la transcripción, en cuyo caso se activa a la vez el mecanismo de TCR-NER (*Transcription Coupled-Nucleotide Escisión Repair*). Actualmente, no se conoce ninguna patología humana causada por déficits en este mecanismo de reparación, en parte debido a la redundancia de función de algunas glicosilasas y al citado solapamiento con TCR-NER. En estudios con modelos animales, se ha visto que la inactivación de las proteínas que intervienen en BER es letal.

3.3. REPARACIÓN DE LESIONES POR ROTURA DE DOBLE CADENA (DSBR)

La rotura de doble cadena, que constituye una de las lesiones más nocivas para la célula, puede producirse por productos del metabolismo celular como las especies reactivas de oxígeno, las radiaciones ionizantes, la rotura espontánea de cromosomas durante la replicación del ADN y algunos quimioterápicos como los inhibidores de la topoisomerasa II α . Paradójicamente, también pueden ser secundarios a la actividad de otros mecanismos de reparación, como la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)^{108,119}.

La célula dispone de dos sistemas para reparar estas lesiones: Recombinación Homóloga (HR, *homologous repair*) y Recombinación no homóloga (NHEJ, *Non-homologous end joining*). HR requiere una secuencia de ADN homólogo como molde, generalmente la cromátida hermana, por lo que solo puede llevarse a cabo tras la replicación del ADN, en las fases S y G2 del ciclo celular^{120,121}. En cambio mediante NHEJ, los extremos rotos son procesados por nucleasas y emparejados con otra secuencia de escasa o ninguna homología, por lo que es activa durante todo el ciclo, pero fundamentalmente durante G1, cuando no existe un cromosoma homólogo para que se produzca la recombinación¹²². La reparación mediante NHEJ es mucho más rápida, pero introduce errores, ya que se pierde la secuencia del lugar donde asienta la DSB y la unión de extremos de secuencias situadas en dos cromosomas diferentes, puede originar translocaciones^{107,120,121,123}. Que la célula elija uno u otro mecanismo depende por lo tanto de la fase del ciclo celular en que se encuentre, pero también del manejo inicial de la rotura de doble cadena. Si los extremos 5' son degradados por nucleasas para producir colas 3' de cadena sencilla, que son el sustrato de RAD51, entonces, se iniciara el mecanismo de HR, inhibiéndose la NHEJ¹²².

3.3.1. RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (HR)

La recombinación homóloga (HR) implica el intercambio de información entre regiones homólogas del genoma. Si el intercambio es recíproco, se denomina entrecruzamiento (*crossover*), mientras que no existe esta reciprocidad se denomina conversión génica (*non crossover*). En algunos casos, se produce una combinación de ambos¹²¹. (Figura 10). Además de ser una forma de reparación de las roturas de doble cadena, es esencial durante la meiosis, ya que es el mecanismo a través del cual se produce el intercambio de información entre las dos cromátidas¹²⁴.

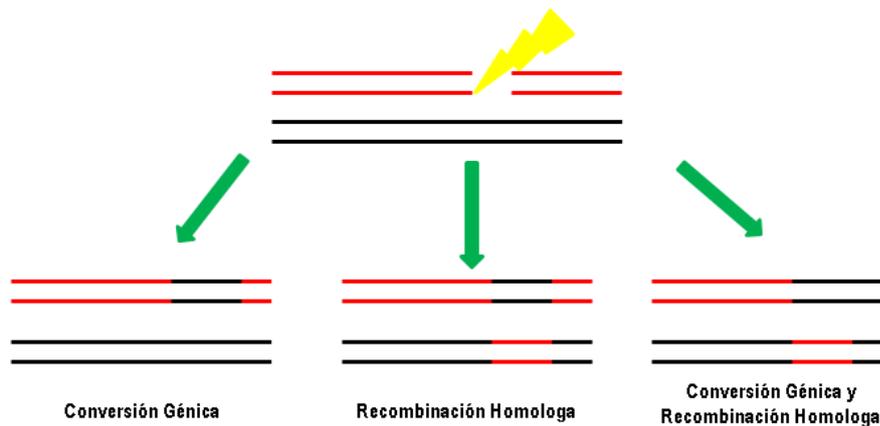


Figura 10: Posibles productos de la Recombinación Homóloga ¹²¹

El proceso se inicia mediante la adhesión a los extremos de la cadena de ADN de varias proteínas, fundamentalmente el complejo MRN, formado por MRE11, RAD50 y NSB1, y con actividad exonucleasa, que expone los bordes y añade unas colas de cadena simple en sentido 3'. La recombinasa RAD51 induce entonces la unión a las moléculas de ADN homólogas. La unión de RAD51 a la cadena simple de ADN (ssADN) está favorecida y regulada por su interacción con BRCA2 y catalizada por múltiples proteínas, como XRCC2, XRCC3, y varias isoformas de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, y RAD52), capaces de encontrar secuencias homólogas en todo el genoma y catalizar la reacción de intercambio formando un "loop" o anillo en la cadena de ADN. Si HR tiene lugar durante la mitosis, entonces el intercambio tendrá lugar con la cromátida homóloga, pero si se produce durante la meiosis, el ADN molde será similar, pero no necesariamente idéntico. Una vez que el intercambio se ha completado, el extremo 3' de la cadena invasora se alarga mediante una ADN polimerasa (Figura 11.a). A partir de aquí, el proceso puede proseguir por dos vías diferentes:

- *SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing)*: Una vez que la molécula de ADN rota ha unido a la hebra molde y se ha sintetizado uno de las cadenas, el anillo se rompe y la cadena nueva, sirve a su vez como molde para la cadena complementaria. (Figura 11.b)
- *DSBR (Double Strand Break Repair)*: (Figura 11.c) Si en vez de una, son las dos cadenas rotas las que se unen al ADN molde, se forman dos anillos en vez de uno. De esta forma, se originan unas estructuras de forma cruciforme, denominadas *Holliday Junctions*, en las que concurren

las hebras de las dos moléculas de ADN., Estos complejos son procesado por endonucleasas especializadas, que cortan las cadenas de maderas que generalmente mediante un mecanismo de *crossover*, si bien es cierto que según el punto de corte, puede no se produzca este entrecruzamiento sino una *conversión génica*^{120,121,123}.

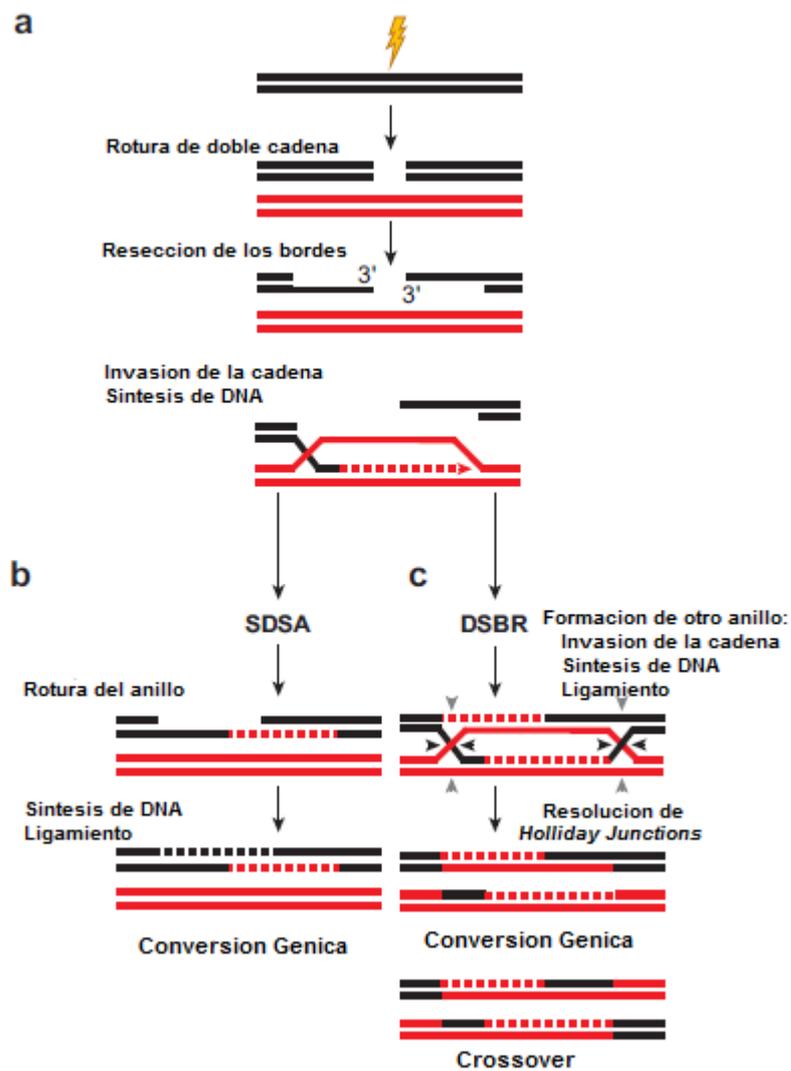


Figura 11: Reparación de Rotura de Doble Cadena por Recombinación Homóloga¹²⁴

3.3.2. RECOMBINACIÓN NO HOMÓLOGA (NHEJ)

Contrariamente a lo anterior, este mecanismo de reparación no precisa de homología en los extremos terminales del ADN, y es crítica durante la recombinación somática V(D)J, el mecanismo por el que se procesan los receptores de las células B y T, y que origina la diversidad del sistema inmune¹²⁰.

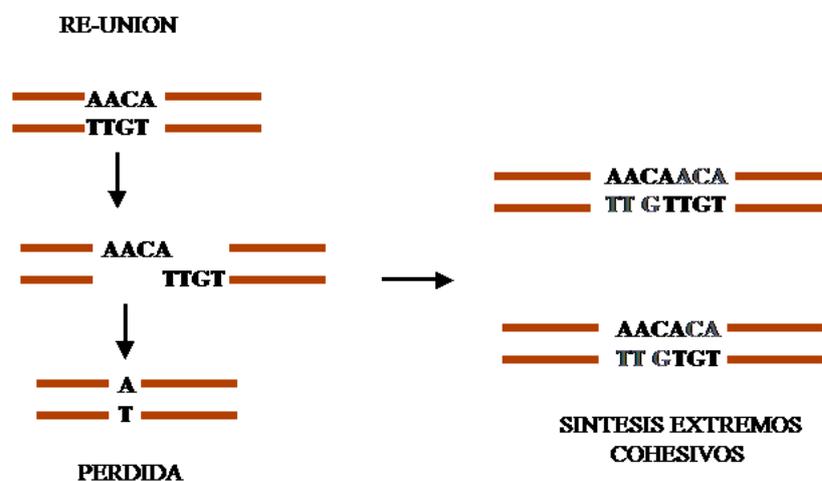


Figura 12. Mecanismos de recombinación no homóloga de las roturas de doble cadena ¹¹⁹

El mecanismo se inicia por la unión a los extremos de un heterodímero formado por las proteínas Ku70 y Ku80. Esto activa la subunidad catalítica de la proteína ADN-PK (quinasa dependiente de ADN) que fosforila a otras proteínas y así misma, de forma que adquiere su forma activa y es capaz de activar a su vez a otras proteínas como Wrn, Artemis, Tdp1 y PNK, necesarias para eliminar los nucleótidos alterados y para el procesamiento de los extremos. Las polimerasas Pol λ y Pol μ sintetizan la nueva cadena. El proceso concluye tras la ligación de los extremos por acción del complejo formado por la ADN ligasa IV y XRCC4 (Figura 12)^{119,120}.

3.4. REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER)

La mayoría de los organismos vivos dependen directa o indirectamente de la energía solar para su subsistencia, lo que por otro lado puede ocasionarle graves daños debido a la exposición al los rayos ultravioletas (UV). La reparación mediante escisión de nucleótidos (NER) es el mecanismo principal para resolver estas lesiones. Pero esta vía es muy versátil y a través de ella se reparan no solo los dímeros de pirimidinas inducidos por la radiación UV, sino también aductos de ADN debidos a sustancias químicas como cisplatino, N-acetil-acetoaminofluoreno o el tabaco. De hecho, se calcula que mediante la vía NER se reparan cerca del 70% de las lesiones en el ADN inducidas por el medio ambiente. Estas alteraciones distorsionan la estructura de la doble hélice e interfieren en la unión normal de las bases, alterando y bloqueando la replicación y la transcripción ¹⁰⁸.

Se distinguen dos vías de reparación NER, según el mecanismo de reconocimiento de la lesión: GG-NER (*Global Genomic Repair*) reconoce lesiones que distorsionan la doble hélice a lo largo de todo el genoma. Este reconocimiento se realiza a través del complejo XPC-HHR23B, que atrae hacia ese lugar al heterodímero DDB (*ADN damage binding*), iniciándose la reparación. En cambio, TCR-NER (*Transcription Coupled Repair*) actúa únicamente en las regiones transcripcionalmente activas cuando existe una lesión que bloquea la actividad de la RNA polimerasa II. Las proteínas CSA y CSB son las encargadas de reclutar el resto de factores que intervienen en esta vía, por lo que su función es crítica.

Una vez que se ha producido el reconocimiento de la lesión, los pasos que siguen GG-NER y TCR-NER son idénticos ¹²⁵ (Figura 13) y se inician con el desenrollamiento de la hélice mediante el complejo TFIIH, constituido por nueve proteínas, entre ellas, XPD y XPB, con función helicasa. A continuación y de forma secuencial, las endonucleasas realizan dos incisiones a ambos lados de la lesión. La primera de ellas, a unas 6 bases en sentido 3', la realiza XPG, mientras que la segunda, a 22 bases en sentido 5', la realizan un complejo que incluye a XPA, RPA y ERCC1-XPF. Se genera un oligonucleótido de 28 pb que ha perdido las uniones covalentes con el resto de la cadena de ADN y únicamente se mantiene unida a sus bases complementarias mediante puentes de hidrógeno¹²⁶. Durante este proceso, RPA ha permanecido

unida a la cadena sana, protegiéndola y facilitando la posterior resíntesis del fragmento eliminado. Para ello atrae a PCNA, un factor de replicación que es capaz de reclutar a las ADN polimerasas δ ó ϵ . Finalmente, la ADN Ligasa I, une el exThmo 5' del nuevo fragmento a la secuencia original^{105,110,127}.

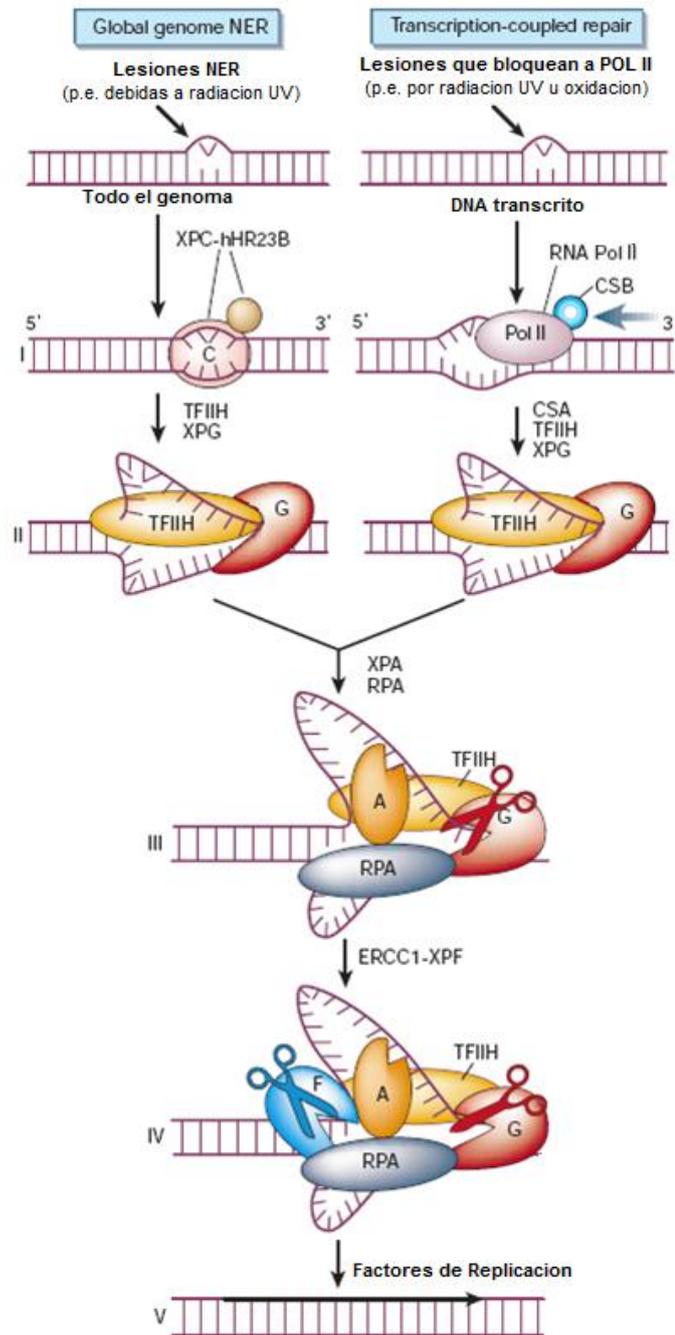


Figura 13: Mecanismo de reparación NER ¹⁰⁸

Al menos tres síndromes se han asociado con déficits congénitos en NER: Xeroderma Pigmentoso (XP), Síndrome de Cockayne (CS) y Tricotiodistrofia (TTD), todos ellos con una extraordinaria sensibilidad a la luz solar. XP se origina por mutaciones en uno de los siete genes XP (XPA-XPG) y es el prototipo de alteración de la reparación y conlleva un riesgo de cáncer de piel 1000 veces mayor que el de la población general. El Síndrome de Cockayne se debe a mutaciones en CSA y CSB lo que produce un fallo en TCR-NER. Esto hace que las células de estos individuos sean especialmente proclives a la apoptosis inducida por lesiones en el ADN, lo que les protege del desarrollo de tumores, pero cursa con un envejecimiento prematuro. La Tricotiodistrofia es forma de ictiosis laminar con un pelo con contenido anormalmente bajo en azufre, que a la luz polarizada, presenta bandas alternantes densas y claras que le dan el aspecto de “*pelo en cola de tigre*”, además de compartir muchas de las alteraciones de CS. Mutaciones e XPD o XPB pueden originar cualquiera de estos tres síndromes. Esto se explica porque estos dos genes son subunidades de TFIIH, que interviene tanto en NER como en el inicio de la transcripción, por lo que alteraciones en estos genes, no solo comprometen la reparación, sino también la transcripción y con ello favorecen la aparición de tumores y de alteraciones del desarrollo ^{108,125,128}.

Diferentes estudios sugieren que existen interacciones entre factores de unas y otras vías, como entre las ADN glicosilasas que intervienen en BER y factores de MMR y NER. También se relacionan a través de proteínas como PCNA y RPA, implicadas en la replicación que sigue a estos Thrs mecanismos de reparación ¹²⁹.

Tanto la radioterapia, como diferentes quimioterápicos, entre los que se incluyen las antraciclinas y los platinos, pueden producir daño directo sobre el ADN a través de diferentes mecanismos como la peroxidación de los lípidos y la generación de radicales libres, la intercalación entre las bases del ADN o la formación de aductos. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado una asociación entre las alteraciones en los genes reparadores del ADN y la sensibilidad a diferentes citotóxicos. Se ha visto también que varios SNPs en estos genes alteran la capacidad funcional de los mismos y podrían condicionar la respuesta de los pacientes a los tratamientos quimio y radioterápicos.

4. XRCC1 Arg399Gln, XRCC3 Thr241Met y XPD Lys751Gln

XRCC3 Thr241Met, XRCC1Arg399Gln, XPD Lys751Gln son tres de los polimorfismos presentes en genes reparadores del ADN más ampliamente estudiados, debido a su elevada frecuencia en la población general y a que inducen un cambio en la funcionalidad de la proteína que ha podido ser caracterizado. Además, se han relacionado con el riesgo a desarrollar diferentes tipos de tumores sólidos así como con la respuesta de los pacientes al tratamiento.

4.1 XRCC1 Arg399Gln

El gen XRCC1 (*X-ray repair cross complementation group 1*), tiene un tamaño de 33kb y se localiza en el cromosoma 19q13.2-13.3. Codifica una proteína de 663 aminoácidos a la que no se ha atribuido actividad enzimática, pero que posee Thrs dominios de interacción con otras proteínas, además de una señal de localización nuclear y un sitio de fosforilación por Ck2¹³⁰.

XRCC1 tiene un papel fundamental en la reparación del ADN por Escisión de Bases (BER). Interactúa con múltiples glicosilasas y forma complejos con la mayoría de las proteínas que intervienen en este proceso, como APE1, POL β , PARP1 y LIG3, lo que sugiere que es reclutado al lugar de la lesión por las glicosilasas y después coordina los siguientes pasos de BER, modulando la actividad del resto de factores implicados¹²⁹.

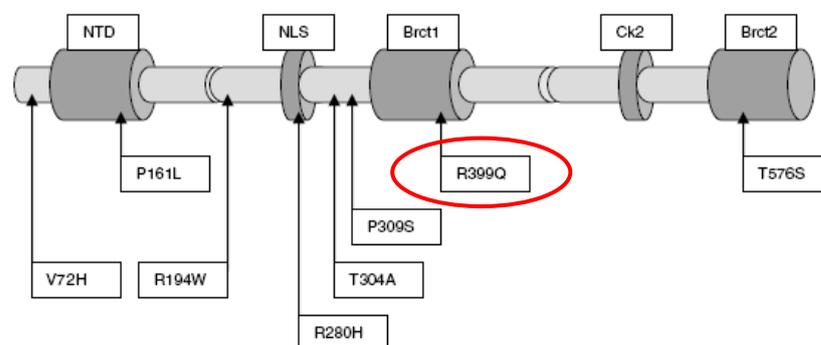


Figura 14: Dominios del gen XRCC1 (parte superior) y localización de los polimorfismos no sinónimos identificados¹³⁰

El dominio N-terminal es el lugar de unión de POL β . Posee dos dominios BRCT, así denominados por su homología con el dominio C-terminal de BRCA1, que median la interacción con otras proteínas: BRCT1 es un sitio de interacción con PARP, mientras que BRCT2 es el lugar de interacción con LIG3 (Ligasa III). La zona de unión entre el exThrmo N-terminal y BRCT sirve de interacción con Apex, OGG1 y PCNA¹³⁰. Recientemente se ha demostrado que la unión del factor de transcripción E2F1 regula la actividad de XRCC1 y promueve la reparación del ADN¹³¹.

Estudios en modelos animales han demostrado que la delección de XRCC1 en línea germinal es incompatible con la vida¹³², mientras que las líneas celulares con mutaciones inactivantes del gen presentan hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes así como a los agentes alquilantes¹³³.

Se han descrito más de 60 polimorfismos en este gen, de los que el más estudiado es Arg399Gln, localizado en el exón 10, en el dominio BRCT-1¹⁰². Consiste en el cambio de Guanina (G) por Adenosina (A) en la secuencia del ADN, lo que una vez transcrito supone la substitución de Arginina (Arg) por Glutamina (Gln) en la región BRCT-1. Esto determina un cambio en la conformación tridimensional de la proteína¹³⁴, que determina la disminución de la capacidad reparadora del ADN, medida en estudios funcionales a través de la persistencia de aductos de ADN, aumento del número de mutaciones en p53, alteraciones cromosómicas y un retraso en ciclo celular cuando se somete a las células a radiación ionizante¹³⁵⁻¹⁴⁰. De acuerdo con los diferentes estudios, la variante Gln está presente en el 23-36% de la población general¹⁴¹, y se ha asociado con diferentes tipos de cáncer, principalmente en fumadores¹³⁹.

4.2 XRCC3Thr241Met

El gen XRCC3 (*X-ray repair cross complementation Group 3*) se localiza en 14q32.3 y estructuralmente es similar a RAD51, con el que interactúa y junto al que juega un papel clave en la reparación de Roturas de Doble Cadena de ADN (DSB) a través del mecanismo de Recombinación Homóloga¹⁴²⁻¹⁴⁴. XRCC3 regula la activación de RAD51 y juntos coordinan la progresión de la horquilla de replicación durante la SDSA^{145,146}. XRCC3, junto con otras proteínas de la familia de RAD51 coordina el proceso y resolución de la conversión génica¹⁴⁶.

Las células con mutaciones del gen XRCC3, presentan una gran sensibilidad a las radiaciones ionizantes así como a los agentes alquilantes^{147,148}. Mediante cultivos celulares, se ha visto que la sola pérdida de XRCC3 induce una inestabilidad cromosómica que hace a la célula inviable, por lo que se ha sugerido que podría actuar como un gen supresor de tumores^{149,150}.

La sustitución de Citosina (C) por Timina (T) posición 18067 (exón 7) de XRCC3 se traduce en el cambio de Threonina (Thr) por Metionina (Met) en el codón 241. Este cambio elimina un sitio de fosforilación de la proteína, impidiendo la interacción de XRCC3 con otros elementos de la vía DSB y alterando la capacidad de reparación celular^{121,136,151}. Según los distintos estudios, la frecuencia del alelo Met en la población general oscila entre el 22 y el 44% de la población general^{152,153}.

A pesar de que se han identificado varios polimorfismos en XRCC3, Thr241Met es probablemente el más estudiado de ellos, debido a su relativamente alta frecuencia en la población general y a que ha podido establecerse su significado biológico. Se han llevado a cabo múltiples estudios moleculares y epidemiológicos para evaluar el papel de esta variante en diferentes tipos tumorales¹⁵³⁻¹⁵⁵, así como en la sensibilidad y respuesta a diferentes fármacos, principalmente, agentes alquilantes¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

4.3. XPD^{Lys751Gln}

El gen XPD (*Xeroderma Pigmentosum D*), también denominado ERCC2, es un gen de 54.3kb localizado 19q13.32. Codifica una helicasa de 760 a, evolutivamente muy conservada, que forma parte del complejo TFHIIH, esencial tanto para iniciar la transcripción mediada por la RNA polimerasa II, como para la reparación por escisión de nucleótidos (NER),^{117,126,127}. La proteína codificada, de 760 aminoácidos, es una helicasa dependiente de ATP que abre la hélice de ADN en sentido 5'-3' para que puedan iniciarse los procesos de transcripción y reparación¹⁵⁹.

Mediante estudios de asociación, de función y modelos animales, se ha comprobado que la pérdida completa de la proteína XPD es incompatible con la vida, pero en cambio, el déficit

parcial de su función que originan las diferentes mutaciones caracterizadas hasta la fecha en el gen XPD, pueden conducir tanto a síndromes con predisposición al cáncer como síndromes que cursan con progeria, como es el caso del Xeroderma Pigmentoso, el Síndrome de Cockayne o la Tricotiodistrofia^{128,160,161}.

Junto a estas mutaciones, se conocen múltiples SNP's en XPD. La mayoría de ellos se localizan en regiones intrónicas no codificantes, por lo que se consideran inocuos, si bien es posible que alguno altere el *splicing* de los transcritos primarios¹⁶². De los que se encuentran en las regiones exónicas, el cambio de Adenina (A) por Citosina (C) en la posición 2329¹⁶³, es probablemente el más estudiado debido a que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos y un cambio conformacional en la proteína¹⁶⁴. El cambio de Lisina (Lys) por Glutamina (Gln) en el codón 751 introduce un cambio conformacional en el exThrmo carboxi-terminal de la proteína¹⁶⁴, al que en condiciones normales se une p44, la proteína responsable de activar su función helicasa de XPD dentro del complejo TFIIH. Si bien esta alteración no elimina por completo la actividad de XPD, sí que la disminuye de manera importante, comprometiendo la reparación del ADN^{135,136}, de forma que las células son más sensibles a las lesiones inducidas por exposición a las radiaciones X y UV^{154,165,166}. La variante polimórfica está presente en aproximadamente el 30-40% de la población general¹⁶².

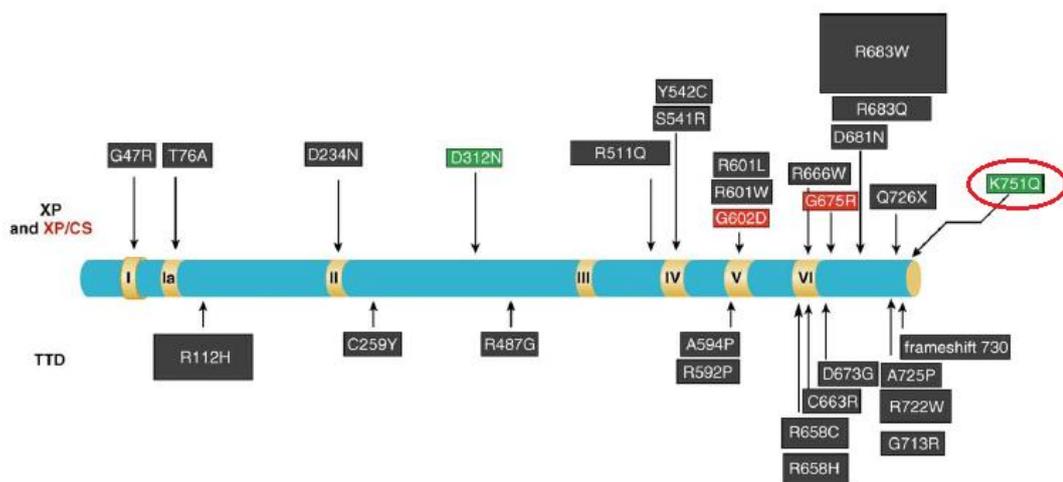


Figura 15: Estructura del gen XPD. En la parte superior del esquema, se muestran las mutaciones han sido asociadas sólo con XP (cuadros negros) y con XP y Síndrome de Cockayne (cuadros rojos). En la parte inferior, se muestran las mutaciones asociadas a TTD. Los cuadros verdes muestran los SNP's que implican cambios funcionales. Los números romanos I-VI señalan los siete dominios con actividad helicasa¹⁶².

OBJETIVOS

En este trabajo pretendemos analizar la posible asociación entre polimorfismos de genes reparadores y el desarrollo de cáncer de mama no familiar, así como el papel de estas variantes genéticas en la sensibilidad a los esquemas terapéuticos habituales. Para ello, hemos planteando los siguientes objetivos:

1. Comparar las distribuciones alélicas y genotípicas de los polimorfismos Arg 399 Gln del gen XRCC1, Thre241Met del gen XRCC3 y Lys751Gln del gen XPD entre pacientes con cáncer de mama y mujeres sanas, con el fin de determinar una posible relación entre los diferentes genotipos y la predisposición al desarrollo de este tipo de tumores.
2. Estudiar la distribución de alelos y genotipos de los polimorfismos Arg 399 Gln del gen XRCC1, Thr241Met del gen XRCC3 y Lys751Gln del gen XPD, en relación con la edad en los grupos caso y control.
3. Estudiar la distribución de alelos y genotipos de los polimorfismos Arg 399 Gln del gen XRCC1, Thr241Met del gen XRCC3 y Lys751Gln del gen XPD en pacientes con cáncer de mama tratadas con radioterapia para analizar si existe relación en Thr estos y la aparición de toxicidad cutánea.
4. Analizar el posible papel pronóstico de XRCC1 Arg399Gln, XRCC3Thr241Met y XPDLys751Gln en las pacientes con cáncer de mama tanto en estadios tempranos como en la enfermedad diseminada.

Material y Métodos

1. MUESTRA

1.1. Pacientes

Las pacientes elegibles para el estudio eran mujeres mayores de 18 años diagnosticadas de cáncer de mama no familiar atendidas en las Consultas Externas del Servicio de Oncología del Hospital Universitario de Salamanca entre Enero y Abril de 2004. Se seleccionaron 200 pacientes que habían sido diagnosticadas entre 1990 y 2004. Para la obtención del ADN constitutivo, se les extrajo una muestra de 10 cc de sangre periférica previo consentimiento, siguiendo las normas legales para los Estudios Clínicos de España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

Se recogieron de forma retrospectiva los datos anatomopatológicos del tumor (*Tipo histológico y grado de diferenciación tumoral, receptores de estrógenos y progestagenos, HER2*), TNM, (*Tamaño tumoral, presencia de metástasis ganglionares o de metástasis en otras localizaciones*), datos epidemiológicos de las pacientes (*edad al diagnóstico, y estado menstrual*), datos sobre el tratamiento recibido (*Tipo de cirugía, tipo de radioterapia, hormonoterapia y esquemas de quimioterapia recibidos*) y datos del seguimiento (*recidiva local, metástasis a distancia, aparición de segundos tumores, tiempo de supervivencia desde el diagnóstico, y supervivencia libre de enfermedad, causa del fallecimiento*).

Se revisaron los antecedentes familiares de las pacientes, comprobando que no existiese agregación familiar para cáncer de mama, o que en caso de existir, se hubiese realizado el estudio mutacional en los genes de alta penetrancia BRCA1 y 2. No se encontró mutación en estos genes en ninguna de las pacientes con dos o más casos de cáncer de mama en familiares de primer y segundo grado, pero 3 pacientes menores de 40 años fueron excluidas del estudio por encontrarse que eran portadoras de mutación en el gen BRCA1.

Para homogeneizar la muestra, se descartaron otras 2 pacientes que habían recibido tratamiento con TASPE (trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos obtenidos de sangre periférica). Se rechazaron otras 16 pacientes por no disponer de los informes anatomopatológicos o de los datos clínicos estudiados y 5 debido a que la cantidad de ADN obtenido era insuficiente y no permitía el estudio genético completo. El número final de casos analizados es de 174 (Figura 16). La mediana de edad en el momento del diagnóstico fue de 62 años, con un rango de 26.5 – 91.5 años y una media de 60.1.

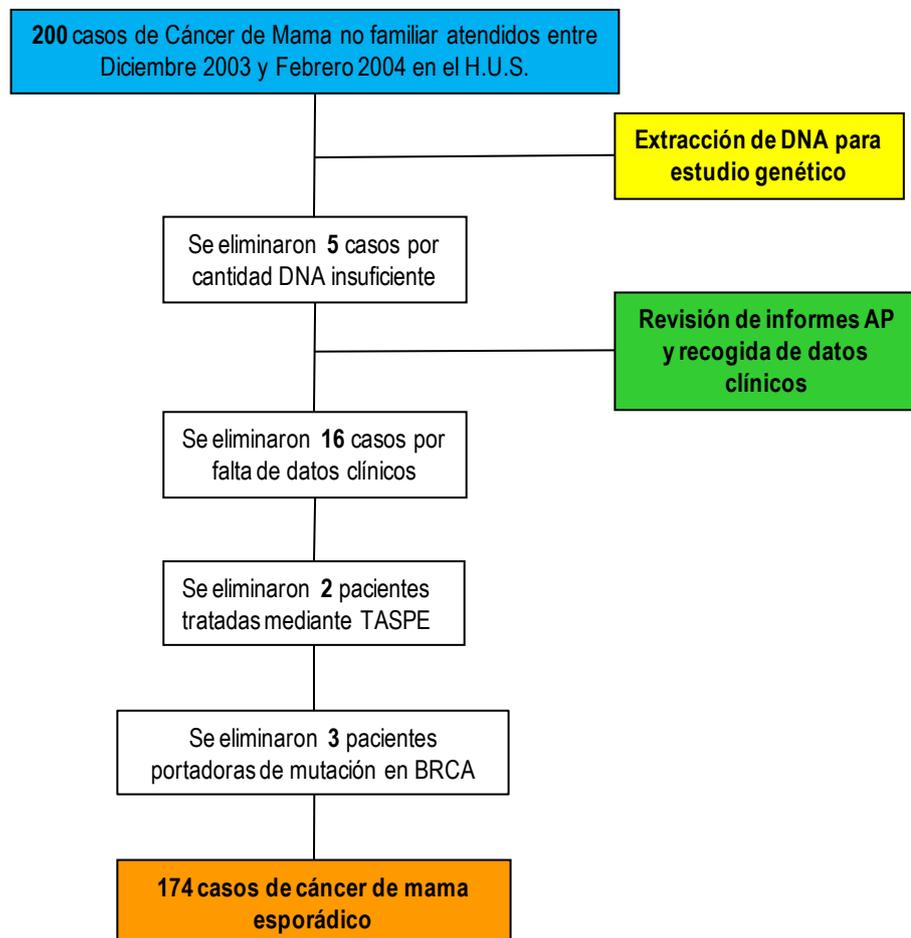


Figura 16: Diagrama de flujo de selección de los casos de la muestra

1.2 Controles

Los individuos elegibles para el estudio como controles fueron mujeres mayores de 18 años que no hubiesen padecido ningún tipo de cáncer hasta el momento de ser reclutadas. Se seleccionaron un total de 310 mujeres atendidas en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario de Salamanca por diferentes dolencias entre Junio de 2004 y Junio de 2005, así como pacientes de varios Centros de Salud de la ciudad de Salamanca, a las que, previo consentimiento, se les extrajo una muestra de 10cc sangre periférica mediante venopunción antecubital. Finalmente, se excluyeron 10 controles debido a que la cantidad de ADN obtenido era insuficiente para el análisis genético.

Para cada uno de los casos se seleccionó como control una mujer sin antecedente de cáncer de la misma edad ± 3 años. Este subgrupo control de 174 mujeres presenta una mediana de edad 61.5 años y la diferencia con el grupo de pacientes no es significativa ($p=0.996$).

En el grupo control, se incluyeron otras 126 mujeres con rango de edad 20.5-98.5 años, para completar el análisis de la frecuencia de los polimorfismos XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln y XPD Lys751Gln en relación con la edad. De este modo, la muestra final incluye 300 mujeres en el grupo control, de las cuales, 25 eran menores de 35 años (8.3%), 55 eran mayores de 80 años (18.3%) y el 73.3% restante (220) tenían entre 35 y 80 años. La tabla 7 recoge las características finales de la muestra.

Tabla 7: Distribución de la muestra por edades

	N	Media Edad	Mediana Edad	Rango de edad
CASOS	174	60.1	62	26.5-91.5
CONTROLES	300	61.78	63.5	20.5-98.5
Pareados	174	60.15	61.5	26.5-91.5
No pareados	126	64	63.5	20.5-98.5

2. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO

Se obtuvo el ADN genómico de cada individuo a partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica obtenida mediante venopunción en la región antecubital, previo consentimiento.

Las células nucleadas de la sangre se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50mL de ddH₂O durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C). Tras la recuperación de la interfase creada y lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50mM Tris-HCl pH7.5; 25mM KCl; 5mM MgCl₂) y se precipitaron mediante centrifugación a 580 g durante 20 minutos. El botón de células nucleadas de la sangre se resuspendió en tampón Fornace a una concentración estimada de 5x10⁶ células/mL, tras lo cuál se añadió EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético, concentración final 10 mM), SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, concentración final 1%) y Proteinasa K (concentración final 50 µg/mL). La mezcla se incubó a 55 °C durante 8 - 16 horas. Tras la incubación, se obtuvo el ADN por el método de extracción con fenol y cloroformo, anteriormente descrito.

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN así obtenidos se calcularon tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (*GeneQuant, Pharmacia*) por medio de la siguiente fórmula,

$$\mu\text{g de ADN/mL} = (\text{D.O.}_{260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)^*$$

*: 50 es un factor de corrección introducido ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50 µg de ADN/mL

El cociente D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ se utiliza para determinar el grado de pureza, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.7 y 2.0. Valores inferiores a los señalados indican

contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del ADN. Valores superiores parecen indicar un exceso de RNA, el cual se eliminó tratando la solución de ADN con RNAsa y purificando nuevamente según el método antes descrito.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1 y 1,5 $\mu\text{g/mL}$, se almacenó en tubos Eppendorf® a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

3. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS XRCC3Thr241Met, XPD Lys751Gln y XRCC1 Arg399Gln

Los estudios de discriminación alélica se realizan fundamentalmente mediante dos métodos: el análisis de los *polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción* (RFLP) y la *PCR en tiempo real*, (qQRT-PCR). En el momento en que se inició este trabajo, no disponíamos de la infraestructura necesaria para realizar qQRT-PCR, por lo que el estudio de XRCC3 Thr241Met, y de XPD Lys751Gln se inició mediante RFLP. Posteriormente, se adquirió StepOne System (Applied Biosystems, Foster City, CA), y se completo el estudio mediante qQRT-PCR (Tabla 8)

Tabla 8: Métodos de dicriminación alélica utilizados en el estudio de los SNPs

	Mecanismo de Reparación	Polimorfismo	Técnica de discriminación alélica
XRCC3	DSB-HR	Thr241Met	PCR-RFLP QRT-PCR
XPD	GG-NER	Lys751Gln	PCR-RFLP QRT-PCR
XRCC1	BER	Arg399Gln	QRT-PCR

3.1. Discriminación alélica mediante PCR-RFLP

El análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) se basa en la fragmentación de una molécula de ADN mediante encimas de restricción, las cuales solo actúan si está presente la secuencia nucleotídica específica que cada una de ellas reconoce (*diana de restricción*). Cuando un polimorfismo altera una secuencia puede distorsionar una de estas dianas o generar una nueva, modificando el tamaño de los fragmentos de restricción. La electroforesis en gel de agarosa permite visualizar los frgmentos y saber así si una muestra presenta o no un determinado polimorfismo¹⁶⁷.

Previamente a la digestión con enzimas de restricción es necesario aumentar el número de moléculas del ADN a estudio, para lo que se utiliza la *reacción en cadena de la polimerasa* o PCR. Mediante esta técnica se consigue la amplificación de forma logarítmica de secuencias de ADN de hasta 600pb de longitud¹⁶⁸. Para ello, junto con la muestra de ADN a estudio, se precisan dos oligonucleótidos cebadores (*o primers*) de secuencia complementaria a las regiones que flanquean aquella que se quiere amplificar. Se necesita además una polimerasa resistente a altas temperaturas que generalmente se obtiene de la bacteria *Thermus aquaticus*, y se denomina *Taq polimerasa*. Esta enzima es capaz de sintetizar una nueva molécula de ADN a partir de los oligonucleótidos provistos, utilizando como molde la cadena de ADN que se desea amplificar. Para ello, es necesario añadir a la reacción los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) que el enzima irá ensamblando y enriquecer el medio de la reacción con un tampón que proporcione el medio adecuado para la estabilización de la polimerasa, para lo que debe estar enriquecido en cloruro magnésico. La reacción tiene lugar mediante modificaciones cíclicas de la temperatura. Consiste en un primer paso de 3-5 minutos a 92°C para favorecer la desnaturalización del material de partida, seguido de al menos 30 ciclos de temperatura variable durante los que se produce la síntesis de las nuevas cadenas de ADN. Los ciclos se inician a 92°C para favorecer la separación de las hebras formadas en el ciclo anterior, otro paso a una temperatura variable entre 50 y 65°C a la que se favorece el anillamiento de los *primers* y por último, unos minutos a 72°C para favorecer la extensión por la polimerasa, que a partir de los *primers* va estendiendo la cadena. Una vez completados todos los ciclos, se hace un paso final de extensión, durante 5-7 minutos a 72°C. La temperatura más variable es la que se emplea para el anillamiento, ya que debe modificarse según las características de los *primers*. Tras repetir estos ciclos de temperatura entre 30 y 40 veces, se obtienen millones de secuencia idénticas a la inicial¹⁶⁹.

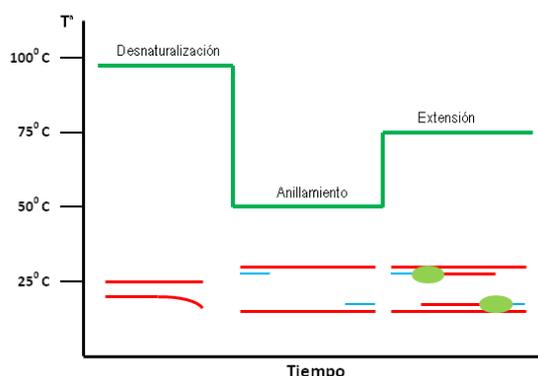


Figura 17: Esquema del ciclo de temperaturas durante una PCR ¹⁶⁹

En este trabajo, las reacciones de amplificación se realizaron con los productos comerciales para PCR Supermix® (*Gibco-BRL*) y Master Mix® (*Promega*), a los que se añadieron entre 1µL y 4µL de la mezcla de los dos oligonucleótidos flanqueantes y 1µL del ADN obtenido por el método anteriormente descrito (concentración = 0,1-0,2 µg/mL).

Para asegurar que no existía contaminación y que las reacciones eran específicas para cada muestra de partida, se empleó como control una preparación que contenía todos los reactivos citados excepto ADN molde. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático y se incluyó siempre en paralelo un control negativo de la reacción. Para evitar la contaminación de las muestras con otros ADN, la manipulación post-PCR se realizó en un laboratorio distinto de donde habitualmente se realiza la extracción del ADN y de donde se prepararon las reacciones.

Los productos de PCR se visualizaron mediante luz ultravioleta tras realizar electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X (TBE: 0,089 M Tris base/0,089 M ácido bórico) teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL)

Una vez conseguida la amplificación de las muestras, se procedió al análisis de los polimorfismos empleando endonucleasas de restricción. El producto de PCR se incubó con estas enzimas a una temperatura y tiempo característicos para cada una de ellas. Los fragmentos pueden después visualizarse realizando una nueva electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

3.1.1 Análisis del polimorfismo Thr 241Met del gen XRCC3

El polimorfismo Thr241Met del gen XRCC3, consiste en el cambio de una citosina (C) por una Timina (T) en la secuencia de ADN, lo que se traduce en el cambio del aminoácido Threonina por Metionina en la posición 241. El fragmento que contiene el polimorfismo se amplificó con los oligonucleótidos 5'-GCC TGG TGG TCA TCG ACT C-3' (sentido) y 5'-ACA GGG CTC TGG AAG

GCA CTG CTC AGC TCA CGC ACC-3' (antisentido, con una modificación en la base señalada para introducir un sitio de restricción en presencia del nucleótido T), en las siguientes condiciones:

	Desnaturalización inicial	95°C.....3 min
35 ciclos	Desnaturalización	95°C..... 20 seg
	Anillamiento	60°C..... 20 seg
	Extensión	72°C.....20 seg
	Extensión final	72°C..... 5 min

obteniendo un fragmento de 136 pb¹³⁶ (Figura 18):

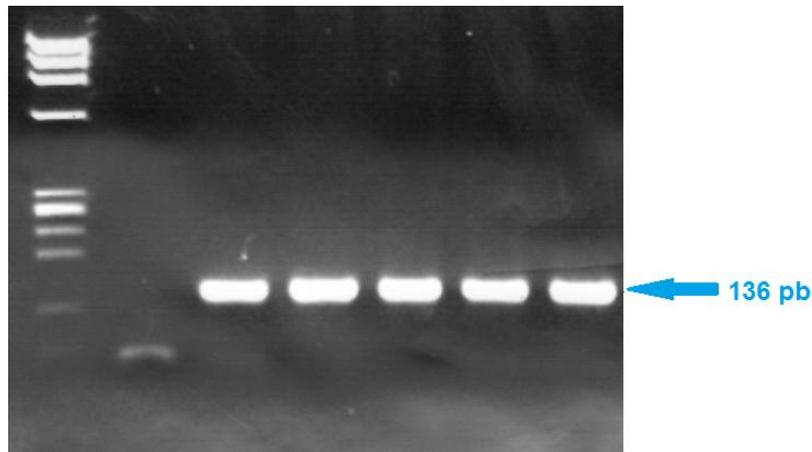


Figura 18. Amplificación por PCR del exón 7 de XRCC3

A continuación se digirieron 10 µL de dicho producto con 10 unidades de la endonucleasa de restricción *NcoI* (*Fermentas, Hanover, MD*), a 37°C durante 5-6 horas. Este encima, que reconoce la secuencia 5'...C*CATGG...3' presente en el polimorfismo pero no en el alelo salvaje, genera dos fragmentos de 97pb y 39 pb, que fueron separados y visualizados tras realizar electroforesis en geles de agarosa al 3%. (Figura 19)

Así, los genotipos generados son:

- Genotipo C/C (homocigoto Thronina): un fragmento de 136 pb
- Genotipo T/T (homocigoto Metionina): dos fragmentos de 97 pb y 39 pb
- Genotipo C/T(heterocigoto Thronina/Metionina): Thrs fragmentos de 136, 97 y 39 pb

Mediante este procedimiento, se realizó el estudio de 95 pacientes y 95 controles. Como control de calidad, el análisis de cada muestra se hizo por duplicado.

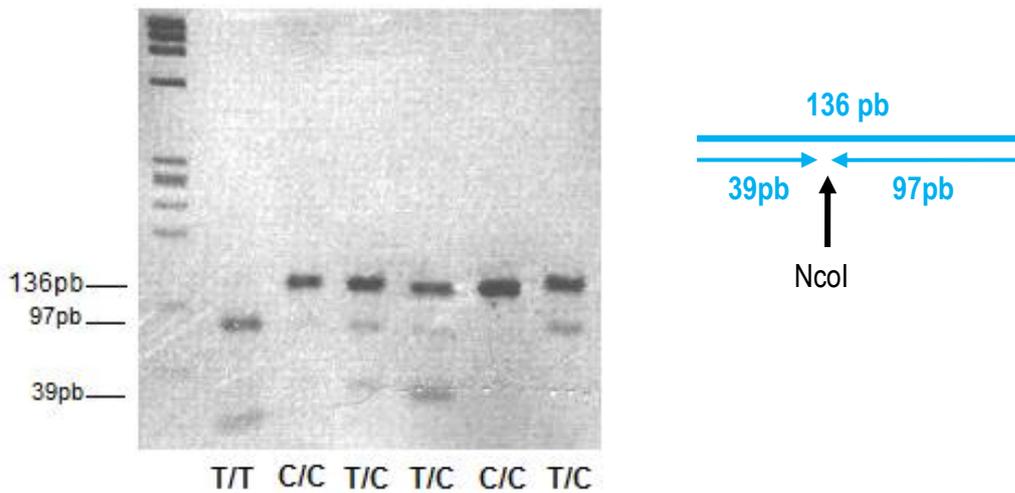


Figura 19. Diferenciación genotípica del polimorfismo en el exón 7 de XRCC3 tras la digestión con NcoI

3.1.2. Análisis del polimorfismo Lys751Gln del gen XPD

El polimorfismo Lys751Gln del gen XPD se localiza en el exón 23 y consiste en el cambio de una Adenina (A) por una Citosina (C), lo que implica el cambio del aminoácido Lisina por Glutamina. El fragmento que contiene la secuencia polimorfa se amplificó con los oligonucleótidos 5'-CTG CTC AGC CTG GAG CAG CTA GAA TCA GAG GAG ACG CTG-3' (sentido) y 5'-AAG ACC TTC TAG CAC CAC CG-3' (antisentido), en las siguientes condiciones:

	Desnaturalización inicial	95°C.....3 min	
35 ciclos	{	Desnaturalización	95°C..... 20 seg
		Anillamiento	62°C.....20 seg
		Extensión	72°C.....20 seg
	Extensión final	72°C.....5 min	

El producto de la PCR genera un fragmento de 161 pb¹³⁶ (Figura 20).

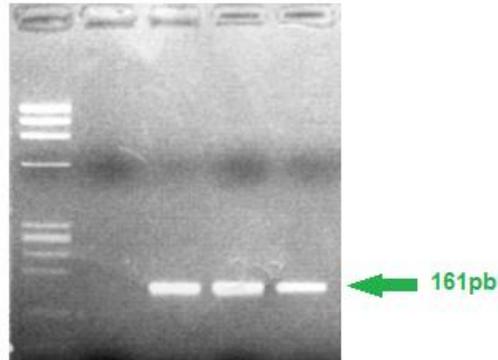


Figura 20: Amplificación por PCR del exón 23 de XPD

Se digirieron 10 μ L del producto de PCR con 10 unidades de la endonucleasa de restricción *Pst*I (*Fermentas, Hanover, MD*) a 37°C durante 5-6 horas. El encima reconoce la secuencia 5'...CTGCA*G...3', presente únicamente en la forma mutada, donde se originan dos fragmentos de 120 y 41 pb, que fueron separadas y visualizadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% (Figura 21)

Los posibles genotipos que se generan son:

- Genotipo A/A (homocigoto Lisina): un fragmento de 161 pb
- Genotipo C/C (homocigoto Glutamina): dos fragmentos de 120 pb y 41 pb
- Genotipo A/C (heterocigoto Lisina/glutamina): Thrs fragmentos de 161 pb, 120 y 41 pb

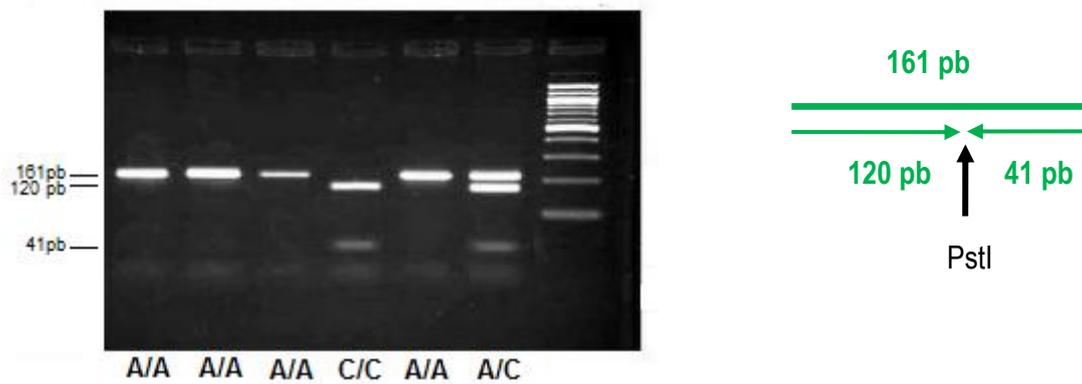


Figura 21. Diferenciación genotípica del polimorfismo en el exón 23 de XPD tras la digestión con PstI

Mediante este procedimiento se realizó la discriminación alélica en 95 pacientes y 95 controles. Como control de calidad, el análisis de cada muestra se hizo por duplicado.

3.2. Discriminación alélica mediante qRT-PCR

Higuchi describió en 1993 una técnica que permitía detectar los productos de la PCR a medida que se iban acumulando y la denominó *Real Time-PCR* (QRT-PCR)¹⁷⁰. Esta técnica, sigue el mismo procedimiento de una PCR convencional, pero la amplificación tiene lugar en presencia de unos componentes capaces de emitir fluorescencia, lo que permite conocer y registrar la cinética de la amplificación en todo momento. Existen dos métodos principales para esta cuantificación: el primero consiste en la adicción de sustancias intercalantes del ADN como el bromuro de etidio, mientras que el otro emplea sondas que emiten fluorescencia al hibridar con la secuencia complementaria¹⁷¹. En este caso, se han empleado sondas TaqMan®, marcadas con los fluorocromos VIC y FAM, uno para cada alelo de los genes estudiados. Estas sondas, complementarias para una secuencia específica, presentan un donador en el exThrmo 5' y un aceptor (*quencher*) en el exThrmo 3' que absorbe la fluorescencia emitida por el donador cuando los exThrmos de la sonda están próximos, lo que sucede mientras la sonda está intacta (Figura 22)

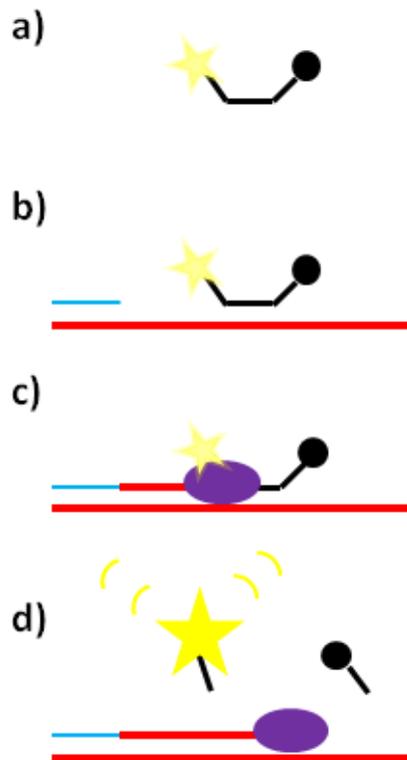


Figura 22: La fluorescencia emitida por el fluorocromo es absorbida por el aceptor (a) hasta que la sonda hibrida con su secuencia complementaria (b) y es hidrolizada por Taq pol (c,d)^{169,170}

Además de estas sondas, la QRT-PCR precisa de los mismos elementos que una PCR convencional (oligonucleótidos o *primers*, dNTPs, Taq polimerasa y solución tampón). Durante el anillamiento, tanto los oligonucleótidos como las sondas fluorescentes se unen a las cadenas de ADN. Taq polimerasa tiene además actividad 5'-3' exonucleasa de modo que si mientras realiza la extensión de una molécula de ADN a partir de un *primer*, encuentra una sonda unida a esa cadena, la hidroliza. Al separarse el fluorocromo y el aceptador, la fluorescencia ya no es absorbida, de modo que la fluorescencia liberada tras la excitación de la muestra con un laser es detectada por el lector, y es proporcional al número de moléculas de doble cadena que se han formado como producto de la PCR¹⁷⁰ (Figura 23)

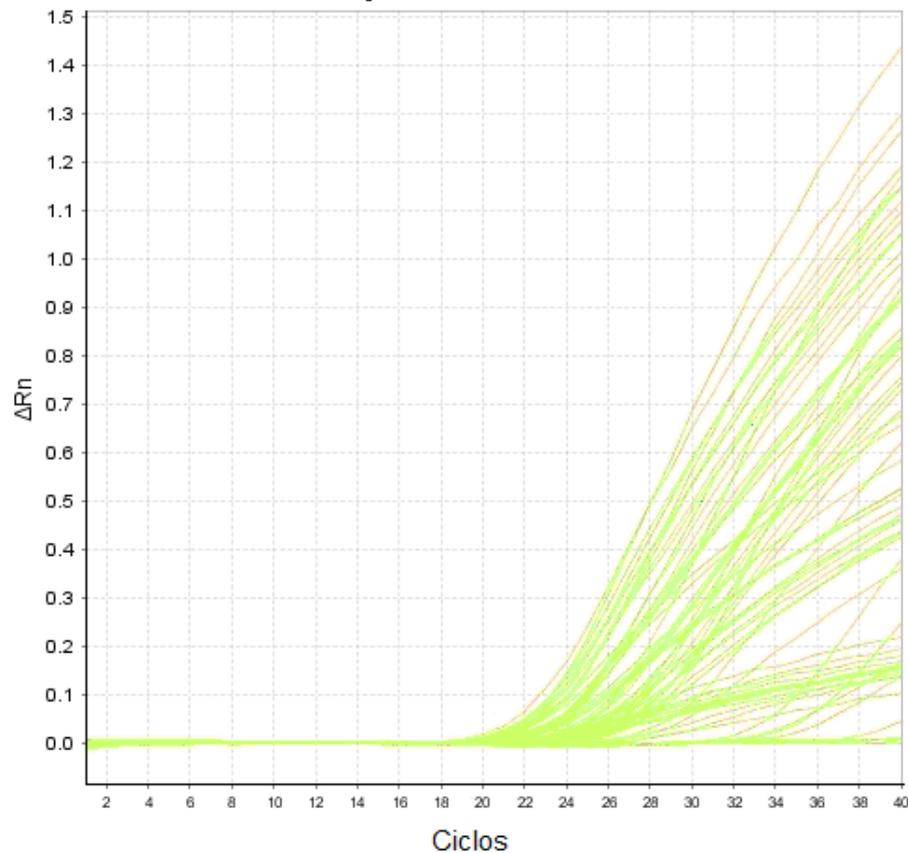


Figura 23: Emisión de fluorescencia en una QRT-PCR a medida que tienen lugar los ciclos de amplificación (*StepOne®*)

Al mismo tiempo, el sistema identifica cuál es el fluorocromo (VIC o FAM) que está emitiendo, y por lo tanto discrimina cuál es el SNP presente en cada una de las secuencias. En la figura 24 se muestran como ejemplo los resultados de discriminación alélicas de XRCC3. Cada uno de los puntos representa una muestra estudiada. En el caso de los individuos C/C, solo se une la sonda marcada con FAM (representado en azul), mientras que en el caso de los individuos T/T, solo se une la sonda marcada con VIC (rojo). El sistema representa en verde los genotipos C/T en el que se unen ambas sondas. Los cuadraditos negros representan las muestras sin ADN que se emplean como control.

Tabla 9: Nombre comercial del ensayo, sondas y primers empleados para el estudio de cada uno de los SNPs.

SNP	Ensayo	Sondas TaqMan® (VIC/FAM)	Primers (Forward/Reverse)
XRCC1 Arg399Gln	c__622564_10	GGGTTGGCGTGTGAGGCCTTACCTG[C/T]GGGAGGGCAGCCGCCGACGCATGCC	Fw: GTGGGTGCTGGACTGTCA Rv: GCAGGGTTGGCGTGTGA
XRCC3 Thr241Met	c__890125_10	GAAGGCACTGCTCAGCTCAGCAGC[A/G]TGGCCCCAGGGACTGCAGATGCCT	Fw: CCAGGGCCAGGCATCTG Rv: CAGCACAGGGCTCTGGAA
XPD Lys751Gln	c__3145033_10	TGCTGAGCAATCTGCTCTATCCTCT[G/T]CAGCGTCTCCTCTGATTCTAGCTGC	Fw: CCCCTCTCCCTTTCTCTGTTC Rv: GGACCTGAGCCCCACTAACG

Una vez optimizadas para cada gen, las amplificaciones se llevaron a cabo en las siguientes condiciones:

40 ciclos	{	Desnaturalización inicial	92°C.....10 min
		Desnaturalización	92°C.....15 seg
		Anillamiento	60°C / 56°C.....1.15 min
		Extensión	60°C.....1 min

La lectura de fluorescencia se realizó antes y después de la amplificación mediante el sistema StepOne® (*Applied Biosystem, Foster City, CA*) utilizando el software Allelic Discrimination Program (*Applied Biosystem, Foster City, CA*) para la determinación del alelo presente en cada una de las muestras.

Con este método, se realizó el estudio de XRCC1 Arg399Gln de 174 pacientes y 300 controles y de 79 pacientes y 205 controles para XRCC3 Thr241Met y XPD Lys751Gln. Para verificar los resultados, cada muestra se analizó por duplicado. Así mismo, se eligieron de forma aleatoria 20 pacientes y 20 controles en los que previamente se habían estudiado tanto XRCC3Thr241Met como XPD Lys751Gln mediante PCR-RFLP. Puesto que los resultados fueron completamente reproducibles, se decidió no repetir mediante QRT-PCR el análisis de los casos y controles restantes.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El estudio se inició con el análisis descriptivo de todas aquellas variables demográficas y clínicas recogidas para el estudio tanto en la muestra de casos de cáncer de mama como en la muestra de controles sanos. Para variables categóricas nominales y ordinales se calculó la proporción de pacientes en cada categoría, y para las variables cuantitativas se calcularon la mediana, cuartiles y rango.

La comparación entre casos y controles de las frecuencias de cada una de las variantes de los polimorfismos del estudio se hizo mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson. Así mismo, se analizaron las posibles diferencias en relación a la edad entre casos y controles en función de la variante polimórfica presente mediante pruebas no-paramétricas, concretamente, la prueba *K* de Kruskal-Wallis.

Posteriormente, se estudiaron los posibles desequilibrios en la distribución de las diferentes variables demográficas y clínicas recogidas en función de los polimorfismos estudiados. Para ellos se utilizó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson en variables categóricas nominales, prueba de Cochran-Armitage (o prueba Chi-cuadrado de tendencia lineal) para variables categóricas ordinales, y las pruebas no paramétricas *U* de Mann-Whitney o *K* de Kruskal-Wallis para variables continuas. En aquellos casos en los que se requirió la comprobación de hipótesis parciales mediante comparaciones múltiples se aplicó la corrección de Bonferroni.

Para posteriores análisis de supervivencia se definieron dos grupos de pacientes según su presentación: 1) pacientes con enfermedad temprana, y 2) pacientes con enfermedad metastásica. En el primer grupo se estudiaron la supervivencia libre de evento (SLE) y la supervivencia global (SG). La primera se define en este estudio como el tiempo transcurrido desde el tratamiento primario a la aparición del primer evento (recidiva local, tumor contra-lateral, recidiva metastásica o muerte por cáncer de mama). SG se define como el tiempo transcurrido desde el tratamiento primario a la muerte por cáncer de mama. Por último en el segundo grupo y en aquellas pacientes del primer grupo que presentaron metástasis durante el seguimiento, se analizó la supervivencia

global desde la metástasis (SG_M), siendo ésta el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica a la muerte por cáncer de mama.

Previo al análisis de la supervivencia, se certificó la calidad de los datos del seguimiento, considerando como criterio de calidad para el análisis una proporción de casos perdidos menor del 15%, así como la ausencia de una diferencia clínicamente significativa entre los tiempos de seguimiento de los casos no censurados y los censurados.

Aquellos pacientes con seguimientos completos pero sin aparición de evento o muerte, así como aquellos que presentaron muerte por otras causas competitivas fueron considerados casos censurados (censurados por la derecha), mientras aquellos casos en los que se desconoce el estado del paciente o se perdió el seguimiento, fueron considerados casos perdidos (censurados por la izquierda). En todos estos casos sin evento o muerte por cáncer de mama, los tiempos se calcularon en función del último seguimiento reglado (o la fecha de muerte por otra causa competitiva cuando fuera aplicable).

Finalmente, se analizó el valor predictivo y pronóstico de los diferentes polimorfismos, los cuáles fueron agrupados para su transformación en variables binomiales de acuerdo con criterios de funcionalidad biológica. A continuación se utilizó el método de Kaplan-Meier para la derivación de las diferentes tablas, curvas y tiempos de supervivencia de cada polimorfismo (ya transformado en variable binomial), comparándose sus curvas mediante la prueba de mantel-Cox (Log-rank). De forma análoga, otras variables pronósticas conocidas fueron también agrupadas en función al conocimiento previo y su desviación de la situación normal o con mejor pronóstico. Aquellas variables continuas en las que no se encontró un valor de referencia establecido se clasificaron en función de su valor mediana. Todas las variables pronósticas o candidatas a estudio fueron introducidas individualmente en un modelo de Cox analizándose su significación mediante la razón de verosimilitud, al mismo tiempo se estimó el valor de su función de riesgo (o hazard ratio) en este modelo. Finalmente, se analizó el valor pronóstico independiente de cada polimorfismo mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox, donde se introdujeron todas aquellas variables con un valor $p \leq 0.05$. También se consideraron en este modelo inicial todos aquellos posibles factores de confusión, que pese a no cumplir el criterio p antes citado, se les conoce un valor pronóstico ampliamente demostrado de forma prospectiva. Finalmente y debido a la posible

repercusión del tratamiento en esta población con un largo seguimiento, se decidió realizar un análisis estratificado según las pacientes fueran tratadas con antraciclinas o sin antraciclinas inicialmente.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, Estados Unidos).

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS

Tal y como se describió en el capítulo anterior (Material y Métodos), hemos estudiado 174 casos de cáncer de mama, con una mediana de edad de 62 años. En el momento del diagnóstico, la paciente más joven tenía 26.5 años, y la más anciana 91.5. El 73% de las pacientes eran postmenopáusicas al diagnóstico.

Se seleccionaron casos de cáncer de mama esporádicos y se comprobó que en las pacientes diagnosticados antes de los 40 años se había llevado a cabo un estudio de los genes de alta penetrancia para cáncer de mama con resultado negativo. Esto permitió identificar a 2 portadoras de mutación en BRCA1 y 1 con alteración de BRCA2 que fueron excluidas del estudio.

1.1. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DE LOS TUMORES

La tabla 10 resume las características anatomopatológicas de los tumores de nuestra muestra. El carcinoma ductal infiltrante (CDI) fue el más frecuente (84.5%), la mayoría con un grado de diferenciación II o III (32.7% y 47.2%, respectivamente) y receptores hormonales (estrógenos+/- progestágenos) positivos (65%). HER2 no estaba amplificado en el 45% de la muestra, aunque hay que reseñar que en casi el 30% de los casos, no se había determinado su expresión. De acuerdo con estas características, más de la mitad de los tumores (67.24%), se corresponden con el fenotipo Luminal ⁶⁸, si bien, con los datos disponibles, no podemos distinguir entre los subgrupos luminal A y B.

Tabla 10: Características anatomopatológicas de los tumores de la muestra

Tipo Histológico	Grado de Diferenciación	Receptor Estrógenos	Receptor Progesterona	HER2	Subtipo Molecular
CDI 147 (84.5%)	Grado I 18 (10.3%)	Positivo 113 (65%)	Positivo 93 (53.4%)	Positivo 32 (18.4%)	Luminal 117 (67.24%)
CLI 12 (6.9%)	Grado II 57 (32.7%)	Negativo 53 (30.5%)	Negativo 69 (39.6%)	Negativo 78 (44.8%)	Triple negativo 29 (16.6%)
Inflamatorio 6 (3.4%)	Grado III 82 (47.2%)	Desconocido 8 (4.5%)	Desconocido 12 (6.8%)	IHQ dudosa/no FISH 17 (9.8%)	HER2 17 (9.7%)
Otros 9 (5.2%)	Desconocido 17 (9.8%)			Desconocido 47 (27%)	No clasificable 11 (6.3%)

1.2. CLASIFICACION TNM DE LOS TUMORES DE LA MUESTRA

En la tabla 11 se recogen las características del tamaño tumoral, afectación ganglionar y la presencia o no de metástasis (TNM) en la muestra.

El 86.2% de los casos presentó enfermedad localizada, de los que el 30% presentaba enfermedad localmente avanzada. El tamaño del 54.6% de los tumores oscilaba entre 2 y 5 cms de diámetro (T2) y en algo más de la mitad de los casos (58%) el tumor había invadido los ganglios axilares, siendo lo más frecuente encontrar de 1 a 3 nódulos positivos (N1). El estadio II fue el más frecuente (47.3%).

De los 14 casos con afectación metastásica inicial, el 64.3% sólo presentaba afectación ósea, una paciente presentaba metástasis dérmicas (7.1%), otra diseminación hepática (7.1%) y en las tres restantes (21.4%) la enfermedad se había extendido a dos o más órganos.

Los datos clínicos de otras 10 pacientes eran incompletos por lo que se incluyeron en el estudio de asociación de casos y controles, pero fueron excluidas del análisis de supervivencia.

Tabla 11: Tamaño tumoral, afectación ganglionar y localización de las metástasis en la muestra.

Pacientes no Metastásicas (n=150)				Pacientes Metastásicas (n=14)	
Tamaño	Frecuencia (%)	Ganglios	Frecuencia (%)	Localización	Frecuencia (%)
0-≤2	54 (36%)	Negativos	62 (41.3%)	Óseas	9 (64.3%)
>2-≤5	82 (54.6%)	Positivos	87 (58%)	Hepáticas	1 (7.1%)
>5	14 (9.3%)	1-3 gl	43 (28.6%)	Dérmicas	1 (7.1%)
		4-9 gl	19 (12.6%)	≥2 localizaciones	3 (21.4%)
		≥10	25 (18.7%)		

Otros factores pronósticos conocidos, como la afectación ganglionar extracapsular, la invasión vascular linfática, la neofromación de vasos o el índice proliferativo no se han analizado por no estar recogidos en una gran proporción de las historias clínicas estudiadas, si bien por otra parte, en el Nottingham Prognostic Index, solamente la afectación ganglionar, el tamaño tumoral y el grado histológico, mostraron ser factores pronósticos independientes¹⁷².

1.3. TRATAMIENTO

1.3.1. TRATAMIENTO LOCAL

1.3.1.1. Tratamiento Quirúrgico

El tratamiento quirúrgico local se realizó mediante mastectomía en el 63.2% de los casos, mediante cuadrantectomía en el 10.3% y tumorectomía en el 21.8%. En cuanto al tratamiento quirúrgico de la axila, solamente en 3 pacientes que habían tenido cirugía sobre la mama no se practicó ningún tipo de linfadenectomía axilar (1.8%). En 24 pacientes, la biopsia del ganglio centinela (BGC) fue negativa. A 139 pacientes (83.4%) se les practicó vaciamiento axilar con o sin BGC previa, no encontrándose infiltración ganglionar en 54 de ellas (38.8%). Las tablas 12 y 13 recogen las pacientes que recibieron cada tipo de tratamiento.

Tabla 12: Frecuencia de los distintos tipos de cirugía local en nuestra muestra

Cirugía local	Frecuencia	%
No	8	4.6
Sí	166	95.4
Mastectomía Total	110	63.2
Cuadrantectomía	18	10.4
Tumorectomía	38	21.8

Tabla 13 : Frecuencia de los distintos tipos de cirugía sobre la axila en nuestra muestra

Cirugía de la Axila	Frecuencia	%
No intervenida	3	1.8
BGC negativa	24	14.4
Vaciamiento	139	83.8
Total	166	100

En cuanto a la cirugía como tratamiento de la enfermedad metastásica, a ninguna de las pacientes de nuestra serie se le practicó exéresis de las metástasis, pero seis de ellas se trataron con cirugía local sobre la mama y la axila (mastectomía y vaciamiento axilar en todos los casos). Esto se debió a que, a menos que la paciente presentase algún signo o síntoma que hiciese sospechar que se había producido la diseminación tumoral, el estudio de extensión en nuestro hospital se realizaba muchas veces tras la cirugía, cuando la paciente era remitida al Servicio de Oncología Médica. Todas ellas presentaban enfermedad ósea como única afectación metastásica.

1.3.1.2. Tratamiento radioterápico

Siguiendo los protocolos del Hospital Universitario de Salamanca, acordes con las recomendaciones internacionales¹⁷³, las pacientes que se intervinieron mediante cuadrantectomía o tumorectomía recibieron posteriormente radioterapia (RT) sobre el tejido mamario remanente. Se les administró una total de 50Gy con un fraccionamiento de 2Gy/sesión y una sobreimpresión del lecho tumoral de entre 10 y 20 Gy con electrones de alto fotovoltaje. También recibieron RT sobre la pared torácica (dosis total de 50 Gy con un fraccionamiento de 2Gy/sesión), aquellas mujeres tratadas mediante mastectomía radical que presentaban cuatro o más ganglios axilares positivos o tumores clasificados como T3-T4 o con infiltración de los bordes quirúrgicos, independientemente del estado ganglionar. La región supraclavicular se irradió en las pacientes con cuatro o más ganglios positivos o en aquellas que teniendo menos de cuatro ganglios infiltrados, se les había practicado una linfadenectomía axilar incompleta. De las 112 pacientes tratadas con RT postoperatoria, 25 (22.3%) recibieron sobreimpresión axilar con electrones de alto fotovoltaje (dosis entre 5 y 15 Gy). Todos los casos se trataron mediante RT externa. Ninguna de las pacientes que recibió tratamiento radioterápico presentaba metástasis al diagnóstico (Tabla 14).

Tabla 14: Pacientes que recibieron RT tras la cirugía

Radioterapia	Frecuencia	%
Sí	112	64.4
No	61	35.1
Desconocido	1	0.6
Total	174	100

1.3.2. TRATAMIENTO SISTÉMICO

1.3.2.1. Tratamiento Quimioterápico

Tal y como se recoge en la Tabla 15, el 87.35% de las pacientes de nuestra serie recibieron tratamiento quimioterápico (QT). La mayoría (71.36%) en adyuvancia tras la cirugía mientras que un 8% lo hizo previamente a la misma. Otro 8% lo recibió como tratamiento paliativo por presentar metástasis en el momento del diagnóstico.

Tabla 15: Distribución de las modalidades de QT

	Frecuencia (%)
Pacientes tratadas SIN QT	22 (12.64)
Pacientes tratadas CON QT	152 (87.35)
Neoadyuvante	14 (8.04)
Adyuvante	124(71.36)
Metastásica	14 (8.04)

Tabla 16: Distribución del tratamiento con y sin antraciclinas

Con Antraciclinas: 94 (61.84%)	Sin Antraciclinas: 58 (38.15%)
Adyuvante: 70 (74.5%) Neoadyuvante: 14(14.9%) Metastásicas: 10 (10.6%)	Adyuvante: 54 (93.1%) Neoadyuvante: 0 Metastásico: 4 (6.9%)

El 62% de las pacientes que recibieron QT recibieron antraciclinas (tabla 16) según los diferentes esquemas recogidos en la tabla 17. De las pacientes tratadas con doxorubicina, 17 recibieron una dosis acumulada de 360mg/m², 49 recibieron 300mg/m², en 5 casos la dosis fue de 240mg/m² y solamente una paciente recibió 200mg/m². De las 15 pacientes tratadas con epirubicina, 4 recibieron 600mg/m², mientras que 5, 3 y 3 recibieron 540mg/m², 360mg/m² y 300mg/m² respectivamente.

El 38.15% de las pacientes tratadas con QT no recibió antraciclinas debido a que fueron casos diagnosticados a comienzos de la década de los 90, antes de los estudios que demostraron el beneficio de su uso en adyuvancia^{174,175}. En los casos diagnosticados posteriormente, el uso de esquemas sin antraciclinas se debió a que las pacientes presentaban bajo riesgo de recaída, comorbilidad cardiaca o eran ancianas.

Tabla 17: Esquemas de tratamiento empleados en las pacientes de nuestro estudio

Esquemas de tratamiento empleados		Nº de pacientes
CMF Ciclofosfamida 600mg/m ² Metotexate 40 mg/m ² 5-Fluoruracilo 600mg/m ²	Cada 21 días x6 ciclos	54 adyuvancia
CAF₆₀ Ciclofosfamida 600mg/m ² Adriamicina 60mg/m ² 5-Fluoruracilo 600mg/m ²	Cada 21 días x6 ciclos	13 adyuvancia 4 neoadyuvancia
CAF₅₀ Ciclofosfamida 500mg/m ² Adriamicina 50mg/m ² 5-Fluoruracilo 500mg/m ²	Cada 21 días x6 ciclos	40 adyuvancia 3 adyuvancia
CAF₅₀ → Paclitaxel CAF x4 seguido de Paclitaxel 100mg/m ² , c/8d x8 ciclos		1 adyuvancia
FEC₁₀₀ 5-Fluoruracilo 600 mg/m ² Epirubicina 100 mg/m ² Ciclofosfamida 600 mg/m ²	Cada 21 días x6 ciclos	3 adyuvancia 1 neoadyuvancia
FEC₁₀₀ → Docetaxel FEC x3 ciclos seguido de Docetaxel 100 mg/m ² c/21d x3 ciclos		1 adyuvancia 2 neoadyuvancia
AC Ciclofosfamida 600 mg/m ² Adriamicina 60 mg/m ²	Cada 15 días x4 ciclos	1 adyuvancia
AC → Paclitaxel AC x4 ciclos seguido de Paclitaxel 90 mg/m ² semanal x8 ciclos		4 adyuvancia
TAC Docetaxel 75mg/m ² Adriamicina 50mg/m ² Ciclofosfamida 500mg/m ²	Cada 21 días x6 ciclos	3 adyuvancia
Docetaxel + Epirubicina Docetaxel 75mg/m ² Epirubicina 90 mg/m ²	Cada 21 días x6 ciclos	4 adyuvancia 1 neoadyuvancia
ECx4 → Docetaxel Epirubicina 90mg/m ² Ciclofosfamida 600mg/m ² Seguido de Docetaxel 100mg/m ² c/21d x4 ciclos	Cada 21 días x4 ciclos	3 neoadyuvancia
Enfermedad Metastásica		
CMF		7 metastásicas
Gemcitabina 1500-2000 mg/m ² Docetaxel 50-60 mg/m ²	Cada 15 días	4 metastásicas
Gemcitabina 1250 mg/m ² Vinorelbina 25 mg/m ²	Cada 15 días	2 metastásicas
Paclitaxel 80 mg/m ² Carboplatino AUC2 Herceptin 2mg/kg	días 1,8 y15 días 1,8 y15 días 1,8,15 y 22	1 metastásica

1.3.2.2. Hormonoterapia

De acuerdo con las series publicadas, el 70% de los tumores expresan receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP), siendo RE+/RP+ o RE+/RP-, entorno al 25% son RE-/RP- y menos de un 5% de los casos son RE-/RP+. Dado que la expresión de los RP depende de la actividad de RE, algunos autores cuestionan la existencia de los tumores RE-/RP+ y consideran que son RE+, pero que se ha producido un error bien durante la realización de la técnica inmunohistoquímica o bien durante su interpretación^{176,177}. Por ello, en el subsiguiente análisis hemos considerado que los tumores que presentan RE+ y/o RP+ son Receptores Hormonales (RH) positivos.

Tal como se refleja en la tabla 18, el 61.8% de la premenopáusicas y el 69.3% de las postmenopáusicas presentaron tumores con receptores hormonales positivos, si bien se desconoce la expresión de estos receptores en el 4% de los casos.

Tabla 18: Expresión de RH en el tumor y status hormonal de las pacientes al diagnóstico.

RECEPTORES HORMONALES (RH)	STATUS HORMONAL		TOTAL
	PREMENOPAUSICAS	POSTMENOPAUSICAS	
RH-	14 (29.8%)	36 (28.3%)	50 (28.8%)
RH +	29 (61.8%)	88 (69.3%)	117 (67.2%)
RH desconocido	4 (8.4%)	3 (2.4%)	7 (4%)
Total	47 (100%)	127(100%)	174 (100%)

139 pacientes (79.8%) recibieron tratamiento hormonal, el 8% como único tratamiento sistémico adyuvante a la cirugía, mientras que la mayoría (65.6%) lo recibió tras la quimioterapia (tabla 19).

Tabla 19: Resumen del tratamiento hormonal

Hormonoterapia (HT)	Frecuencia	%
No HT ni QT	5	2.8
No HT (solo QT adyuvante)	31	17.8
HT como único tto adyuvante a la cirugía	17	9.8
HT como adyuvante tras QT	114	65.5
Metastásicas	11	6.3
Total	174	100

De las 35 de las mujeres premenopáusicas que recibieron hormonoterapia, 34 recibieron Tamoxifeno como primera línea, y 1 fue tratada con Inhibidores de la Aromatasa. Ninguna recibió análogos de LRHR (*hormona liberadora de la gonadotropina*) en combinación. En cuanto a las postmenopáusicas, 48 recibieron Tamoxifeno (37.8%), 56 (44.1%) recibieron un Inhibidor de Aromatasa, y el 18.1% no recibió ningún tipo de hormonoterapia (Tabla 20).

Tabla 20: Tipo de HT recibida en 1ª línea y status hormonal de las pacientes al diagnóstico.

HORMONOTERAPIA	STATUS HORMONAL		TOTAL
	PREMENOPAUSICAS	POSTMENOPAUSICAS	
NO HT	12 (25.6%)	23 (18.1%)	35 (20.1%)
TAMOXIFENO	34 (72.3%)	48 (37.8%)	82 (47.1%)
INHIBIDORES AROMATASA	1(2.1%)	56 (44.1%)	57(32.8%)
TOTAL	47 (100%)	127 (100%)	174 (100%)

2. ESTUDIO DE XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met}

Las variantes XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Met} se han asociado una menor capacidad de reparación en estudios funcionales, si bien la magnitud de su aportación al incremento de riesgo de diferentes tipos tumorales y entre ellos el cáncer de mama es muy controvertida. También se discute su papel en relación con la respuesta a quimioterápicos, especialmente a sales de platino y antraciclinas y con la mayor o menor sensibilidad a la aparición de efectos secundarios postradioterapia.

A continuación, se presenta el análisis de la frecuencia de estos polimorfismos en los grupos caso y control de nuestra muestra (apartado 2.1), su frecuencia en relación con los diferentes grupos de edad (apartado 2.2), en relación con el tratamiento radioterápico (apartado 2.3) y en relación con el tratamiento quimioterápico (apartado 3). Este último análisis se expone en un apartado independiente debido a su extensión.

2.1. Estudio de XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en casos y controles

La tabla 21 resume la distribución de los diferentes genotipos estudiados en los 174 casos y 174 controles pareados en función de la edad.

No hemos encontrado diferencias en la frecuencia de los diferentes genotipos de XPD_{Lys751Gln} entre casos y controles ($p=0.944$) ni en XRCC3_{Thr241Met} ($p=0.670$). En cambio, la diferencia que se observan en XRCC1_{Arg399Gln} sí es estadísticamente significativa ($p<0.007$). Se repitió el análisis agrupando los diferentes genotipos según su significación biológica para establecer a cuál de ellos se debe la diferencia. Encontramos que Arg/Arg, con capacidad de reparación intacta, es más frecuente en el grupo control mientras que Gln/Gln y Gln/Arg son mas frecuentes entre los casos ($p<0.002$, OR: 1.96, IC95% 1.3-3), (Tabla 22).

Tabla 21: Distribución de los diferentes genotipos XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en casos y controles

	CASOS (n=174)		CONTROLES (n=174)		p-valor
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	
XPD_{Lys751Gln}					0.944
Lys/Lys	75	43.1%	72	41.4%	
Lys/Gln	81	46.6%	84	48.3%	
Gln/Gln	18	10.3%	18	10.3%	
XRCC1_{Arg399Gln}					0.007
Gln/Gln	17	9.8%	10	5.7%	
Gln/Arg	87	50%	65	37.4%	
Arg/Arg	70	40.2%	99	56.9%	
XRCC3_{Thr241Met}					0.670
Thr/Thr	65	37.4%	69	39.6%	
Thr/Met	81	64.6%	73	42%	
Met/Met	28	16%	32	18.4%	

Tabla 22: Distribución de los genotipos de XRCC1_{Arg399Gln}

XRCC1 _{Arg399Gln}	CASOS		CONTROLES		p-valor
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	
Gln/Gln +Arg/Gln	104	59.8%	75	43.1%	<p>p=0.002 OR: 1.96 (IC95%: 1.3-3)</p>
Arg/Arg	70	40.2%	99	56.9%	

2.2. Estudio de XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en relación con la edad en los grupos caso y control

A continuación, se presenta el análisis de la distribución de los diferentes genotipos de XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en función de la edad, en ambos grupos, caso y control.

2.2.1. Controles

La tabla 23 muestra la frecuencia de las diferentes variables del estudio en los 300 controles de la muestra. No se encontró ninguna asociación entre los diferentes genotipos y la edad en el grupo de individuos sanos ($p=0.406$, $p=0.782$ y $p=0.667$ para XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met}, respectivamente).

Tabla 23: Distribución de los diferentes genotipos de XPD_{Lys751}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en el grupo control en función de la edad

	N	Edad				p-valor	
		Mediana	Mínimo	Máximo	Media		Desv.Stand
XPD_{Lys751Gln}							
Lys/Lys	115	59	23.5	96.5	60.25	17.66	0.406
Lys/Gln	151	65.5	20.5	98.5	63.15	19.27	
Gln/Gln	34	64	20.5	89.5	60.88	18.24	
Total	300	63.5	20.5	98.5	61.78	18.54	
XRCC1_{Arg399Gln}							
Gln/Gln	33	62.5	20.5	94.5	60.26	20.63	0.782
Gln/Arg	126	65.5	22.5	96.5	62.55	18.90	
Arg/Arg	141	61.5	20.5	98.5	61.43	17.80	
Total	300	63.5	20.5	98.5	61.78	18.54	
XRCC3_{Thr241Met}							
Thr/Thr	120	61.5	23.5	96.5	60.69	18.75	0.667
Thr/Met	128	63.5	20.5	95.5	62.27	18.56	
Met/Met	52	66.5	20.5	98.5	63.04	18.26	
Total	300	63.5	20.5	98.5	61.77	18.54	

2.2.2. Casos

El estudio de los diferentes genotipos entre los casos (tabla 24) mostró que existe una diferencia en la distribución de las variantes de XRCC1_{Arg399Gln} en relación con la edad. Tomando como punto de corte la mediana de edad de las pacientes (62 años), se observa que el genotipo Lys/Lys, asociado a una mayor capacidad de reparación del ADN, es más frecuente entre las mujeres que desarrollan cáncer de mama a edades más tardías ($p<0.001$), OR: 3.52 (IC: 3-5.44) (Tabla 25).

Tabla 24: Distribución de los diferentes genotipos de XPDlys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met entre los casos en función de la edad.

	N	Edad				p-valor	
		Mediana	Mínimo	Máximo	Media		Desv.Stan
XPDlys751Gln							
Lys/Lys	75	65.5	29.5	86.5	63.71	12.55	0.001
Lys/Gln	81	58.5	26.5	91.5	58.24	13.48	
Gln/Gln	18	58	33.5	67.5	53.78	11.34	
Total	174	62	26.5	91.5	60.14	13.24	
XRCC1Arg399Gln							
Gln/Gln	17	59.5	33.5	79.5	57.51	14.74	0.645
Gln/Arg	87	61.5	26.5	86.5	59.71	13.76	
Arg/Arg	70	62.5	33.5	91.5	61.31	12.26	
Total	174	62	26.5	91.5	60.14	13.24	
XRCC3Thr241Met							
Thr/Thr	65	62.5	26.5	82.5	61.47	13.11	0.389
Thr/Met	81	60.5	29.5	91.5	59.87	13.22	
Met/Met	28	58.5	33.5	86.5	57.82	13.72	
Total	174	62	26.5	91.5	60.14	13.24	

Tabla 25: Distribución de los genotipos de XPDlys751Gln en relación con la mediana de edad de los casos

XPD Lys751Gln	Edad		Total	p-valor
	≤62 años	>62 años		
Gln/Gln +Lys/Gln	60 (69%)	39(44.8%)	99(56.9%)	0.001 OR= 3.52 (IC: 3-5.44)
Lys/Lys	21(31%)	48(55.2%)	75(43.1%)	
Total	87 (100%)	87(100%)	174(100%)	

Cuando se analiza la frecuencia de las diferentes variables de XPDlys751Gln atendiendo al status hormonal en el momento del diagnóstico, las diferencias se mantienen ($p=0.023$) (Tabla 26)

Tabla 26: Distribución de los genotipos de XPD_{Lys751Gln} entre los casos en función del status hormonal al diagnóstico

	Status Hormonal		p-valor
	Premenopausia	Postmenopausia	
XPD_{Lys751Gln}			
Lys/Lys	14 (29.7%)	61 (48%)	0.023
Lys/Gln + Gln/Gln	33 (70.3%)	66 (52%)	
Total	47	127	

2.3. Estudio de XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en relación con el tratamiento radioterápico

La severidad del daño del tejido normal tras un tratamiento radioterápico está fundamentalmente relacionada con factores asociados a la exposición, pero éstos no son suficientes para explicar la variabilidad de la respuesta que se observa entre unos y otros pacientes. A este respecto, existen evidencias que indican que estas diferencias en los efectos secundarios dependen de factores asociados con el tratamiento, pero también del propio paciente, como la edad, el índice de masa corporal y factores genéticos que condicionarían la radiosensibilidad individual^{178,179}.

Puesto que la radioterapia ejerce sus efectos citotóxicos a través del daño que induce en las células, proteínas y ADN, donde induce rotura de cadena simple pero también de doble cadena, la capacidad de cada individuo de reparar el ADN dañado podría modificar la respuesta del tejido normal a la radiación.

2.3.1. Toxicidad cutánea aguda post-radioterapia

La toxicidad cutánea postradioterapia es un hecho frecuente que habitualmente se presenta en sus formas más leves. Ciento doce de las pacientes de nuestro estudio recibieron tratamiento radioterápico sobre la mama, (en el caso de la cuadrantectomía o tumorectomía) o sobre el lecho de mastectomía. La toxicidad se recogió según los criterios de la RTOG (Radiation Therapy Oncology Group), (tabla 27).

Tabla 27: Toxicidad aguda cutánea post-radioterapia según criterios RTOG

Grado 0	Ningún cambio
Grado 1	Erupción maculo-papular o eritema aislado y asintomático
Grado 2	Erupción máculo-papular o eritema con prurito u otros síntomas asociados
Grado 3	Erupción macular, papular o vesicular, generalizada y sintomática
Grado 4	Dermatitis exfoliativa o ulcerativa. Necrosis tisular.

Como se observa en la tabla 28, la toxicidad más frecuente en nuestra serie fue el eritema local acompañado o no de prurito (toxicidad grado 2 y 1, respectivamente). Solamente se presentó el caso de una paciente con toxicidad grado 4 debido a dermatitis ulcerativa. En la historia clínica de 26 pacientes los datos de toxicidad aguda estaban incompletos, por lo que para el análisis la muestra se reduce a 86 pacientes.

Tabla 28: Frecuencia de los diferentes grados de toxicidad post-RT en la muestra

Toxicidad cutánea aguda post RT	Frecuencia	%
Grado 0	14	12.5
Grado 1	27	24.1
Grado 2	29	25.9
Grado 3	15	13.4
Grado 4	1	0.9
Desconocido	26	23.2
Total	112	100

En la tabla 29 se recogen las frecuencias de las diferentes variables genotípicas en relación a la toxicidad cutánea aguda. Acorde con nuestros resultados no se puede establecer relación de dependencia entre ninguna de las variantes genéticas estudiadas y la aparición y severidad de toxicidad post-radioterapia.

Dado que la toxicidad aguda depende de la dosis total y del tiempo de administración, analizamos si la sobreimpresión axilar con electrones de alto fotovoltaje se asociaba a un incremento de la toxicidad cutánea. Solamente 23 de las 86 pacientes de las que se dispone de datos de toxicidad aguda postradioterapia, recibieron sobreimpresión axilar (Tabla 30). En estas pacientes, la toxicidad grado 3 y 4 fue más frecuente, aunque no se alcanzó la significación estadística (p=0.088).

Tabla 29: Distribución de los diferentes grados de toxicidad aguda post-RT en relación con las variantes de XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met}

	Toxicidad Aguda post-radioterapia			Total	p-valor
	Ausente (Grado 0)	Leve (Grado1-2)	Severa (Grado3-4)		
XPD_{Lys751Gln}					
Lys/Lys	6 (42.9%)	19 (33.9%)	10 (62.5%)	35	0.208
Lys/Gln	5 (35.7%)	31 (55.4%)	5 (31.3%)	41	
Gln/Gln	3 (21.4%)	6 (10.7%)	1 (6.3%)	10	
Total	14	56	16	86	
XRCC1_{Arg399Gln}					
Gln/Gln	2 (14.3%)	10 (17.9%)	1 (6.3%)	13	0.728
Gln/Arg	6 (42.9%)	26 (46.4%)	7 (43.8%)	39	
Arg/Arg	6 (42.9%)	20 (35.7%)	8 (50%)	34	
Total	14	56	16	86	
XRCC3_{Thr241Met}					
Thr/Thr	5 (35.7%)	16 (28.6%)	8 (50%)	29	0.453
Thr/Met	6 (42.9%)	29 (51.8%)	7 (43.8%)	42	
Met/Met	3 (21.4%)	11 (19.6%)	1 (6.3%)	15	
Total	14	56	16	86	

Tabla 30: Grados de toxicidad aguda post-RT en relación con la sobreimpresión axilar.

Toxicidad aguda postRT	Boost axilar		p-valor
	Sí	No	
Grado 0-2	16 (69%)	54 (85%)	0.088
Grado 3-4	7 (30.43%)	9 (14.28%)	
Total	23	63	

2.3.2. Toxicidad crónica post-radioterapia

La toxicidad dérmica crónica post-radioterapia incluye fenómenos como fibrosis, alteraciones de la pigmentación cutánea o teleangiectasias. En la historia clínica de 21 pacientes (18.75%) estos datos estaban incompletos, por lo que no se incluyeron en el análisis (n=91). 32 mujeres que habían recibido RT presentaron datos de toxicidad crónica (35.16%). La presencia de fibrosis fue el evento más frecuente, fenómeno que en el caso de la patología mamaria está también íntimamente relacionado con el tratamiento quirúrgico.

No hemos encontrado diferencias entre la frecuencia de las diferentes variables genotípicas y el desarrollo de toxicidad crónica (Tabla 31).

Tabla 31: Toxicidad crónica postRT en relación con los genotipos de XPDLys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met

	Toxicidad Crónica post-RT		Total	p-valor
	Ausente	Presente		
XPDLys751Gln				0.097
Lys/Lys	20 (33.9%)	18 (56.3%)	38 (41.8%)	
Lys/Gln	30 (50.8%)	12 (37.4%)	42 (46.2%)	
Gln/Gln	9 (15.3%)	2 (6.3%)	11 (12%)	
Total	59	32	91	
XRCC1Arg399Gln				0.756
Gln/Gln	8 (13.6%)	5 (15.6%)	13 (14.2%)	
Gln/Arg	26 (44%)	16 (50%)	42 (46.2%)	
Arg/Arg	25 (42.4%)	11 (34.4%)	36 (39.6%)	
Total	59	32	91	
XRCC3Thr241Met				0.609
Thr/Thr	18 (30.5%)	13 (40.6%)	31 (34.1%)	
Thr/Met	29 (49.2%)	14 (43.8%)	43 (47.3%)	
Met/Met	12 (20.3%)	5 (15.6%)	17 (18.7%)	
Total	59	32	91	

De las 91 pacientes de las que se tienen datos de toxicidad crónica postradioterapia, solamente 23 recibieron sobreimpresión axilar. En nuestra serie, no existe relación entre la sobreimpresión axilar y el desarrollo de toxicidad dérmica tardía (Tabla 32).

Tabla 32: Frecuencia de toxicidad crónica post-RT en relación con la sobreimpresión axilar.

Toxicidad crónica Post-RT	Boost Axilar		p-valor
	No	Sí	
No	47 (70.14%)	12 (52.17%)	0.118
Sí	20 (29.85%)	11(47.8%)	
Total	67	23	

2.3.3. Recidiva local tras RT

Con una mediana de seguimiento de 60 meses, 12 de las 112 pacientes tratadas mediante cirugía de la mama y RT (10.7%), presentaron una recidiva local. Se observan algunas diferencias entre las pacientes que recayeron localmente y las que no en relación con XPD_{Lys751Gln} donde la variante Lys/Lys es menos frecuente entre las pacientes con recidiva (43%vs8.3%), pero la diferencia no alcanza la significación estadística (p=0.062) (Tabla 33).

Tabla 33: Recaída local tras RT en relación con los diferentes SNPs de XPD, XRCC1 y XRCC3

	Recidiva local		Total	p-valor
	No	Sí		
XPD_{Lys751Gln}				0.062
Lys/Lys	43 (43%)	1 (8.3%)	44 (39.28%)	
Lys/Gln	44 (44%)	9 (75%)	53 (47.32%)	
Gln/Gln	13 (13%)	2 (16.6%)	15 (13.39%)	
Total	100	12	112	
XRCC1_{Arg399Gln}				0.673
Gln/Gln	13(13%)	1 (8.3%)	14(12.5%)	
Gln/Arg	45 (45%)	7(58.3%)	52 (46.4%)	
Arg/Arg	42 (42%)	4(33.3%)	46 (41.1%)	
Total	100	12	112	
XRCC3_{Thr241Met}				0.626
Thr/Thr	38 (38%)	3(25%)	41 (36.6%)	
Thr/Met	45 (45%)	6(50%)	51 (45.5%)	
Met/Met	17 (17%)	3 (25%)	20 (17.8%)	
Total	100	12	112	

3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

En la primera parte de este apartado, se presenta el estudio del valor pronóstico de las diferentes variantes polimórficas de XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en relación con la Supervivencia Global (SG) y Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) en el grupo de pacientes con estadios tempranos al diagnóstico. En este grupo de pacientes, también se analizó el valor pronóstico en nuestra serie de los factores pronósticos clásicos (tamaño tumoral, ganglios axilares, grado tumoral, receptores hormonales y HER2).

Para determinar el impacto de XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en el pronóstico de las pacientes que recibieron tratamientos quimioterápicos basados en antraciclinas, se analizaron por separado los datos de SG y SL del grupo de 84 pacientes que recibieron tratamiento adyuvante o neoadyuvante con estos citotóxicos. Dado que la administración de quimioterapia antes y después de la cirugía presentan tasas de SLE y SG similares¹⁸⁰, se decidió incluir a todas estas pacientes en un mismo grupo para el análisis

En la segunda parte de este apartado, se analiza el valor pronóstico de estos polimorfismos en relación con la Supervivencia Global desde la Metástasis (SG_M) en el grupo de pacientes que presentó diseminación metastásica de la enfermedad.

La mediana de seguimiento de nuestras pacientes ha sido de 62 meses (11-228), por lo que se presentan los datos de supervivencia a 5 años (60 meses).

3.1. PACIENTES CON ENFERMEDAD LOCAL

3.1.1. ANALISIS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE)

De las 150 pacientes no metastásicas al diagnóstico, 65 presentaron algún tipo de evento en los 60 meses siguientes al diagnóstico, con lo que la SLE a los 5 años fue del 69.9% (62.85%-77,75%).

A continuación, se muestra el valor pronóstico para SLE de la afectación ganglionar, el tamaño y el grado tumoral, la expresión de receptores hormonales y HER2 y de las diferentes variantes de XPD^{Lys751Gln}, XRCC1^{Arg399Gln} y XRCC3^{Thr241Met}, en las pacientes de nuestra muestra.

3.1.1.1. Afectación de ganglios axilares

La presencia o no de metástasis en los ganglios de la axila es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama intervenido, tanto para la SLE como para la SG^{9,181}.

De las 150 pacientes de nuestra serie con enfermedad localizada, 85 presentaban afectación ganglionar al diagnóstico. Solamente tres pacientes presentaron micrometástasis ganglionares (<2mm), que a efectos pronósticos y de tratamiento fueron consideradas como ganglios negativos, por lo que en este análisis las incluimos en dicho grupo. En otros tres casos, se desconoce la afectación ganglionar, por lo que se asumieron como valores perdidos para el análisis estadístico.

Hubo 50 eventos entre los casos con ganglios positivos, con una SLE durante los primeros 60 meses del 59.5% y con una mediana de SLE de 78.5 meses (Tabla 34). La diferencia con las pacientes sin ganglios afectados es estadísticamente significativa ($p=0.002$)

Tabla 34: Impacto de la afectación ganglionar axilar en la SLE a 60 meses.

Afectacion axilar	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
Ganglios -	62	15	83.2%(73.6-92.8)	-	p=0.002
Ganglios +	85	50	59.5%(48.7-70.3)	78.5 (63.8-93.2)	

No se dispone de los datos de afectación ganglionar axilar de 3 pacientes.

3.1.1.2. Tamaño tumoral

Después del estado ganglionar, el diámetro tumoral se considera el factor pronóstico más importante, tanto para la SLE como para SG¹⁸².

En nuestra muestra, a pesar de que la recaída a los 60 meses es mayor en los tumores mayores de 5 cms que en los de menor tamaño (76.8%, 68.7% y 53.8%), la diferencia no alcanza la significación estadística debido a la amplitud de los intervalos de confianza (Tabla 35).

Tabla 35: Impacto del tamaño tumoral en la SLE a 60 meses

Tamaño Tumoral	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
≤2 cms	50	16	78.6% (66.6-90.6)	94.5 (75.4-113.6)	p=0.537
>2-≤5 cms	81	37	68.7% (58.3-79.1)	110.5 (78.2-142.8)	
>5 cms	13	7	53.8% (26.8-80.8)	86.5 (0.5-184.8)	

No se dispone de los datos del tamaño tumoral de 6 pacientes

3.1.1.3. Grado tumoral

El sistema más comúnmente empleado es el de Scarff-Bloom-Richardson¹⁸³, que combina criterios histológicos (formación de túbulos) con los citológicos (pleomorfismo nuclear). Así, los tumores se clasifican en Grado I: Bien diferenciado, Grado II: Moderadamente diferenciado y Grado III: Pobremente diferenciado. Los tumores grado II y III se han asociado con un peor pronóstico¹⁸⁴, resultado que también se observa en nuestra muestra, donde la SLE a 5 años en los tumores de grado I es del 100% y cae al 62.9% en los tumores grado III (Tabla 36).

Tabla 36: Impacto del grado tumoral en la SLE a 60 meses

Grado Tumoral	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
Grado I	18	2	100%	-	p=0.013
Grado II	51	14	78.1%(65.1-91.1)	278.5	
Grado III	74	34	62.9%(51.1-74.7)	84.5(65-104)	

No se disponen de los datos de 22 pacientes

3.1.1.4. Receptores hormonales

La expresión de los receptores de estrógenos y de progestágenos tiene principalmente un valor predictivo de respuesta al tratamiento hormonal, aunque también poseen un significado pronóstico. Se ha observado que los tumores RH positivos poseen mayores tasas de SLE a corto plazo que el grupo RH negativos, si bien estas diferencias se diluyen en el seguimiento a largo plazo, y sin que se observen diferencias en la SG^{185,186}. Por el contrario, en el análisis multivariante de Kollias et al, la expresión de receptores hormonales por parte del tumor no se confirmó como factor pronóstico independiente¹⁷².

En nuestro análisis, no hemos encontrado ninguna diferencia en la tasa de recaída a 60 meses en función de la expresión de receptores hormonales (Tabla 37). Todas las pacientes con expresión de RH habían recibido tratamiento hormonal adyuvante.

Tabla 37: Impacto de los receptores hormonales del tumor en la SLE a 60 meses

Receptores Hormonales (RH)	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
RH negativos	47	19	70% (56.3-83.7)	90.5	p=0.818
RH positivos	96	35	71.7% (61.9-81.5)	111.5 (81.1-141.9)	

No se dispone de los datos de RH de 7 pacientes

3.1.1.5. HER2

El gen *HER2* forma parte de la familia de receptores del factor de crecimiento epidermoide (EGFR) y se encuentra amplificado en el 20% de los tumores de la mama¹⁸⁷. Posee valor pronóstico en cuanto que la sobreexpresión de HER2 se ha asociado con formas de la enfermedad más agresivas, con SLE y SG más cortas^{188,189}. Pero desde la aparición del anticuerpo monoclonal Trastuzumab, su papel principal es el de predictor de respuesta a los tratamientos anti- HER2.

En el momento del diagnóstico de las pacientes de nuestra serie (1990-2004) no se había aprobado la administración de Trastuzumab en adyuvancia, por lo que en algunas ocasiones no se realizaba la determinación de HER2. En total, son 43 las pacientes de las que no disponemos, incluidos 12 casos en los que la sobreexpresión de HER2 era dudosa y no fue confirmada mediante FISH, que han sido excluidos del análisis.

A pesar de que la muestra para este análisis se reduce a 106 pacientes, se observan diferencias en la supervivencia de aquellas con y sin sobreexpresión de HER2, lo que es acorde con la literatura¹⁸⁸. El 48% de las pacientes HER2 positivo recayeron antes de los 60 meses y la mediana de SLE (70.5 meses) es inferior a la que presentaron las pacientes HER2 negativas

(p=0.047) (Tabla 38). Ninguna de estas pacientes había recibido trastuzumab como tratamiento neoadyuvante o adyuvante.

Tabla 38: Efecto de la sobreexpresión de HER2 sobre la SLE a 60 meses

HER2	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
HER2 negativo	77	25	75.7% (65.9-85.5)	90.5 (47.9-133.1)	p=0.047
HER2 positivo	29	15	52.1% (32.9-12.3)	70.5 (32.9-108.1)	

Se desconocen los datos de sobreexpresión de HER2 en 43 pacientes

3.1.1.6. Edad

El impacto pronóstico de la edad y del estado menstrual han sido ampliamente discutidos, si bien parece que las pacientes que desarrollan cáncer de mama antes de los 35 años tienen mayor riesgo de recidiva local y a distancia.

En nuestra muestra, solamente 5 pacientes habían presentado la enfermedad antes de los 35 años y todas ellas habían desarrollado metástasis en el momento del diagnóstico.

3.1.1.7. Otros

Otros factores con implicaciones pronósticas como son la infiltración linfocelular o el índice de proliferación no han podido ser analizados ya que no fueron determinados en el diagnóstico histológico original.

3.1.1.8. Análisis de XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln en relación con SLE en los estadios tempranos de cáncer de mama

A continuación se analiza el impacto de los diferentes SNP de nuestro estudio sobre la SLE de las pacientes con cáncer de mama local. Como puede observarse en la tabla 39, las variantes XPD 751Lys, XRCC1 399Arg y XRCC3 241Met se asocian con menor número de eventos y mayor SLE, pero estas diferencias no alcanzan la significación estadística en el análisis univariante, motivo por el que no se continuó con el análisis.

Tabla 39: Frecuencia de las diferentes variables de XPDlys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met en relación con la SLE en pacientes con cáncer de mama en estadios localizados

Genotipo	N	Eventos	SLE	Mediana	p-valor
XPDlys751Gln					
Lys/Lys	66	23	79.5%(69.5-89.5)	18.5 (101.8-135.4)	p=0.076
Lys/Gln + Gln/Gln	84	42	63.1%(52.7-73.5)	84.5 (62.9-106.1)	
Total	150	65			
XRCC1Arg399Gln					
Arg/Arg	60	19	80.5%(70.1-90.9)	94.5(46.7-142.3)	p=0.09
Gln/Gln + Gln/Arg	90	46	63.6%(53.4-73.8)	90.5(55.9-125.1)	
Total	150	65			
XRCC3Thr241Met					
Met/Met	25	8	86.6%(71.7-100)	92(47.6-337.4)	p=0.126
Thr/Thr + Thr/Met	125	57	66.4%(57.8-75)	90.5(65.9-115.1)	
Total	150	65			

En nuestra muestra, por lo tanto, solamente la afectación de los ganglios axilares y el grado tumoral se mostraron como factores predictores de SLE en las pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos.

3.1.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG)

La supervivencia global a los 60 meses de las 150 pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos en el momento del diagnóstico fue del 84.2% (IC95% 78.1 - 90.3). La SG mediana fue 140.5 meses (IC95% 108-172.3).

3.1.2.1. Afectación de ganglios axilares

Tal y como se señaló anteriormente, la presencia o no de metástasis en los ganglios de la axila es el factor pronóstico independiente más importante en el cáncer de mama operado, tanto para la SLE como para SG.

Como se muestra en la tabla 40, el 21.8% de las pacientes con afectación ganglionar axilar fallecieron en los 60 meses posteriores al diagnóstico, frente al 10% en el caso de las pacientes sin metastatización axilar, diferencia que es estadísticamente significativa ($p=0.023$)

Tabla 40: Afectación ganglionar axilar y supervivencia global.

Afectación axilar	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
Ganglios –	62	13	89.9% (82.3-97.5)	-	p= 0.023
Ganglios +	85	40	79.2% (70-88.4)	124.5 (114.4-154.6)	

No se dispone de los datos de afectación ganglionar axilar de 3 pacientes.

3.1.2.2. Tamaño tumoral

El tamaño tumoral es el segundo factor pronóstico más importante para la SG¹⁸². En nuestro análisis sin embargo, no se observa diferencia estadística en relación con este parámetro, a pesar de que el 40% de las pacientes diagnosticadas con tumores > 5cm fallecieron antes de los 60 meses, y la mediana de supervivencia fue de 77.5 meses, frente al 85% de las pacientes

diagnosticadas con tumores de menor tamaño que seguían vivas a los 5 años (Tabla 41). De nuevo, la amplitud de los intervalos de confianza impide que esta diferencia alcance la significación estadística ($p=0.085$).

Tabla 41: Impacto del tamaño tumoral en la SG

Tamaño Tumoral	N	Fallecimientos a 60 meses	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
≤2 cms	50	16	85.2% (74-96.4)	123.2 (109.4-137.6)	p=0.085
>2-≤5 cms	81	37	86.8% (79.2-94.4)	143.5 (-)	
>5 cms	13	7	58.6% (30.4-85)	77.5 (39.66-115.34)	

No se dispone de los datos del tamaño tumoral de 6 pacientes

3.1.2.3. Grado tumoral

La tabla 42 muestra la relación entre el grado de diferenciación de los tumores de nuestra muestra y la SG. La diferencia que se observa es estadísticamente significativa ($p=0.018$). Cuando se realizan comparaciones parciales, se observa que esta diferencia en el pronóstico es atribuible a los tumores de grado III, mientras que los tumores grado I y II tienen un comportamiento similar ($p=0.196$) (Tablas 42 y 43)

Tabla 42: Grados de diferenciación tumoral en relación con la SG.

Grado Tumoral	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
Grado I	18	2	100%	228.5(71-386)	p=0.018
Grado II	51	10	92.2%(83.6-100)	140.5(115.3-165.7)	
Grado III	74	29	73.4%(62.4-84.4)	121.5(74.5-18.5)	

No se dispone del grado tumoral de 7 pacientes

Tabla 43: Impacto del grado tumoral en la SG (Grado I y II agrupados)

Grado Tumoral	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
Grado I-II	69	12	94% (87.7-100)	228 (71.9-385.1)	p=0.007
Grado III	74	29	73.4% (62.4-84.4)	121.5(74.5-168.5)	

No se dispone del grado tumoral de 7 pacientes

3.1.2.4. Receptores hormonales

En nuestra muestra, la expresión de RH por parte del tumor, no afecta la SG a 60 meses de las pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos (Tabla 44). Como se comentó anteriormente, todas las pacientes con expresión tumoral de RE, recibieron tratamiento hormonal adyuvante.

Tabla 44: Impacto de los receptores hormonales del tumor en la SG

Receptores Hormonales (RH)	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
RH negativos	47	16	76.9%(64.4-89.4)	-	p=0.653
RH positivos	96	29	89.1%(81.8-96.4)	132.5(103.5-161.5)	

No se dispone de los datos de RH de 20 pacientes

3.1.2.5. HER2

La sobreexpresión tumoral de HER2 se muestra como un factor pronóstico de SG, ya que el 86% de las pacientes con tumores HER2 negativo y el 71% de las pacientes con tumores que sobreexpresaban HER2 estaban vivas a los 60 meses (p=0.016) (tabla 45). Ninguna de las pacientes con amplificación de HER2 recibió trastuzumab de forma adyuvante o neoadyuvante.

Tabla 45: Efecto de la sobreexpresión de HER2 sobre la SG

HER2	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
HER2 negativo	77	18	86.3% (77.9-94.7)	143 (-)	p=0.016
HER2 positivo	29	13	71.1% (54.6-88.2)	99.5(56.1-142.9)	

Se desconocen los datos de sobreexpresión de HER2 en 43 paciente

3.1.2.6. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln en relación con SG

En la tabla 46 se muestran los datos de SG en relación a la distribución de los diferentes genotipos de los SNP estudiados. Se observa que los individuos que portan la variable XRCC3Met241Met, presentan una SG a los 60 meses de 96.2% vs 81.4% en las pacientes homocigotas o heterocigotas para Thr (p=0.022)

Tabla 46: SG en relación con las variantes de XPDlys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met

Genotipo	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana de SG (a 60 meses)	p-valor
XPDlys751Gln					p=0.902
Lys/Lys	66	21	79.6%(69-90.2)	143.5(107-180)	
Lys/Gln + Gln/Gln	84	32	87.1%(79.5-94.7)	134(109-159.1)	
Total	150				
XRCC1Arg399Gln					p= 0.268
Arg/Arg	60	16	92.4%(85.2-99.6)	146.5(124-168.8)	
Gln/Gln + Gln/Arg	90	37	78.4%(69.4-87.4)	129.5(105.6-153.4)	
Total	150				
XRCC3Thr241Met					p=0.022
Met/Met	26	5	96.2%(88.8-100)	-	
Thr/Thr + Thr/Met	124	48	81.4%(74.1-88.7)	124.5(112.8-136.2)	
Total	150				

Por lo tanto, en el análisis univariante, solamente XRC3Met241Met, la afectación ganglionar axilar, el grado de diferenciación tumoral y la expresión de HER2 lograron la significación estadística, (XRCC3Thr241Met $p=0.022$, afectación ganglionar 0.023, grado tumoral $p=0.007$ y expresión de HER 2 $p=0.016$).

El análisis multivariante se realizó mediante un modelo de Regresión de Cox, y en él sólo se incluyeron las variables con un valor de significación $p\leq 0.05$. Tras el análisis, solamente el grado histológico mantuvo la significación como variable pronóstica independiente ($p=0.022$), aunque la afectación ganglionar axilar rozó la significación con un valor de p de 0.059 y XRCC3Thr241Met no se confirmó como variable independiente ($p= 0.09$). El Hazard Ratio para el grado de diferenciación tumoral III fue 2.26 (IC95% 1.13 - 4.55).

3.1.3. ANALISIS DE SUPERVIVENCIA EN PACIENTES TRATADAS CON ANTRACICLINAS EN ADYUVANCIA O NEOADUVANCIA

Se han descrito múltiples actividades biológicas de las antraciclina, entre las que destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad diversa. Esta acción modifica las propiedades del ADN, pero por sí misma no es suficiente para ejercer su acción citotóxica. Una de las actividades críticas es la inhibición de la Topoisomerasa II (Topo II). Esta encima, provoca cortes transitorios de una o de las dos cadenas de ADN, provocando el desenrollamiento de la doble hélice y facilitando así los proceso de síntesis y transcripción del ADN. Las antraciclina se fijan al complejo ADN-TopoII, estabilizándolo, lo que facilita la rotura tanto de las cadenas sencillas y dobles del ADN. Además, las antraciclina forman radicales libres por reducción encimática, provocando nuevos daños en la cadena del ADN. Las antraciclina también pueden alterar la membrana, inhibir la fosforilación oxidativa de las mitocondrias e inhibir diversas encima reparadoras de ADN y ARN¹⁹⁰.

La capacidad de reparación de estas lesiones por parte de la célula tumoral podría estar en relación con la resistencia y sensibilidad a este tipo de drogas. La presencia de determinadas variantes de los genes encargados de esta función, sobre todo de aquellos que intervienen en la reparación de roturas de ADN sencillas o de doble cadena, podrían influenciar la respuesta a estos fármacos.

De las 150 pacientes con enfermedad local, 84 recibieron tratamiento con antraciclinas, 70 de forma adyuvante y 14 en neoadyuvancia. Los esquemas empleados se recogen en la tabla 17. La quimioterapia pre y postoperatoria presentan tasas de supervivencia comparables¹⁸⁰, por lo que para el análisis de SLE y SG se han analizado de forma conjunta.

En nuestro estudio, hemos analizado tanto la supervivencia libre de enfermedad como la supervivencia global como marcadores de la efectividad de estos fármacos.

3.1.3.1. SLE en pacientes tratadas con antraciclinas en adyuvancia o neoadyuvancia

El 60.2% (IC:49.4-71) de las 84 pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico con esquemas basados en antraciclinas estaba libre de enfermedad a los 60 meses, con una mediana de SLE de 75.5 meses (IC: 54.2-96.8)

En la tabla 47 se refleja como las variantes XRCC1Arg399Arg y XRCC3Met241Met, se asocian con una mayor SLE.

Tabla 47: SLE en relación con las variantes de XPDLys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met en pacientes no metastásicas tratadas con antraciclinas

Genotipo	N	Eventos	SLE	Mediana SLE (60 meses)	p-valor
XPDLys751Gln					
Lys/Lys	34	12	69%(52.9-85.1)	111.5(50.5-164)	p=0.276
Lys/Gln + Gln/Gln	50	27	54.4%(40.3-68.5)	69.5(46-92.8)	
Total	84	39			
XRCC1Arg399Gln					
Arg/Arg	32	6	84%(71.1-92.9)	84.5(64.7-103.5)	p=0.007
Gln/Gln + Gln/Arg	52	33	46.3%(32.2-60.4)	48.5(19.1-77.9)	
Total	84	39			
XRCC3Thr241Met					
Met/Met	13	3	80.8% (56.1-100)	-	p=0.049
Thr/Thr + Thr/Met	71	36	56.3%(44.1-68.5)	69.5 (36.6-102.4)	
Total	84	39			

Para completar el análisis univariante, se analizó el impacto de los factores pronósticos clásicos en la SLE de este grupo de pacientes (Tablas 48 a 52). En nuestra muestra, solamente la afectación ganglionar axilar y el tamaño tumoral tienen impacto sobre la supervivencia libre de progresión o evento. Ambas variables que fueron incluidas en el análisis multivariante para tratar de determinar si existía algún grado de interrelación entre los factores pronósticos clásicos y XRCC1Arg399Arg y XRCC3Thr241Met.

Tabla 48: Afectación ganglionar axilar y SLE en pacientes con enfermedad temprana tratadas con antracilinas

Afectación axilar	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
Ganglios -	25	5	79.6% (63.5-95.7)	-	p= 0.003
Ganglios +	57	34	49.5% (35.5-63.5)	50.5(22.3-78.7)	

No se dispone de los datos de afectación ganglionar axilar de 2 pacientes

Casi la mitad de las pacientes con afectación de los ganglios axilares presentaron progresión o evento en los 60 meses siguientes al diagnóstico, frente al 20% en las pacientes con ganglios negativos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.003$). (Tabla 48)

La SLE a 60 meses y la mediana de SLE son inversamente proporcionales al tamaño tumoral, tal y como se muestra en la tabla 49 ($p=0.001$).

Tabla 49: Tamaño tumoral en relación con la SLE en pacientes con enfermedad temprana tratadas con antracilinas

Tamaño Tumoral	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
≤2 cms	25	8	75%(57.6-92.4)	-	p=0.001
>2-≤5 cms	51	26	58.5%(43.6-73.4)	69.5 (48.1-90.9)	
>5 cms	8	6	25%(0.5-55)	18.5 (14.5-25.5)	

En cambio, no se observa ninguna diferencia en relación con el grado tumoral, o la expresión de receptores hormonales y HER2 por parte del tumor (Tablas 50, 51 y 52 respectivamente)

Tabla 50: Grado tumoral en relación con la SLE en pacientes no metastásicas tratadas con antraciclinas

Diferenciación tumoral	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
Grado I-II	32	10	68.4%(49-87.8)	-	p=0.118
Grado III	47	26	58.2%(43.5-72.9)	69.5 (36.1-102.9)	

Se desconocen los datos de grado tumoral de 5 pacientes

Tabla 51: RH en relación con SLE en pacientes no metastásicas tratadas con antraciclinas

Diferenciación tumoral	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
RH negativo	31	13	65.3% (47.9-82.7)	70(38.4-102.6)	p=0.64
RH positivo	50	21	62.7%(48-77.4)	84.5(45.9-123.1)	

Se desconocen los datos de RH de 3 pacientes

Tabla 52: Expresión de HER2 en relación con SLE en pacientes no metastásicas tratadas con antraciclinas

Expresión de HER2	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
HER2 negativo	51	20	69.2%(56.1-95.4)	75.5 (47-104)	p=0.107
HER2 positivo	20	10	51.1%(27.6-74.6)	70.5 (17.1-123.9)	

Se desconocen los datos de HER2 en 13 pacientes

Para el análisis multivariante, realizado mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox, se consideraron únicamente las variables que habían alcanzado el valor de significación deseado a priori ($p \leq 0.05$), por lo que se incluyeron XRCC1Arg399Arg, XRCC3Met241Met, el tamaño tumoral y la afectación ganglionar axilar. Solamente XRCC1Arg399Arg y el tamaño tumoral mantienen la significación estadística ($p=0.035$ y 0.002 , respectivamente). El Hazard Ratio para XRCC1Arg399Arg es 0.4 (IC95% 0.2-0.9), y 2.5 para el tamaño tumoral >5 cms (IC95% 1.41-4.43)

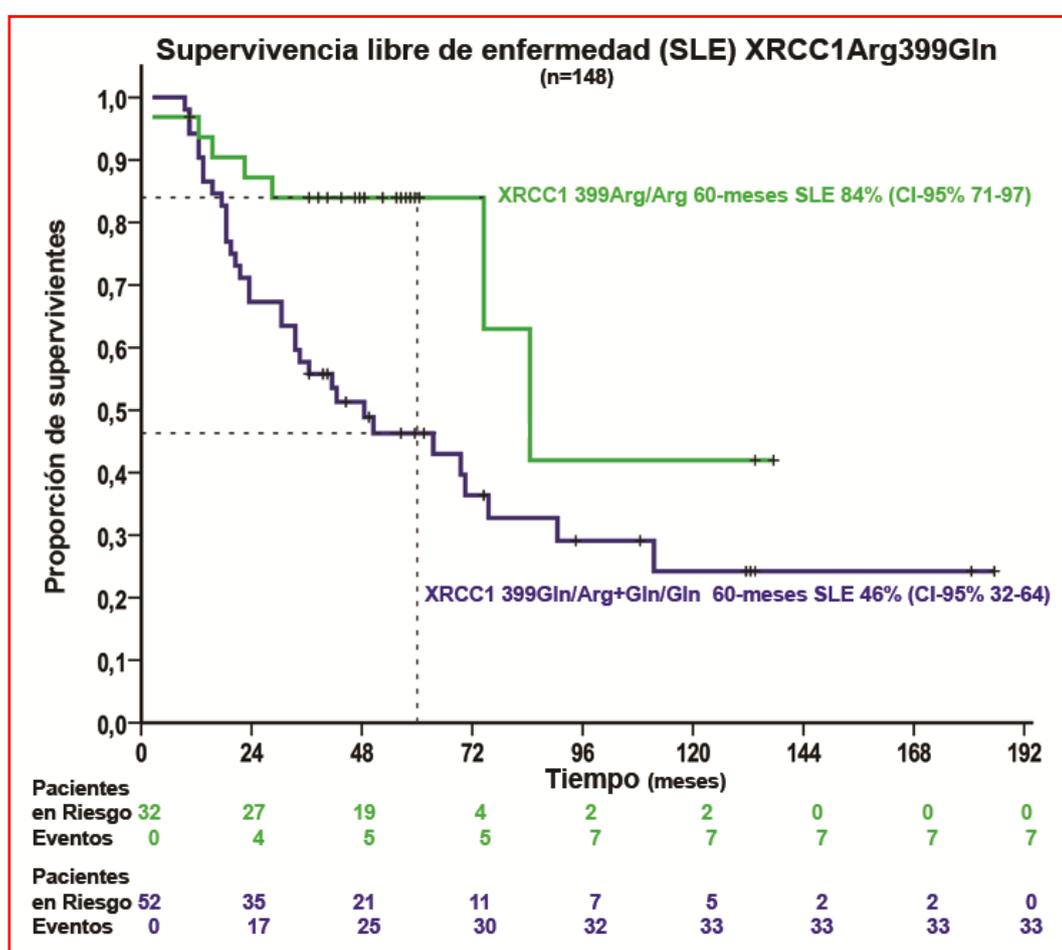


Figura 25: SLE en las pacientes que recibieron antraciclinas en adyuvancia en relación con XRCC1Arg399Gln

3.1.3.2. SG en las pacientes tratadas con antracilinas en adyuvancia o neoadyuvancia

De las 84 pacientes que recibieron tratamiento adyuvante o neoadyuvante con antracilinas, el 73.7% (63.5-83.89) de ellas seguía con vida a los 60 meses. La mediana de SG fue 97.5 meses (IC: 53-141).

La tabla 53 muestra que las pacientes portadoras de XRCC3Met241Met presentan una SG más prolongada que aquellas que presentan las variantes Thr/Thr y Thr/Met (p=0.027)

Tabla 53: SG en relación con las variantes de XPD Lys751Gln, XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met en pacientes con enfermedad temprana tratadas con antracilinas

Genotipo	N	Eventos	SG	Mediana SG (meses)	p-valor
XPD Lys751Gln					
Lys/Lys	34	11	78.1%(65.9-90.3)	129.5(86.8-172.2)	p=0.702
Lys/Gln + Gln/Gln	50	22	66.2%(46.8-85.6)	123.5(27.4-219.6)	
Total	84				
XRCC1Arg399Gln					
Arg/Arg	32	6	84.3%(69.2-99.4)	146.5 (45.5-247.5)	p=0.126
Gln/Gln + Gln/Arg	52	27	68.6%(55.3-81.9)	93.5(56.1-130.9)	
Total	84				
XRCC3Thr241Met					
Met/Met	13	1	100%	-	p=0.027
Thr/Thr + Thr/Met	71	32	69.3%(57.9-81.5)	93.5(54.4-133.6)	
Total	84				

En las tablas 54 a 58 se muestra la relación entre la SG y los factores pronósticos clásicos. Solamente el tamaño tumoral y la expresión de HER2 tienen algún impacto en la SG en las pacientes de nuestra muestra (p=0.005 y 0.006, respectivamente)

Tabla 54: Afectación ganglionar axilar en relación con la SG en las pacientes no metastásicas tratadas con antracilinas

Afectación axilar	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
Ganglios -	25	5	79.4%(63.3-95.5)	-	p=0.161
Ganglios +	57	28	71.4%(58.5-84.3)	93.5(78.3-108.7)	

No se dispone de los datos de afectación ganglionar axilar de 2 pacientes

Tabla 55: Tamaño tumoral en relación con la SG en pacientes no metastásicas tratadas con antracilinas

Tamaño Tumoral	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
≤2 cms	25	7	73.9%(53-94.8)	123.5 (-)	p=0.005
>2-≤5 cms	51	19	78.6%(66.1-91.1)	132.5(63.9-201)	
>5 cms	8	6	45%(8.2-81.8)	57.5(40.3-74.7)	

Tabla 56: Grado tumoral en relación con la SG en pacientes no metastásicas tratadas con antracilinas

Diferenciación tumoral	N	Eventos	SLE a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
Grado I-II	32	7	87%(72.7-100)	123.5(93.1-153.9)	p=0.270
Grado III	47	21	67%(52.7-81.3)	97.5(28-167)	

Se desconocen los datos de grado tumoral de 10 pacientes

Tabla 57: RH en relación con SG en pacientes no metastásicas tratadas con antracilinas

Receptores Hormonales	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
RH negativo	31	12	71.5%(54.6-88.3)	77.5(25.6-129.4)	p=0.252
RH positivo	50	17	81.2(68.3-94.1)	132.5(78-186.9)	

Se desconocen los datos de receptores hormonales de 3 pacientes

Tabla 58: Expresión de HER2 en relación con SG en pacientes no metastásicas tratadas con antracilinas

Expresión de HER2	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SLE (meses)	p-valor
HER2 negativo	51	15	83.2%(71.64-94.76)	132.5(84.9-180)	p=0.006
HER2 positivo	20	10	63%(41.1-84.9)	71.5(47.6-95.3)	

Se desconocen los datos de HER2 en 13 pacientes

En el análisis univariante, solamente XRCC3 Thr241Met, el tamaño tumoral y la expresión de HER2 alcanzaron un nivel de significación de $p < 0.05$. Variables pronósticas como la afectación de los ganglios axilares, el grado tumoral o la expresión de receptores hormonales no alcanzaron la significación estadística, con valores de $p \geq 0.2$.

En el análisis multivariante, tanto XRCC3 Met241Met como el tamaño tumoral se mostraron como factores de riesgo independiente en nuestra serie ($p = 0.05$ en el caso de XRCC3 Met241Met y $p = 0.03$ para el tamaño tumoral).

El Hazard Ratio para XRCC3 Met241Met es 0.15 (IC95% 0.02-0.99), mientras que para el tamaño tumoral $> 5\text{cms}$ es de 1.8 (1.059 a 3.492)

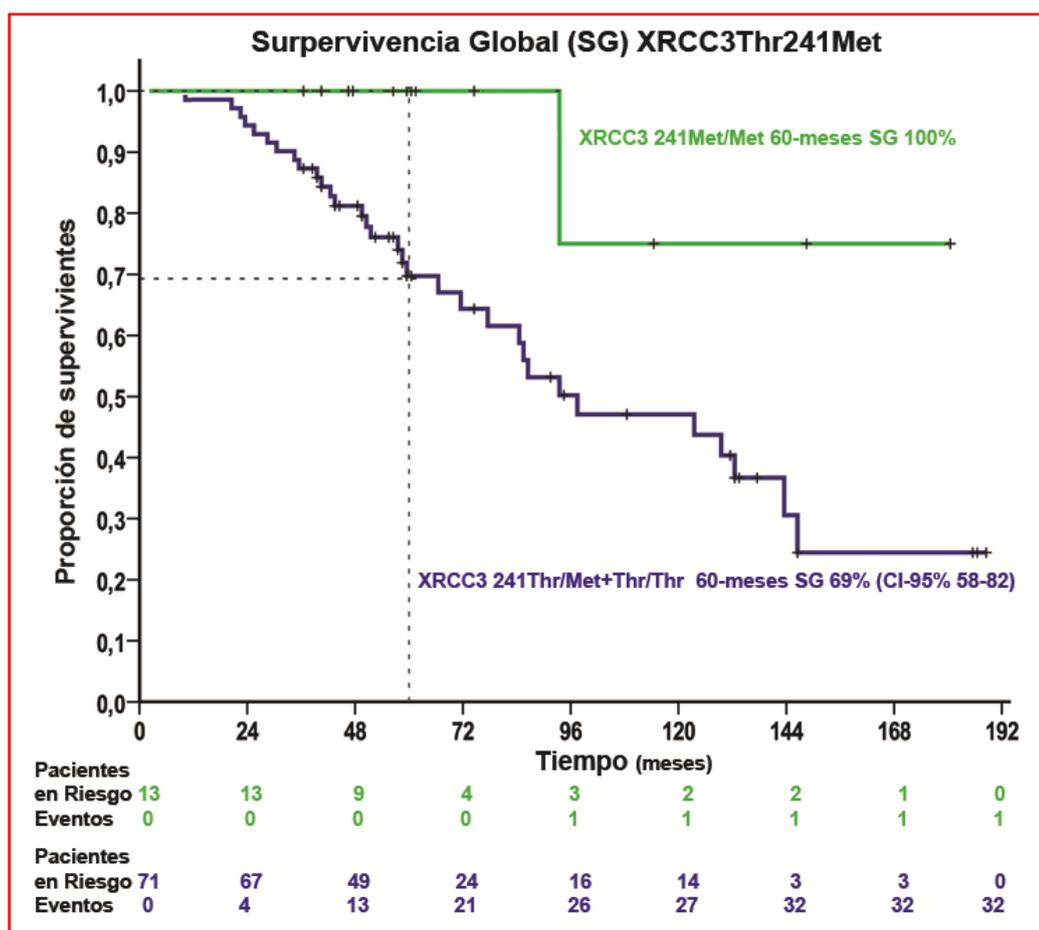


Figura 26: SG de las pacientes tratadas con antraciclinas en adyuvancia según las variantes de XRCC3Thr241Met

3.1.3.3. Pacientes tratadas con antraciclinas en adyuvancia y neoadyuvancia, excluyendo aquellas que recibieron taxanos.

La adición de taxanos, con diferentes pautas y secuencias, a los esquemas con antraciclinas, ha demostrado un beneficio adicional en la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama^{191,192}. Para homogeneizar la muestra y tener una idea más precisa de lo que podrían suponer las diferentes variables polimórficas del estudio en la respuesta a las antraciclinas, se realizó el análisis de supervivencia excluyendo las 19 pacientes que recibieron tratamiento adyuvante o neoadyuvante con derivados del tejo. El tamaño muestral se reduce con esto a 65 pacientes.

3.1.3.3.1. Supervivencia Libre de Enfermedad

El 55.8% (IC 44.2-67.6%) de las pacientes seguía libre de enfermedad a los 60 meses. La mediana de supervivencia fue de 69.5 meses (IC 44.5-94.45).

En la tabla 59 se presentan las diferentes variables de los polimorfismos del estudio en relación con la SLE de este grupo de pacientes. Únicamente XRCC1 mostró alguna asociación, presentando las pacientes Arg/Arg una SLE que prácticamente duplica la de las pacientes con las formas Arg/Gln o Gln/Gln ($p=0.021$).

Tabla 59: SLE en relación con XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met} en pacientes tratadas con antraciclinas y sin taxanos en adyuvancia y neoadyuvancia.

Genotipo	N	Eventos	SLE	Mediana SLE (60 meses)	p-valor
XPD_{Lys751Gln}					
Lys/Lys	25	11	64.2% (47.1-81.3)	111.5 (43.29-179.7)	p=0.322
Lys/Gln + Gln/Gln	40	26	50.5% (35.5-65.5)	63.5 (30.7-96.3)	
Total	65	37			
XRCC1_{Arg399Gln}					
Arg/Arg	21	6	85.2% (69.7-96.5)	84.5 (68.39-100.6)	p=0.021
Gln/Gln + Gln/Arg	44	31	43.9% (29.2-58.6)	42.5 (22.3-62)	
Total	65	37			
XRCC3_{Thr241Met}					
Met/Met	9	3	78.8% (53.4-100)	-	p=0.110
Thr/Thr + Thr/Met	56	34	51.7% (39-64.4)	63.5 (44.5-94.4)	
Total	65	37			

Entre los factores pronósticos clásicos, solamente la afectación ganglionar axilar y el tamaño tumoral mayor de 5 cms ($p < 0.0001$ en ambos casos) tienen impacto sobre la SLE en esta serie (Tablas 60 y 61). Las diferencias que se observan respecto al grado tumoral, y la expresión de receptores hormonales y de HER2 no alcanzan la significación estadística ($p = 0.327$, $p = 0.311$, $p = 0.721$, respectivamente).

Tabla 60: Afectación axilar en relación con SLE en pacientes tratadas en neo/adyuvancia con antracilinas y sin taxanos

Afectación axilar	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
Ganglios –	24	5	78.9%(62.5-95.3)	-	P<0.0001
Ganglios +	39	30	41.8%(26-57.7)	41.5(18.9-64.1)	

No se dispone de los datos de afectación ganglionar axilar de 2 pacientes

Tabla 61: Tamaño tumoral en relación con SLE en pacientes tratadas en neo/adyuvancia con antracilinas y sin taxanos

Tamaño Tumoral	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
≤2 cms	21	8	68%(46.9-89.2)	-	P<0.0001
>2-≤5 cms	39	22	58%(42.3-73.3)	69.5 (47.2-91.8)	
>5 cms	5	5	0%	10.5(0.5-20.95)	

No se dispone de los datos del diámetro tumoral en 5 pacientes

En el análisis multivariante XRCC1Arg399Gln perdió la significación como factor pronóstico independiente ($p = 0.206$) mientras que el tamaño tumoral y la afectación ganglionar la mantuvieron ($p = 0.011$, $p = 0.040$). La Hazard Ratio para el tamaño tumoral >5 cms fue de 2.91 (IC95% 1.26-6.3) y de 2.91 (IC 95%: 1.05-8.05) para la positividad ganglionar, para XRCC1AGln 399Gln fue de 2.24 (IC95%: 0.65-7.91).

3.1.3.3.2. Supervivencia Global

Durante los 60 meses del seguimiento, fallecieron 17 pacientes, con lo que la SG a 60 meses fue de 72.9% (IC 62.1-83.7). La mediana de SG fueron 97.5 meses (IC 54.89-140.1)

En la tabla 62 se recogen los datos de SG en relación con los polimorfismos del estudio. El 100% de las pacientes con XRCC3Met241Met estaban vivas a los 5 años, frente al 68% de las que presentaban cualquiera de las otras dos variantes.

Tabla 62: SG en relación con XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln en las pacientes tratadas en neo/adyuvancia con antraciclinas y sin taxanos.

Genotipo	N	Eventos	SG % (IC 95%)	Mediana SG (meses)	p-valor
XPDlys751Gln					
Lys/Lys	25	11	60.3% (39.6-81)	123.5 (46.6-200.3)	p=0.404
Lys/Gln + Gln/Gln	40	20	79.5 % (64.8-94.2)	129.5 (88.1-170.8)	
Total	65	31			
XRCC1Arg399Gln					
Arg/Arg	21	6	78.5% (58.9-98.1)	146.5 (34.2-258.8)	p=0.457
Gln/Gln + Gln/Arg	44	25	70.2% (56.5-83.9)	93.5 (49.1-137.8)	
Total	65	31			
XRCC3Thr241Met					
Met/Met	9	1	100% (-)	-	p=0.038
Thr/Thr + Thr/Met	56	30	69.3% (54.8-81.4)	93.5 (54.7-132.3)	
Total	65				

En cuanto a los factores pronósticos clásicos, solamente el tamaño tumoral y la sobreexpresión de HER2 demostraron una significación estadística (p=0.003 y 0.03, respectivamente) (tablas 63 y 64). La afectación ganglionar axilar que se había mostrado significativa por la SLE no lo es en cuanto a SG a 60 meses (p=0.222). De nuevo, no se detectó ninguna diferencia en función del grado histológico y de la expresión de receptores hormonales del tumor (p=0.726 y p=0.43). (Tabla 65)

Tabla 63: Tamaño tumoral y SG en pacientes tratadas con antracilinas y sin taxanos en esquemas neo/adjuvantes

Tamaño Tumoral	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
≤2 cms	21	7	69.6%(46.3-92.9)	123.5 (47.7-199.3)	p=0.005
>2-≤5 cms	39	16	80.1%(66.8-86.8)	132.5(63.7-201.3)	
>5 cms	5	5	20%(0.5-55.1)	50.5(18.3-82.7)	

No se dispone de los datos del diámetro tumoral en 6 pacientes

Tabla 64: Expresión de HER2 y SG en pacientes tratadas con antracilinas y sin taxanos en esquemas neo/adjuvantes

Expresión deHER2	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
HER2 negativo	37	13	82% (68.7-95.3)	132 (85-179.8)	p=0.030
HER2 positivo	15	8	66.7% (42.8-90.6)	71.5 (47.5-95.5)	

Se desconocen los datos de HER2 en 13 pacientes

Tabla 65: Afectación axilar y SG en pacientes tratadas con antracilinas y sin taxanos en esquemas neo/adjuvantes

Afectación axilar	N	Eventos	SG a 60 meses	Mediana SG (meses)	p-valor
Ganglios -	24	6	75.8%(59-92.6)	-	p=0.222
Ganglios +	39	24	70.5%(55.8-85.2)	93.5(78.5-108.4)	

No se dispone de los datos de afectación ganglionar axilar de 2 pacientes

El análisis multivariante se realizó nuevamente mediante regresión de Cox. Todas las variables perdieron la significación estadística en este análisis, incluyendo XRCC3M (p=0.052).

3.2. PACIENTES CON ENFERMEDAD METASTÁSICA

En 14 pacientes la enfermedad estaba ya diseminada en el momento del diagnóstico y otras 63 desarrollaron metástasis a lo largo del período de seguimiento. El 37% de estas 77 pacientes seguía con vida a los 60 meses de ser diagnosticadas las metástasis (IC:25.6-48.4), por lo que la supervivencia global desde el diagnóstico de las metástasis (SG_M) fue de 49 meses (IC:38-60).

Se considera que las pacientes con metástasis de localización ósea, ganglionar, o dérmicas, que expresan receptores hormonales, son HER2 negativas y que se presentan con intervalo libre de enfermedad de al menos 2 años tienen mejor pronóstico⁹. En las tablas 66 a 69 se muestra el impacto de estos factores pronósticos en la SG_M de nuestra muestra.

Tabla 66: SGM a los 60 meses en relación con la localización de las metástasis

Localización de metástasis	N	Eventos	SG _M a 60 meses	Mediana SGM (meses)	p-valor
Óseas, dérmicas o ganglionares	44	32	34 % (18.7-49.3)	49 (35.8-62.2)	p=0.816
Otras localizaciones	33	26	41.1% (23.9-58.3)	52 (26.4-77.6)	

No hemos encontrado diferencia en la SG_M de las pacientes que inicialmente presentaron metástasis óseas, dérmicas o ganglionares respecto a aquellas que las presentaron en otras localizaciones como hígado o pulmón (Tabla 66)

Tabla 67: SG_M a 60 meses en relación con el Intervalo Libre de Enfermedad (ILE) en pacientes metastásicas

	N	Eventos	SG _M a 60 meses	Mediana SG _M (meses)	p-valor
ILE ≥24 meses	37	25	45.1%(28.2-62)	52(36-68)	p=0.061
ILE <24 meses	40	34	29.7%(14.8-44.6)	35.5(21.7-49.3)	

Aunque las pacientes que desarrollaron metástasis pasados dos años tienen mayor SG_M, la diferencia no alcanza la significación estadística, probablemente debido a la dispersión de los datos (Tabla 67)

Tabla 68: SG_M a 60 meses en pacientes metastásicas en relación con la expresión tumoral de RH

Receptores Hormonales (RH)	N	Eventos	SG _M a 60 meses	Mediana SG _M (meses)	p-valor
RH negativos	26	15	31%(8-54)	48(20.11-75.6)	p=0.335
RH positivos	47	34	42.3%(26.8-58)	56.5(37.9-75.1)	

Se desconocen los datos de expresión de RH de 4 pacientes

La tabla 68 recoge los datos de SG_M en relación a la expresión de receptores hormonales en el tumor primario. Aunque los tumores con RH positivos tienden a asociarse con una mayor supervivencia, la diferencia no alcanza la significación estadística (p=0.035).

La SG_M a 60 meses en las pacientes con tumores HER2 negativos es mayor (38.4% vs 30.9%). La diferencia roza la significación estadística (p=0.058), que nuevamente se ve afectada por la dispersión de los datos y por el hecho de que se desconocen los datos de expresión de HER2 en el 35.8% de los casos.

Tabla 69: SG a 60 meses en pacientes metastásicas en relación con la expresión de HER2.

Expresión de HER2	N	Eventos	SG _M a 60 meses	Mediana SG _M (meses)	p-valor
HER2 negativo	34	22	38.4%(20.4-56.4)	52(38-66)	p=0.058
HER2 positivo	18	14	30.9% (6.2-55.6)	31(16.4-45.6)	

Se desconocen los datos de expresión de HER2 de 25 pacientes.

En la tabla 70 se muestran los datos de SG_M en función de los polimorfismos XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met}.

Tabla 70: SG_M a 60 meses en pacientes metastásicas en relación con los polimorfismos XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} y XRCC3_{Thr241Met}.

Genotipo	N	Eventos	SG _M a 60 meses	Mediana SG _M (60 meses)	p-valor
XPD_{Lys751Gln}					
Lys/Lys	27	21	15%(0-30.1)	47(31.9-62.1)	p=0.051
Lys/Gln + Gln/Gln	50	38	48.3%(34.2-62.4)	56.5(38.5-74.5)	
Total	77				
XRCC1_{Arg399Gln}					
Arg/Arg	23	17	43.6%(22-65.2)	55(38.8-71.2)	p=0.763
Gln/Gln + Gln/Arg	54	42	34.4(21.1-47.7)	43.5(25.9-61.1)	
Total	77				
XRCC3_{Thr241Met}					
Met/Met	10	7	56.3%(27.3-85.3)	48(32.8-63.2)	p=0.073
Thr/Thr + Thr/Met	67	52	33%(20.8-45.2)	78.5(84-148.6)	
Total	77				

DISCUSIÓN

XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln, XPDlys751Gln son Thrs de los polimorfismos presentes en genes reparadores del ADN más ampliamente estudiados, debido a su frecuencia en la población general y a que inducen un cambio en la funcionalidad de la proteína. Si bien se han analizado en relación al riesgo de desarrollar numerosos tumores sólidos, hematológicos e incluso patologías no tumorales, su posible implicación en la respuesta individual al tratamiento es prácticamente desconocida.

En este trabajo, hemos pretendido analizar el papel de XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln, XPDlys751Gln en el cáncer de mama, no solo en cuanto a su aportación al riesgo de desarrollar este tipo de tumores, sino también en cuanto a la posibilidad de que estos polimorfismos afecten a la edad de presentación de tumor, o a la respuesta al tratamiento habitual. Para ello lo hemos dividido en dos partes: la primera de ellas es un estudio de asociación en casos y controles, mientras que la segunda es un análisis radio y farmacogenómico en la cohorte de pacientes con cáncer de mama.

1. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN EN CASOS Y CONTROLES

Tal y como se ha señalado, en esta primera parte pretendemos analizar si existe alguna relación entre los polimorfismos de nuestro estudio y el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Existen varios mecanismos para “ratrear” los genes que subyacen a patologías frecuentes, y pueden recogerse en dos grandes grupos: los estudios de gen candidato y los que exploran todo el genoma, conocidos como estudios de genotipado masivo o GWAs (*Genome Wide Association studies*). Los estudios de asociación en casos y controles como el nuestro se incluyen dentro de la primera categoría, mientras que los mapas de ligamiento y los cada vez más utilizados GWAs se incluyen en la segunda¹⁹³.

Los estudios de asociación en casos y controles comparan la frecuencia de los alelos o genotipos de un polimorfismo en ambos grupos. Tienen la ventaja de que son baratos y tienen poder estadístico suficiente para detectar a variantes de baja penetrancia, por lo que han sido y aún son la estrategia más empleada para caracterizar la aportación de uno o varios genes a una enfermedad. Estos estudios son adecuados cuando se tiene una hipótesis biológica o cuando se ha identificado un gen candidato mediante estudios de ligamiento. Se consideran un método de estudio eficaz para establecer las variantes genéticas que subyacen a las patologías complejas o poligénicas. Por otro lado, los avances tecnológicos han permitido que estos estudios cedan terreno en favor de los GWAs, en los que se rastrea todo el genoma buscando SNPs que puedan estar asociados a una patología dada, pero sin necesidad de una hipótesis biológica previa.¹⁹³

La crítica que se hace a los estudios de asociación en casos y controles es que con frecuencia sus resultados no pueden ser replicados y las asociaciones que se observan son por lo tanto espúreas. Se ha señalado el pequeño tamaño muestral como la principal causa de esta discrepancias, dado que la mayoría de los estudios incluyen entre 100 y 500 sujetos, y por lo tanto, carecen de poder estadístico suficiente. Esto ha tratado de solventarse con la realización de meta-análisis que incluyen todos los estudios publicados para un determinado SNP, aumentando así el tamaño muestral y la consistencia de los resultados. Pero además, estos análisis sistemáticos han puesto de manifiesto, que los diferentes resultados vertidos por unos y otros estudios obedecen

en muchos casos a que se han realizado en individuos de etnias diferentes, sugiriendo que los polimorfismos que modifican el riesgo de un tipo de cáncer en un grupo étnico podrían carecer de significado en otro. También se ha observado que en muchos de estos estudios, los grupos caso y control no son comparables para factores que pueden ser muy relevantes en el desarrollo de una patología concreta, como la edad, sexo, raza, etcétera, de modo que las diferencias observadas entre uno y otro grupo no guardan relación con la enfermedad sino con estas otras variables, lo que hace que los estudios sean difícilmente reproducibles. Otra fuente de error, además de la realización de múltiples sub-análisis o de análisis de subgrupos, que pueden conducir a resultados falsamente positivos, es el sesgo de publicación, ya que los estudios con resultados negativos muchas veces no se publican^{193 194,195}.

Una vez expuestas las limitaciones de los estudios de asociación en general, señalaremos que nuestra muestra es homogénea en cuanto al grupo étnico y al sexo, ya que todos los individuos del estudio son mujeres caucásicas. La muestra para este análisis consta de 174 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama y como grupo control, 300 mujeres que no habían presentado ninguna forma de cáncer en el momento en que fueron incluidas en el estudio. Además, las 174 pacientes fueron pareadas por edad (± 3 años) con 174 controles, mientras que las 126 restantes, con edades comprendidas entre los 20 y los 98 años, están únicamente pareadas en función del sexo y la etnia. Sin embargo, es probable que el tamaño de nuestra muestra (174 casos y 300 controles) sea insuficiente para detectar algunas diferencias en las frecuencias de los alelos en ambos grupos.

Otra carencia de nuestro estudio es que a la hora de seleccionar los controles, no se tuvieron en cuenta variables que pueden interferir en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, como la duración del periodo fértil, paridad, etc. Destacaremos sin embargo, que de todas las publicaciones revisadas en las que se analizan variantes polimórficas de los genes XRCC3, XPD y XRCC1 en relación con el cáncer de mama, solamente Shore et al¹⁹⁶ estratificaron ambos grupos por edad, estado menstrual, menarquía, paridad, toma de anticonceptivos, terapia hormonal sustitutiva, ingesta de alcohol, BMI e historia familiar de cáncer de mama, factores de riesgo para el cáncer de mama. En el resto, casos y controles estaba únicamente pareados en función del sexo y la edad y/o estatus hormonal¹⁹⁷⁻²⁰⁰.

1.1. XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln, XPDlys751Gln como modificadores del riesgo de cáncer de mama

Los tres SNPs de nuestro estudio producen un cambio de aminoácido que conlleva una alteración en la función de la proteína, de modo que los individuos portadores de las variantes polimórficas presentan una capacidad de reparación del ADN disminuida.^{134,136,151,152,164,166,201-206} XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln, XPDlys751Gln han sido analizados en relación con muchos tumores sólidos y hematológicos, incluido el cáncer de mama, con resultados muchas veces contradictorios, debido, probablemente, a las limitaciones de los estudios de asociación anteriormente expuestas^{155,198,207-220}. Pero también es posible que estos estudios no sean comparables debido a que los mecanismos de reparación presenten algún tipo de especificidad tisular, no elucidado hasta la fecha, con lo que los polimorfismos tendrían distinto significado en los distintos tumores, lo que explicaría la disparidad de los resultados.

XRCC1 es una proteína fundamental para la reparación mediante escisión de bases (BER). La interacción de XRCC1 y su sustrato facilita la unión del resto de factores de los complejos reparadores y regula la actividad de varias enzimas, como la poli-ADPribosa polimerasa1 (PARP1) y la ligasa III. Por otro lado, el factor de transcripción E2F1 regula a XRCC1 y promueve la reparación del ADN¹³¹. El polimorfismo Arg399Gln se localiza junto a la región BRCT1, lugar de unión de PARP1, y la sustitución de Arginina por Glutamina condiciona un cambio en la conformación tridimensional de la proteína¹³⁴ lo que produce una disminución de su capacidad reparadora^{151,166,201-203}, aunque no está claro si esta pérdida de función se debe a la incapacidad para unirse a PARP1 o a otro mecanismo

Se ha realizado numerosos estudios de casos y controles para tratar de establecer una posible asociación entre XRCC1Arg399Gln y el cáncer de mama, pero los resultados han sido muy dispares, lo que no permitía extraer una conclusión definitiva. Recientemente se han publicado tres meta-análisis, en los que Gln/Gln se asocia mayor riesgo de cáncer de mama, mientras que Arg/Arg es más frecuente en el grupo control^{137,141,221}. Estos tres estudios también coinciden en al demostrar que esta asociación es más fuerte en población asiática (OR=1.49¹³⁷, 1.59¹⁴¹, y 1.26²²¹ que en la población caucásica (OR=1.08)²²¹. Nuestros resultados son consistentes con estos tres meta-análisis ya que encontramos que Arg/Arg es más frecuente en el grupo control mientras que

Arg/Gln y Gln/Gln lo son en entre las pacientes con cáncer de mama ($p=0.002$, $OR=1.96$, $IC95\%$ 1.3-3). En nuestra serie, el alelo mutado se asocia a un aumento del riesgo de cáncer de mama.

XRCC3 Thr241Met supone el cambio de Treonina, un aminoácido hidrófilo con un grupo hidroxilo por uno hidrofóbico con un grupo metil-sulfuro, Metionina,²²² lo que se traduce en una disminución de la función de la proteína y una merma en la capacidad celular de reparar los daños del ADN^{136,151,152,166,201,202,204,206}.

En nuestra serie, no hemos encontrado ninguna diferencia en la frecuencia de los dos alelos de XRCC3 Thr241Met entre el grupo de casos y controles ($p=0.670$).

Se han publicado múltiples estudios tratando de establecer una posible asociación entre XRCC3 Thr241Met y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, nuevamente con resultados contrapuestos, por lo que una vez más, se recurrió al meta-análisis. En el que realizaron Han et al¹⁵³ se incluyeron 48 estudios de casos y controles en los que se analizaba XRCC3Thr241Met en relación con el riesgo de desarrollar diferentes neoplasias. Se incluyeron 24975 individuos con cáncer, no sólo en la mama sino en cualquier localización y 34209 controles, encontrando que aquellos que homocigotos para el alelo Met, tenían más riesgo de desarrollar cualquier tipo de tumor ($p= 0.008$, $OR=1.07$ $IC95\%$ 1.02-1.13) y particularmente, cáncer de mama ($p=0.0004$, $OR=1.14$, $IC95\%$ 1.06-1.23). Lee et al¹⁹⁷ analizaron los datos de 12 estudios que comprendían en total 574 casos de cáncer de mama y 502 controles, encontrando que el alelo Met se asociaba a un incremento del riesgo, de modo que tanto Met/Met como Met/Thr se asociaban con mayor frecuencia a cáncer de mama ($OR=1.08$, $IC95\%$ 1-1.17). Economopoulos et al²²³ realizaron un metaanálisis con 23 estudios donde se incluyeron 20791 pacientes con cáncer de mama y 22237 controles, encontrando que las mujeres Met/Met presentaban mayor riesgo de cáncer de mama ($OR=1.073$, $IC95\%$ 1.010-1.140), aunque esta diferencia se observaba únicamente en las mujeres de origen no asiático.

XPD interviene en la reparación por escisión de nucleótidos y forma parte del complejo de transcripción BTF2-TFIIH. El cambio de Lisina por Glutamina en la posición 751, se traduce en un cambio conformacional de la proteína¹⁶⁴ y una disminución de su capacidad reparadora^{136,151,201,203}.

En nuestro estudio, no hemos encontrado ninguna relación entre la frecuencia de los alelos de XPD_{Lys751Gln} y cáncer de mama ($p=0.944$). De nuevo, los resultados de los estudios que analizan una posible relación entre XPD_{Lys751Gln} y cáncer de mama, son discordantes²²⁴⁻²²⁹. En un reciente metaanálisis para tratar de elucidar el papel de esta variante, Jiang et al²³⁰ incluyeron 21 estudios con un total de 11362 casos y 10622 controles. Encontraron que el alelo Gln se asociaba a un incremento del riesgo de cáncer de mama de 1.05 (IC95% 1-1.11) en mujeres caucásicas, pero no en asiáticas o afroamericanas ($p=0.28$).

Por lo tanto, los meta-análisis publicados hasta la fecha han encontrado que XRCC1 399Gln/Gln, XRCC3 241Met/Met y XPD751Gln/Gln se asocian a aumento del riesgo de cáncer de mama en mujeres caucásicas, si bien la magnitud de este impacto es pequeña (OR=1.08, 1.07 y 1.07, respectivamente), y nuestro estudio no es capaz de detectarlo, excepto en el caso de XRCC1. Se trataría por lo tanto, de variantes de muy baja penetrancia que para incrementar el riesgo de cáncer de mama, precisan de la conjunción de otros factores con los que interactúan o a los que, posiblemente, modulen.

1.2. XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln, XPD_{Lys751Gln} en relación con la edad

La acumulación progresiva de errores en el ADN y en los cromosomas conduce generalmente a la senescencia y muerte de la célula, pero también puede inducir la transformación tumoral y la inmortalidad celular^{206,231}. En las células y en los organismos se observa una acumulación de lesiones en el ADN asociadas la pérdida gradual de funcionalidad y al envejecimiento²³². Si bien las bases moleculares de este fenómeno no están del todo claras, estas lesiones podrían interferir con la transcripción y detener la replicación, lo cual desencadenaría la muerte o la senescencia celular, conduciendo al envejecimiento^{233,234}. Al mismo tiempo, esta misma acumulación de errores en el ADN es también el origen y la característica principal de los tumores. El cancer y el envejecimiento son por lo tanto, las dos caras del daño al ADN²³⁵.

El aumento en la incidencia de cáncer que se produce a medida que envejecemos se relacionaría con el acúmulo de lesiones y la disminución o pérdida de la capacidad reparadora intrínsecos al proceso de envejecimiento^{206,236}. Pero dado que no todos los individuos al envejecer

desarrollan un cáncer, cabría pensar que aquellos individuos con mejor capacidad de reparar el ADN podrían ser más longevos y, en caso de desarrollar un tumor, hacerlo a edades más tardías.

1.1.1. Grupo Control

Si, como hipotetizamos, los individuos con mejor capacidad de reparación alcanzan edades más avanzadas sin desarrollar tumores, cabría esperar que dentro del grupo control los alelos asociados a mejor capacidad de reparación fuesen más frecuentes en las ancianas que en las mujeres jóvenes. Aquellas mujeres con los alelos menos funcionales tendrían más posibilidades de desarrollar alguna forma de cáncer a lo largo de su vida y por lo tanto, abandonarían el grupo control. De este modo, el subgrupo de mujeres que alcanza las últimas décadas de la vida sin cáncer, estaría enriquecido con las variantes con mejor capacidad de reparación.

Con este propósito, junto a las 174 mujeres sanas pareadas por edad con los casos se incluyeron otras 126, de entre 20 y 98 años, de modo que de las 300 mujeres del grupo control, 25 eran menores de 35 años (8.3%) y 55 eran mayores de 80 años (18.3%).

En nuestro estudio, encontramos que en el grupo control los alelos silvestre y mutado de los tres polimorfismos presentan frecuencias similares en todos los grupos de edad, sin que se observe ninguna diferencia entre jóvenes y ancianas, lo cual, anula nuestra hipótesis. El mismo resultado obtuvo Kazimirova²⁰⁴, que analizó varios polimorfismos en genes reparadores de ADN en dos poblaciones sanas, una entre los 20-25 años y la otra entre 60-70 encontrando que no había diferencia en la distribución de los polimorfismos, si bien, el grupo de mayor edad, presentaba mayor acumulo de aberraciones cromosómicas que los jóvenes. Esta acumulación de alteraciones genéticas en los individuos ancianos, incluso en aquellos que portan los alelos con mejor capacidad de reparación podría deberse, a que con la edad, se produjese un silenciamiento epigenético de los genes reparadores^{236,237}. De ser así, el aumento de la incidencia de cáncer con la edad guardaría más relación con el propio fenómeno de envejecimiento que con la capacidad de reparación del ADN que heredamos con el genotipo.

El hecho de que no haya diferencias en la frecuencia de los alelos entre las mujeres jóvenes y ancianas, indica que la mayoría de las portadoras de los alelos con peor capacidad de

reparación probablemente no desarrollaran ningún cáncer a lo largo de su vida, debido a la baja penetrancia de estos polimorfismos, tal y como se vio anteriormente.

1.1.2. Casos

En nuestro estudio encontramos que las pacientes portadoras de la variante XPD 751Lys/Lys habían sido diagnosticadas a edad más tardía que aquellas que portaban los alelos Lys/Gln o Gln/Gln (65.5 vs 58.5 y 58, respectivamente), $p=0.001$, $OR=3.52$ (IC95% 3-5.44), diferencia que se mantiene cuando se analizan en función del estatus hormonal al diagnóstico, donde Lys/Lys es más frecuente entre las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama tras la menopausia y Lys/Gln + Gln/Gln entre las premenopáusicas.

Tal y como se ha expuesto previamente, XPD751Gln se asocia a una menor capacidad de reparación del ADN si bien, en nuestro estudio no hemos encontrado que se asocie con un mayor riesgo de cáncer de mama y el meta-análisis de Jiang et al²³⁰ mostró que esta variante se asociaba a un riesgo de cáncer de mama de 1.05. Pero si bien XPD751Gln no incrementa *per se* el riesgo de forma significativa, es posible que actúe modulando a otros factores lesivos al permitir que las células acumulen lesiones en su material genético que conduzcan al desarrollo de un tumor de una forma más temprana.

Esta hipótesis podría explicar también lo que observamos para XRCC1Arg399Gln y XRCC3Thr241Met. La mediana de edad de las pacientes portadoras de los alelos con mejor capacidad de reparación (XRCC1399 Arg y XRCC3 Thr) es superior, si bien, no se alcanza la significación estadística (XRCC1 399: Arg/Arg 62.5 años vs Gln/Gln59.5, $p=0.645$; XRCC3 241: Thr/Thr 62.5 vs Met/Met 58.5 $p=0.389$).

Nuestros resultados para XPD751Gln contradicen los de otros autores que han analizado polimorfismos en los genes de reparación en relación con estatus hormonal y/o la edad de diagnóstico del cáncer de mama, siendo todos ellos negativos^{196-199,221}. Solamente Han et al²⁰⁰ observaron, al igual que nosotros, que las mujeres que portadoras de una o más variantes de riesgo en los genes que intervienen en la reparación del ADN, tienen más riesgo de desarrollar cáncer de mama precoz, antes de la menopausia. Silva et al²³⁸ encontraron una asociación entre

cáncer de mama y XRCC1399Gln, pero solo entre aquellas mujeres que habían alcanzado la menopausia después de los 55 años.

El estudio de Silva et al es el único que estratifica a las mujeres en función de la edad en la que alcanzaron la menopausia, mientras que todos los demás dicotomizan la muestra atendiendo al estatus hormonal en el momento del diagnóstico, sin tener en cuenta a qué edad alcanzaron la menopausia. La acción carcinogénica de los estrógenos no solo se debe a inducción de la proliferación celular, sino también mediante daño directo al ADN y el tiempo de exposición a los mismos, se ha relacionado con la incidencia de cáncer de mama. Cuando los diferentes autores analizan la incidencia de cáncer de mama en pre o postmenopáusicas en relación con variantes de reparación del ADN generalmente tratan de establecer si esos polimorfismos reparan mejor o peor las lesiones secundarias a estrógenos. En tal caso, se debería hacer una recogida exhaustiva de todos aquellos factores que determinan la exposición a estas hormonas, tales como edad de la menarquía, menopausia, factores reproductivos, etc. La falta de estos datos, hace que las conclusiones de estos estudios deban tomarse con cautela. Sin el análisis de estas variables es posible que, cuando hablamos de cáncer en mujeres pre o postmenopáusicas, no estemos refiriéndonos a una medida del daño mediado por estas hormonas, sino estableciendo únicamente un punto de corte arbitrario, entorno a los 45-55 años para el análisis de todos aquellos factores que concurren con la exposición estrogénica, como los contaminantes ambientales, o el propio envejecimiento^{204,206,237,239,240}.

2. ANALISIS RADIO Y FARMACOGENÓMICO DE LAS VARIANTES XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln, XPDlys751Gln EN CÁNCER DE MAMA

La segunda parte de este trabajo, es un estudio retrospectivo de la cohorte de enfermas con cáncer de mama en el que se analiza la asociación entre estos polimorfismos y la respuesta a los tratamientos radio y quimioterápicos, especialmente en relación con el tratamiento adyuvante basado en antraciclinas.

El tamaño muestral (150 pacientes, de las que 84 recibieron tratamiento con antraciclinas) puede ser insuficiente para extraer conclusiones definitivas, pero puede entenderse como un estudio exploratorio que sin duda debería seguirse de uno de mayor tamaño y, si fuera posible, prospectivo. Por otro lado, la mayoría de estudios publicados hasta la fecha que analizan estos polimorfismos en relación con la respuesta al tratamiento de diferentes tumores sólidos incluyen entre 55 y 175 pacientes.

Para nuestro estudio, se incluyeron pacientes que estaban siendo atendidas en nuestras consultas externas entre diciembre de 2003 y febrero de 2004 y que habían sido diagnosticadas con cáncer de mama entre enero de 1990 y febrero de 2004. Somos conscientes de que en el caso de las pacientes más antiguas existe un sesgo de selección, si bien la mayoría de las pacientes fueron diagnosticadas entre 2003 y 2004.

La mayoría de las pacientes de nuestra serie (70%) presentaron un CDI, grado II-III, y fenotipo luminal. Debido al tamaño tumoral y a la afectación ganglionar, el 64% fueron diagnosticadas con un estadio II. La SG de las pacientes no metastásicas fue del 84.2%, con una mediana de 140.5 meses (IC95% 108-172). La expresión de HER2 no se determinó en el 27% de la muestra, debido sobre todo a los casos más antiguos, ya que a partir del año 2000 comenzó a estudiarse como factor pronóstico, pero no ha sido hasta la introducción del trastuzumab en la práctica clínica cuando su determinación se ha comenzado a hacerse en todos los casos de forma sistemática.

Hay que señalar también el alto porcentaje de pacientes mastectomizadas (63%), de nuevo debido a la antigüedad de los casos, ya que no es hasta los estudios de Fisher y Veronesi en 2002^{241,242} que la cirugía conservadora seguida de radioterapia fue considerada práctica habitual por algunos profesionales.

54 pacientes de las 152 que recibieron tratamiento quimioterápico no recibieron antraciclinas, sino CMF (7 pacientes metastásicas y 47 en adyuvancia). La mayoría, habían sido diagnosticadas a principios de los años 90, antes de los trabajos que demostraron el beneficio de las antraciclinas en adyuvancia^{174,175} pero en aquellas con un diagnóstico posterior se debe a que eran pacientes de bajo riesgo, presentaban comorbilidad cardíaca o edad avanzada.

2.1. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln y radioterapia

Ya sea sola o en combinación con cirugía y quimioterapia, la radioterapia constituye uno de los pilares del tratamiento oncológico. En el caso del cáncer de mama, es ampliamente utilizada tras la cirugía conservadora, dado que reduce el riesgo de recurrencia local y la combinación de ambas se ha mostrado tan efectiva como la mastectomía, en términos de supervivencia²⁴¹. Su objetivo es el control local del tumor con el menor daño posible sobre el tejido sano circundante y en este sentido, se han producido grandes avances en el campo de la RT que han permitido que la gran mayoría de los pacientes la reciban sin demasiados efectos secundarios, a pesar de lo cual, todavía un 10% presentan secuelas graves, debidas probablemente a la susceptibilidad individual.

La variabilidad interindividual en el desarrollo de efectos adversos postRT es bien conocida. Existe evidencia de que junto a los factores relacionados con el paciente como la edad, el índice de masa corporal, el hábito tabáquico u otros estilos de vida, estas diferencias que se observan de paciente a paciente tienen también una base genética^{148,178,179,243-246}. Las primeras observaciones se realizaron en individuos con mutaciones germinales heredadas en genes de reparación del ADN (Tabla 6). Estos pacientes, diagnosticados con Síndrome de Bloom, Síndrome de Nijmegen, Ataxia Teleangiectasia o Anemia de Fanconi, presentan una alta predisposición al cáncer, y con frecuencia desarrollan efectos secundarios severos tras RT²⁴⁷. Pero aunque estos casos nos dan una noción de la base molecular subyacente a la radiosensibilidad, la escasa

frecuencia de estas mutaciones (<0.1%) no permite explicar lo que se observa en la clínica. Se pensó entonces que la sensibilidad a las radiaciones ionizantes podría estar en relación con la interacción de numerosos polimorfismos de baja penetrancia en genes participantes en diferentes vías celulares como la apoptosis, inflamación, o la reparación del ADN. La identificación de estos polimorfismos es importante porque podrían utilizarse como biomarcadores para predecir la respuesta del tejido normal al tratamiento radioterápico^{248,249}.

La radiación ionizante ejerce su efecto citotóxico mediante el daño que induce en ADN, principalmente roturas de cadena doble y sencilla, pero también mediante las alteraciones que los radicales de oxígeno producen en las bases nitrogenadas. Por esta razón se cree que las vías de reparación del ADN deben ser uno de los mecanismos más importantes para defender a la célula de la radiación ionizante y los polimorfismos que alteran la capacidad funcional de estos genes pueden ser uno de los grandes determinantes de las diferencias interindividuales que se observan tanto en la respuesta al tratamiento como en el desarrollo de toxicidades. Puesto que las lesiones que este tipo de radiación produce en el ADN son muy diversas, todos los mecanismos de reparación (BER, NER, MMR y DSBR) han sido ampliamente estudiados en relación con esta modalidad de tratamiento.

Los efectos secundarios de RT se clasifican generalmente en agudos y tardíos. Los primeros son aquellos que se presentan durante o en los primeros 90 días desde el fin del tratamiento, mientras que los efectos tardíos son los que se presentan tras meses o incluso años después de finalizado el tratamiento. Los efectos secundarios agudos afectan generalmente a tejidos con un gran recambio celular, como es el caso de la piel o las mucosas, mientras que los efectos secundarios aparecen en tejidos con un turnover más lento. Los efectos agudos pueden ser limitantes de dosis y pueden obligar a suspender un tratamiento administrado con intención curativa. Las reacciones cutáneas agudas pueden variar desde eritema y descamación a necrosis y lesiones ulcerosas. Las lesiones cutáneas tardías que incluyen fibrosis, atrofia, alteraciones de la pigmentación y teleangiectasias, se consideran progresivas e irreversibles. Hay estudios que concluyen que las pacientes que presentan toxicidad aguda severa presentan mayor riesgo de toxicidad tardía²⁵⁰.

Nosotros no hemos encontrado relación entre el desarrollo de toxicidad aguda o crónica tras el tratamiento con radioterapia y XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln o XPDlys751Gln.

Los estudios publicados hasta la fecha, presentan resultados muy dispares que no permiten extraer conclusiones claras sobre el impacto de estos SNPs en la toxicidad cutánea postradioterapia. En el caso de XPD Lys751Gln, no se ha encontrado ninguna asociación^{247,251,252} mientras que para XRCC3Thr241Met, los resultados son más diversos ya que si bien ambos alelos han sido asociados a un mayor riesgo de fibrosis en algunos estudios^{148,245,246,248}, otros no han encontrado ningún tipo de asociación^{247,252,253}.

Tal y como se comento en la introducción, varios estudios funcionales han demostrado que las líneas celulares portadoras del alelo XRCC1 399Gln son más sensibles a la radiación ionizante^{135-138,140,254,255} que las portadoras del alelo Arg, por lo que este polimorfismo ha sido ampliamente estudiado en relación con la toxicidad secundaria a RT. Aunque la mayoría de los trabajos han sido negativos,^{247,252,256-258} existen otros con resultados totalmente contradictorios. Así, Andreassen et al²⁴⁸ encontraron asociación entre el alelo Arg y toxicidad cutánea tardía, mientras que Giotopoulos²⁵⁹ realizó la misma observación pero para el alelo Gln, en vez de Arg. Mullan et al mostraron que el alelo Gln se asociaba a mayor riesgo de toxicidad cutánea aguda, pero únicamente en combinación con otros SNPs²⁶⁰. Por el contrario, este mismo alelo se asoció con menor riesgo de toxicidad aguda en pacientes con índice de masa corporal (IMC) normal, pero no en aquellos con elevado IMC²⁵¹

Los resultados de todos estos estudios, por lo tanto, no son los suficientemente consistentes como para concluir el posible papel de estos polimorfismos en la toxicidad por radioterapia. Una vez más, el principal motivo que se alega para estas discrepancias es el tamaño muestral. La mayoría de los estudios comprenden menos de 500 pacientes lo que hace que carezcan de poder estadístico para detectar el modesto impacto que estas variantes puedan tener en la sensibilidad individual a la radioterapia²⁶¹. Actualmente está en marcha el proyecto Gen-PARE (*Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects*) que pretende caracterizar la aportación de polimorfismos en diferentes genes a la radiosensibilidad y por tanto optimizar e individualizar el tratamiento RT de cada paciente²⁶².

La negatividad de nuestros resultados puede deberse a que, efectivamente, no exista asociación entre estos SNPs y la toxicidad secundaria a RT, pero también puede deberse a que el tamaño muestral es pequeño. A pesar de que 112 paciente recibieron RT, para el análisis de la toxicidad aguda solo disponemos de los datos de 86, y de 91 en el caso de la toxicidad crónica. Aquellos casos en los que la toxicidad aguda o crónica no estaba recogida en la historia clínica no fueron considerados para el análisis. Se pone así de manifiesto otro problema: la subjetividad del observador y los múltiples observadores. Dado que las pacientes fueron atendidas por diferentes médicos, es posible que existieran diferencias en la recogida de datos, no solo en cuanto a la gradación de la toxicidad, sino en cuanto a dejar constancia de la misma en la historia clínica.

Otro aspecto que se analizó es si estos polimorfismos guardan alguna relación con el riesgo de recaída local tras radioterapia. Si las células tumorales mantienen el genotipo germinal para estos polimorfismos, es posible que aquellas mujeres portadoras de las variantes polimórficas desarrollasen tumores con una capacidad de reparación disminuida que no les permitiría reparar las lesiones al ADN inducidas por la RT y por tanto el riesgo de recaída local sería menor. Afortunadamente en nuestra serie sólo 12 de las 112 pacientes que recibieron RT recayeron localmente (10.7%). No hemos encontrado asociación entre ninguno de los SNPs y la recaída local, pero es posible que debido al escaso número de eventos, aun existiendo una relación, nuestro estudio no sea capaz de detectarla. Por otro lado, no hemos encontrado en la literatura que ningún autor haya comunicado alguna asociación entre estos u otros SNPs en genes reparadores y recaída local.

2.2. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln XPDlys751Gln en relación con el tratamiento con antraciclinas en pacientes con cáncer de mama temprano

Las antraciclinas se aislaron de *Streptomices peucetius* en la década de 1960 y se han utilizado con éxito durante más de 40 años en el tratamiento de tumores sólidos, leucemias y linfomas. Su mecanismo de acción no está completamente elucidado y aunque parece que su acción citotóxica se debe, principalmente, a la inhibición de la Topoisomerasa II²⁶³ también se implican fenómenos como la formación de radicales libres y la peroxidación de los lípidos²⁶⁴⁻²⁶⁹, la unión al ADN, la formación de *cross-links* y aductos^{265,270-272} o la intercalación en el ADN impidiendo la replicación y transcripción del ADN^{273,274}. La mayoría de estos procesos producen

roturas de doble cadena en el ADN que inducirían finalmente la muerte celular por apoptosis^{270,275,276}.

Las topoisomerasas son enzimas capaces de modificar la topología de los ácidos nucleicos sin alterar su secuencia y estructura. Intervienen en múltiples procesos que tienen lugar en el núcleo como la replicación, transcripción, condensación/descondensación de los cromosomas remodelado de la cromatina, recombinación y reparación del ADN. Para que las proteínas que intervienen en estas funciones puedan acceder a la doble hélice es preciso que ésta esté desenrollada. Las topoisomerasas guían y catalizan este proceso de apertura, para lo que inducen una rotura transitoria del ADN que se repara una vez se ha desenrollado la doble hélice. Las antraciclinas estabilizan el paso intermedio en el que la cadena de ADN está cortada y covalentemente unida a la topoisomerasa II mediante residuos de tirosina, convirtiendo en permanentes las roturas transitorias del ADN^{277,278}.

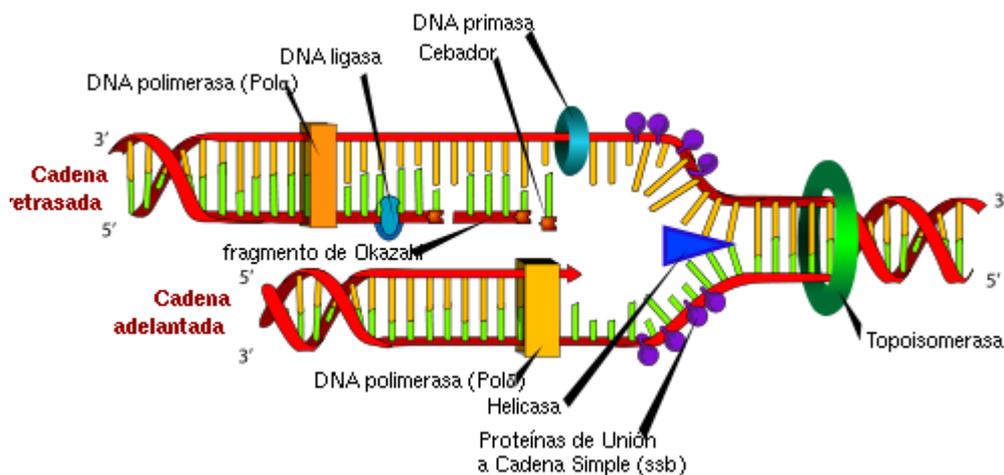


Figura 27: Mecanismo de acción de las topoisomerasas

A pesar del mejor conocimiento de los mecanismos de acción de las antraciclinas y del desarrollo de nuevos derivados más activos y menos tóxicos, se han producido escasos avances en nuestra capacidad para seleccionar las pacientes con mayor capacidad de respuesta. En los últimos años se ha discutido mucho sobre la expresión tumoral de topoisomerasa II y la respuesta

a antraciclinas y aunque algunos estudios concluyen que la amplificación del gen de la topoisomerasa se asocia a un mayor beneficio en el tratamiento de pacientes de cáncer de mama con antraciclinas²⁷⁹⁻²⁸², estudios recientes no han podido demostrar esta relación²⁸³. Conceptualmente, es posible que la mayor expresión de Topoll se asocie con una mayor eficacia de las antraciclinas, ya que la droga tendría más sustrato sobre el que actuar, pero que las técnicas que se emplean para determinar la expresión no sean las más adecuadas y no se esté determinado correctamente la expresión de Topoll²⁸³.

Los mecanismos de reparación del ADN son imprescindibles para la supervivencia celular y la reparación del daño originado por los agentes citotóxicos, supondrían un mecanismo de resistencia a estos fármacos. Por el contrario, células deficientes en estos mecanismos de reparación serían más sensibles a estas drogas. La dificultad estriba en caracterizar el mecanismo de reparación implicado en las lesiones por antraciclinas.

Si, como hemos visto, estos citotóxicos inducen principalmente roturas de doble cadena en el ADN, la recombinación homóloga tendría un papel clave en la sensibilidad a estos fármacos²⁸⁴. Spencer et al²⁸⁵ demostraron que las líneas celulares con déficit de XRCC3, y por tanto con capacidad de recombinación homóloga defectuosa, son 6 veces más sensibles a doxorubicina, y hasta 100 veces más sensibles a su derivado, barminomicina que las células con los mecanismos de recombinación homóloga intactos. En cambio, no observaron ninguna diferencia entre las células deficientes en XRCC1 y las normales, lo cual tiene sentido dado que este gen interviene en la reparación por escisión de bases (BER), mecanismo que en principio, no repara ni roturas de doble cadena ni adductos de ADN, si bien, como se ha señalado anteriormente, estas vías están muy solapadas. Por otro lado, tanto Spencer como Saffi²⁸⁶ observaron que las células con déficit en XPD son más sensibles al tratamiento con antraciclinas, lo que confiere a NER un papel inesperado en la reparación del daño causado por antraciclinas.

Los estudios descritos se han realizado en líneas celulares con mutaciones deletéreas de XPD, XRCC3 y XRCC1, sin que existan hasta la fecha estudios de sensibilidad a antraciclinas en líneas celulares de cáncer de mama con las variantes XPD751Gln, XRCC3 241Met y XRCC1399Gln. Como se ha mencionado anteriormente, existen estudios funcionales y de conformación de proteínas^{134,151,164,166,201-203} que establecen que estas variantes presentan una

capacidad de reparación del ADN disminuída. A falta, por lo tanto, de un estudio funcional en líneas celulares, y con lo anteriormente expuesto, solo podemos hipotetizar que las células con una capacidad de reparación de la vía NER subóptima (XPD751GlnGln), pero, fundamentalmente un déficit en la capacidad de Recombinación Homóloga (XRCC3Thr241Met) serían más sensibles a tratamientos basados en antracilinas.

En nuestro trabajo, al igual que en todos los estudios discutidos a continuación, los polimorfismos de la línea germinal se han determinado a partir de ADN obtenido de linfocitos de sangre periférica, asumiendo que no se produce ningún cambio en el tumor.

Encontramos que las pacientes con enfermedad local portadoras de la variante XRCC3 241Met/Met, presentan mayor SG que aquellas que son Met/Thr o Thr/Thr. Cuando se analizan las 150 pacientes con enfermedad temprana, independientemente del esquema de tratamiento, la diferencia en SG es significativa ($p=0.022$), pero el polimorfismo no es una variable pronóstica independiente ($p=0.09$). En cambio, cuando se estudia el grupo de 84 pacientes que han recibido tratamiento con antracilinas, la diferencia no solamente es significativa ($p=0.027$), sino que en el análisis multivariante XRCC3Thr241Met se mantiene como factor pronóstico independiente (Log Rank $p=0.05$) HR 0.15 (IC95% 0.02-0.9). En este grupo, Met/Met se asocia además a una mayor SLE ($p=0.049$), en el análisis univariante, pero no en el multivariante.

Los taxanos en esquemas adyuvantes para pacientes con cáncer de mama en estadios iniciales han demostrado un incremento de la SLE y SG^{191,192,287-289}, por lo que a partir de los años 90, su uso ha sido cada vez más habitual. Son fármacos que llevan a cabo su acción citotóxica mediante la estabilización de los microtúbulos del huso mitótico y frente a lo cual no se ha descrito que los mecanismos de reparación del ADN en los que intervienen los genes de nuestro estudio tengan ningún papel. No obstante, para conseguir un grupo más homogéneo y eliminar el posible efecto de los taxanos sobre la supervivencia, se realizó un segundo análisis estratificando a las pacientes según hubiesen recibido o no estos fármacos. Esto redujo la muestra a 65 pacientes, con la consiguiente merma del poder estadístico, como demuestra la amplitud de los intervalos de confianza, de modo que aunque XRCC3Thr241Met se mostró nuevamente como factor pronóstico para SG en el análisis univariante, no pudo confirmarse en el multivariante.

Estos resultados, en los que la variante con capacidad de reparación disminuida (Met/Met) se asocia a mayor supervivencia son, como hemos visto, plausibles desde el punto de vista biológico.

En cuanto a XPD^{Lys751Gln}, en nuestro estudio no hemos observado ninguna relación entre este SNP y la SG o SLE en las pacientes con cáncer de mama temprano o metastásico.

De acuerdo con los mecanismos biológicos anteriormente expuestos, cabría esperar que tampoco se observase ninguna diferencia en la supervivencia en relación con XRCC1^{Arg399Gln}, pero en nuestro estudio, observamos que las pacientes Arg/Arg con enfermedad local tratadas con antraciclinas, presentan una SLE más prolongada ($p=0.022$) y que este polimorfismo es además un factor pronóstico independiente (Log Rank $p=0.035$, HR 0.4, IC95% 0.2-0.9). En el grupo de pacientes que recibieron tratamiento con antraciclinas, pero no con taxanos, Arg/Arg se asocia de nuevo a SLE más prolongada, pero ésta vez en el análisis multivariante, no se confirma como factor pronóstico independiente. Esto podría ser debido a que el menor tamaño muestral resta poder estadístico o a que la observación anterior es espúrea, pero Bewick¹⁵⁷ obtuvo un resultado similar en pacientes con cáncer de mama metastásico tratadas con mitroxantrone. Así mismo, Yarosh et al²⁹⁰ observaron que las células tumorales homocigotas para el alelo Gln eran más resistentes que aquellas que eran Arg/Gln o Arg/Arg a varios agentes alquilantes como el busulfán o las sales de platino.

Una vez revisada la bibliografía, no hemos encontrado ningún estudio que analice el posible impacto que XRCC3^{Thr24Met}, XRCC1^{Arg399Gln} o XPD^{Lys751Gln} puedan tener sobre pacientes con cáncer de mama en estadios precoces, tratadas con antraciclinas. En el estudio arriba mencionado, Bewick et al¹⁵⁷ estudiaron el impacto sobre la supervivencia de XRCC3^{Thr24Met}, XRCC1^{Arg399Gln} en 95 pacientes con cáncer de mama metastásico tratadas con esquemas basados en mitroxantrone. Contrariamente a lo esperable, las variantes con capacidad de reparación deficiente XRCC1^{399Gln} y XRCC3^{241Met} se asociaban a una menor supervivencia, sin que los autores ofrezcan ninguna explicación o hipótesis.

Rodriguez et al²⁹¹ han publicado recientemente una firma de 69 genes relacionados con la reparación del ADN que predice la respuesta a antraciclinas en cánceres de mama triple negativo.

Los tumores con una expresión disminuida de estos genes presentaron respuestas patológicas completas tras tratamientos neoadyuvantes con antraciclinas con mayor frecuencia que aquellos con una expresión normal. XRCC3, XRCC1 y XPD no han sido incluidos en el análisis.

Berwick et al²⁹² estudiaron XRCC3Thr24Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln en relación con la respuesta a antraciclinas en pacientes diagnosticados de sarcoma de partes blandas. No encontraron ninguna asociación entre estas variantes y la supervivencia tras el tratamiento en los 120 pacientes analizados, si bien la muestra es muy heterogénea y junto a los pacientes tratados con antraciclinas se incluyen otros que recibieron radioterapia o fueron tratados únicamente con cirugía, sin que se haga ningún tipo de estratificación para el análisis de supervivencia.

No hemos encontrado ningún otro estudio que analice variantes polimórficas en genes de reparación del ADN en relación con la respuesta a antraciclinas en cáncer de mama o de otras localizaciones. En cambio, existen varios trabajos que analizan estos polimorfismos en relación con esquemas a base de platinos. Estos fármacos producen también roturas de doble cadena y se ha sugerido que la reparación del ADN puede ser uno de los mecanismos de resistencia, por lo que sus resultados podrían, en cierta forma, servir de hipótesis para posteriores estudios en antraciclinas. Chew et al²⁹³ estudiaron el impacto sobre la supervivencia de XRCC3Thr241Met y XPDlys751Gln, en 54 pacientes con cáncer de mama metastásico tratadas con gemcitabina y cisplatino. XRCC3 241Met y XPD751Gln se asociaron a una menor supervivencia libre de progresión. Sin embargo, teniendo en cuenta que las pacientes habían recibido múltiples líneas previamente, el pequeño tamaño muestral, y el hecho de que el alelo Met, variante polimórfica de XRCC3 24,1 presente una prevalencia de 0.64, doble de la que generalmente presenta en otras poblaciones y muy superior a la del alelo *wild type* (0.36), hace pensar en un posible error en el genotipado o en el recuento de los alelos, de modo que los resultados del estudio deban ser tomados con precaución.

Un estudio similar utilizando gemcitabina y cisplatino en 135 pacientes españoles con cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP)²⁹⁴, mostró que XRCC3 Thr241 Met es un factor predictor independiente y que los pacientes con el genotipo Met/Met presentaban una mayor SG. En el estudio de Kalikaki et al²⁹⁵ en población griega, 119 pacientes con CPCNP fueron tratados

con esquemas de quimioterapia con platinos, XRCC1 399 GlnGln se asoció a una mayor supervivencia, mientras que Sun et al²⁹⁶ no encontraron ninguna asociación entre este polimorfismo y la respuesta a platinos en pacientes asiáticos con CPCNP estadio IV.

Quintela-Fandiño²⁹⁷ estudió de forma prospectiva los mismos polimorfismos de XRCC1 y XPD en 103 pacientes españoles con tumores de cabeza y cuello localmente avanzado tratados con quimioterapia de inducción basada en cisplatino. Encontró que las variantes polimórficas (XRCC1 399GlnGln y XPD GlnGln) de ambos genes se asocian a mayor supervivencia y podrían condicionar la respuesta a cisplatinos en este tipo de tumores. Estudios en cultivos de líneas celulares de tumores de cabeza y cuello parecen confirmar que XRCC3Thr241Met y XPDlys751Gln median la sensibilidad a cisplatino¹⁵⁸.

Ruzzo et al²⁹⁸ no encontraron que ninguno de los polimorfismos de nuestro estudio tuviese impacto sobre la supervivencia de pacientes con cáncer gástrico avanzado tratados cisplatino-5FU, mientras que Vangsted et al²⁹⁹ encontraron que XPD751Gln y XRCC3241Met se asocia a mayor tiempo hasta el fallo del tratamiento en pacientes con trasplante autólogo por mieloma múltiple .

Son escasos los estudios farmacogenómicos realizados hasta la fecha con estos polimorfismos y aunque la mayoría apuntan que las variantes XPD751Gln, XRCC1399Gln y XRCC3241Met se asocian a una mejor respuesta a tratamientos que inducen doble rotura del ADN, existen resultados discrepantes. Estas diferencias pueden deberse una vez más al tamaño muestral o a las diferencias étnicas. Por otro lado, es posible que los distintos tejidos empleen diferentes mecanismos de reparación, y por lo tanto, aún tratándose del mismo fármaco, el mecanismo de resistencia de las células tumorales de la mama sean diferentes a las del sarcoma, con los que las conclusiones de los estudios no son extrapolables.

Nuestros resultados y los trabajos anteriormente expuestos sugieren que XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln y XPDlys751Gln podrían estar asociados con la respuesta a agentes quimioterápicos que inducen lesiones de doble cadena en el DNA. Pero estos trabajos están limitados por el tamaño muestral y por el hecho de que en ninguno de ellos se administraron platinos o antraciclinas como agente único, sino siempre en combinación, lo que puede

enmascarar el efecto real de estas variantes genéticas. La confirmación de la implicación farmacogenómica de estos polimorfismos precisa tanto de estudios funcionales *in vitro* y/o *in vivo*, como de estudios prospectivos adecuadamente diseñados³⁰⁰.

CONCLUSIONES

1. El alelo Gln del polimorfismo XRCC1 Arg399Gln es más frecuente en el grupo de pacientes con cáncer de mama que en los controles de nuestra serie, lo que sugiere que la presencia de este alelo podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de tumores.
2. En nuestra serie, el genotipo Lys/Lys del polimorfismo XPDlys751Gln se asocia con el desarrollo de cáncer de mama a edades más tardías que en las portadoras de las otras dos variantes (Lys/Gln y Gln/Gln). Es posible que XPDlys751Lys module a otros factores de riesgo, retrasando la aparición del cáncer de mama.
3. Ninguno de los polimorfismos estudiados se ha asociado con el riesgo de desarrollar toxicidad cutánea aguda o tardía tras el tratamiento radioterápico.
4. En nuestra serie, las variantes de XRCC3Thr241Met y XRCC1Arg399Gln se asocian con diferente pronóstico, probablemente en relación con la capacidad de reparar las lesiones de doble cadena del ADN inducidas por antraciclinas. Esto podría tener implicaciones farmacogenómicas al seleccionar el tratamiento más adecuado para las pacientes con cáncer de mama en estadios tempranos.

SUMMARY

1. INTRODUCTION

1.1. Epidemiology

Breast cancer is the most common cancer among women in the Western world. Incidence and mortality varies from one country to another, with the greatest incidence observed in North America, Australia, Scandinavia, Western Europe and Argentina. Data presented by the European Union Directorate General for Health and Consumers in 2010 demonstrate breast cancer is the commonest form of cancer among European women, as it represents 30% of all the new cases of cancer in women and it is also the main cause of cancer-related death among women younger than 75 years across the European Union. In Spain, 16000 new cases are diagnosed every year, affecting one in thirteen women, and causes 6000 deaths a year. Breast cancer represents, with no doubt, one of the majors concerns of public health.

Since the 1990s profound changes have taken place in the clinical presentation and management of breast cancer due to mammography screening, and the implementation of effective treatments, including advances in surgery, radiotherapy, chemotherapy and lately biologically targeted therapies. All these innovations have contributed to improve breast cancer survival in the developed countries. Nevertheless, a better understanding of the risk factors and the identification of biological mechanisms that confer sensitivity to those treatments, particularly to chemotherapy, could help to tailor the most adequate therapies to each patient.

1.2. Genetic Susceptibility to Breast Cancer

Breast cancer, like other common cancers, tends to cluster in families, with the disease being approximately twofold more common in women whose first-degree relatives have been diagnosed with breast cancer than in women without such a family history. The higher rate of most breast cancers in monozygotic twins of case patients than in dizygotic twins or siblings suggests that most familial clustering is the result of inherited genetic factors rather than lifestyle or environmental factors. Some of this familial aggregation can be explained by mutations in genes that confer high

risk of disease (high penetrance genes). However, such susceptibility alleles are rare in the population. For example, highly penetrant variants in the breast cancer susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2*, account for less than 20% of the total genetic risk of breast cancer, and other rarer high penetrance genes such as *P53* and *PTEN* account for less of 5% of the risk. It is likely that much of the unexplained familial risk is due to alleles of low to moderate penetrance. In other words, the greater part of inherited predisposition to breast cancer and therefore perhaps of other common cancers, may be due to the effect of the combination of genetics variants at several different loci.

Up to date, the main strategy to identify low-penetrance cancer susceptibility genes has been through the analysis of polymorphisms with association studies either with candidate loci or with Genome Wide Association studies (GWAs).

Polymorphisms have been historically classified as commonly occurring (>1%) genetic variations in the general population, whereas the rare variants with obvious functional consequences on the protein have been classified as mutations. When a polymorphism involves only a single nucleotide is called Single Nucleotide Polymorphism (SNP), and it has been estimated that more than 10 million SNPs exist in the genome. Compared to mutations, SNPs have been perceived as functionally insignificant, but current evidence emphasizes that many of them affect the intrinsic properties and the function of the proteins to a variable degree. Even those variants that do not cause an amino acid change may also have an impact on the DNA repair phenotype, because they may lie in introns that regulate splicing, may cause RNA instability, or may be linked to genetic changes in other unknown genes.

Although the effect of an individual SNP is generally small, the genetic effect of combinations of functionally relevant SNPs may additively or synergistically contribute to breast cancer risk. This gene-gene interaction is likely to be a ubiquitous component of the genetic architecture of common diseases, such as breast cancer.

Predisposition by combinations of weak genetic variants may be of much greater significance to public health than the marked individual risk seen in the inherited cancer syndromes.

The identification of these low penetrance variants could allow us to stratify women according to genetic risk, improving the efficiency of screening programs, but, they could also be implicated in the response to chemotherapy and radiotherapy, and their characterization would help us for better clinical decisions.

1.3. Polymorphisms in DNA repair genes and breast cancer

DNA repair and cell cycle control mechanisms maintain genomic stability. When DNA damage occurs, DNA repair pathways, cell cycle arrest and apoptosis may be activated. Decrease in this DNA repair ability has been associated with an increased risk of different types of cancer.

Radiation therapy and treatment with chemotherapeutic drugs, such as alkylating agents (e.g. anthracyclines and platins) can damage DNA directly, through intercalation and also by inducing by-products, such as reactive oxygen species. While DNA repair mechanisms are vital for cell survival and normal functioning, repair of chemotherapy DNA damage is a major contributor to drug resistance in cells. Hence, cellular repair can reduce the effectiveness of chemotherapeutic agents, while cells with down regulated or deficient repair systems display increased sensitivity to many DNA-damaging agents. *In vitro* and *in vivo studies* have shown associations between alterations in DNA repair genes and sensitivity to a broad range of drugs and patients survival. In addition, SNPs in genes involved in DNA repair can affect repair efficiency and significantly alter patient responses to cancer treatments.

Among all SNPs in DNA repair genes, we have chosen XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln and XPDlys751Gln because their biological implications have been well characterized and the minor alleles are very frequent in the general population (>20%).

1.3.1. XRCC1 Arg399Gln

XRCC1 (*X-ray repair cross complementation group 1*) is a 33kb gene located on chromosome 19q13.2-13.3 that encodes a 663 amino acid protein that interacts with many other

proteins and is also a phosphorylation site for CK2, even though the protein has not enzymatic activity. *XRCC1* is involved in the repair of DNA base damage and single strand break (BER) by binding DNA ligase III (*LIG3*) at its carboxyl domain and by binding DNA polymerase β (*DNA pol β*) at the site of damaged DNA. Therefore, *XRCC1* plays an essential role in removing endogenous and exogenous DNA damage.

In vitro, Chinese hamster ovary and breast cancer cells lacking functional *XRCC1* protein are hypersensitive to a broad range of DNA damaging agents, and *XRCC1* transcript levels correlate positively with cisplatin chemoresistance and hypersensitivity to ionizing radiation in cancer cell lines.

More than 60 SNPs have been identified in *XRCC1*, but probably the most studied one is Arg399Gln, in exon 10, consisting in a nucleotide substitution of G to A that once translated results in an arginine (Arg) to glutamine (Gln) amino acid change at codon 399. It produces significant conformational changes in the protein, including the loss of secondary structural features such as alpha helices that may be critical for protein-protein interactions, altering the ability of *XRCC1* to coordinate BER.

Different studies have estimated the Gln variant to be present in 23-36% of the general population. This allele has been associated with different cancer types, mainly in smokers.

1.3.2. *XRCC3* Thr251Met

XRCC3 (*X-ray repair cross complementation group 3*) is located on chromosome 14q32.3 and is structurally related to *RAD51*, with who interacts. *XRCC3* is involved in homologous recombinational repair of DNA double strand breaks and crosslinks. *XRCC3* deficient cells do not form Rad51 foci after radiation damage, they exhibit genetic instability and increased sensitivity to DNA-damaging agents, such as ultraviolet light.

XRCC3 has a SNP consisting in a substitution of C to T at position 18067 (exon 7) that results in a Thr to Met amino acid change at codon 241. It seems to remove a phosphorylation site

and thus affect *XRCC3* interaction with other proteins involved in homologous recombination that results in a decrease in the cellular capacity to repair DNA.

The T allele is present in 22 to 44% of general population and has been associated to an increased risk of various malignancies but is also related with the response to various drugs, mainly, alkylating agents.

1.3.3. XPD Lys 751 Gln

The 54.3kb *XPD* gene codes for an evolutionary conserved helicase, a subunit of TFIIH that is essential for transcription and nucleotide excision repair (NER) through the transcription-coupled repair mechanisms. Mutations in *XPD* decrease the helicase activity and prevent the protein from interacting with other factors, resulting in a defect in the repair capacity.

The C-terminal domain of *XPD* has been implicated in interactions with other components of the TFIIH complex, and it is also the site of a common SNP consisting in a substitution of adenine (A) to cytosine (C) that once translated, results in a Lysine (Lys) to Glutamine (Gln) amino acid change. The substitution produces a significant conformational change immediately terminal to the site of the polymorphism. Functional studies have shown that cells with the Gln/Gln variant present with higher levels of chromatid aberrations than the homozygous wild type after ionizing radiation.

According to the previous studies the C allele is present in 30-40% of the general population, and, has also been associated with an increased risk of different types of cancer, but also with the response to alkylating drugs, such as platin salts or anthracyclines.

2. OBJECTIVES

In this study, we will analyze the association between polymorphisms in DNA repair genes and the development of sporadic breast cancer, as well as the effect of these genetic variants in the patient response to cancer treatments. Therefore, we have established the following objectives:

1. To determine and compare the alleles and genotypes distribution of polymorphisms XRCC1Arg399Gln, XRCC3Thr241Met and XPDlys751Gln in breast cancer patients and controls, in order to establish a possible relation between the different genotypes and breast cancer.
2. To determine the alleles and genotypes distribution of polymorphisms XRCC1Arg399Gln, XRCC3Thr241Met and XPDlys751Gln by age, in breast cancer patients and controls.
3. To analyze the alleles and genotypes distribution of XRCC1Arg399Gln, XRCC3Thr241Met and XPDlys751Gln in breast cancer patients treated with RT to asses a possible asociation with acute and late toxicity.
4. To analyze the potential prognostic value of XRCC1 Arg399GLn, XRCC3Thr241Met y XPDlys751Gln in breast cancer patients.

3. MATERIAL AND METHODS

XRCC1Arg399Gln, XRCC3Thr241Met and XPDlys751Gln have been widely studied because their biological significance has been well characterized and the minor alleles are present with relatively high frequency in the general population. We have analyzed the role of these SNPs in breast cancer risk, but we have also explored the possibility that these polymorphisms could affect the age of diagnosis, or the response and sensitivity to breast cancer treatments. Hence, the study has been divided into two parts: the first one is a case-control association study, while the second one is a radio and farmacogenomic study in a cohort of breast cancer patients.

3.1. Cases

Eligible patients were women 18 years or older, diagnosed with breast cancer and treated at Hospital Universitario de Salamanca between 1990 and 2004. Patients were recruited among those who attended the outpatients clinic of the Medical Oncology Department between December 2003 and April 2004 for treatment of follow up.

200 cases were recruited and a data base was created with the clinical data retrospectively collected for each patient. These clinical variants included: Histopathological characteristics of the tumour (type, differentiation grade, hormonal receptors and HER2 amplification); TNM stage; age and hormonal status at diagnosis; treatment characteristics (surgery, radiotherapy, and hormonal therapy and chemotherapy schemes) and follow up data (local relapse, distant metastasis, secondary tumours, disease free survival, overall survival)

Three patients who were found to carry a mutation in the *BRCA1* gene during the follow up and other 2 who received high dose chemotherapy with PBPCT (peripheral blood progenitor cells transplantation) were excluded together with another 16 cases whose clinical data were uncompleted and other 5 due to insufficient DNA. Finally, 174 breast cancer patients were included in the study. The youngest was 26.5 years old at diagnosis and the oldest 82.5 (median 62 years).

Majority of cases (86.2%) presented with localized breast cancer, being 30% of them locally advanced. 54.6% of tumours were T2 (2-5 cms) and the tumour had spread to the axillary lymphatic nodes in 58% cases. At the time of diagnosis, 14 cases were already metastatic (8%). The commonest TNM stage was II. Breast cancer cases and treatments are summarized in tables 71 and 72. Chemotherapy schemes are detailed in table 17. 10 patients were excluded from the survival analysis due to missing some relevant clinical data, but were included in the association study.

Table 71: Characteristics of breast cancer patients included in the study

Characteristic	No of Patients	Percentage (%)
Age (years) Median Range	62 26.5-82.5	
Hormonal Status Premenopausal Postmenopausal	47 127	27 73
Histotype Invasive ductal carcinoma (IDC) Invasive lobullilar carcinoma (ILC) Inflammatory cancer Other subtypes	147 12 6 9	84.5 6.9 3.4 5.2
Grade I II III Unknown	18 57 82 17	10.6 32.7 47.2 9.8
Estrogens Receptor Positive Negative Unknown	113 53 8	65 30.5 4.5
Progesterone Receptor Positive Negative Unknown	93 69 12	53.4 9.7 6.9
HER2 Positive Negative Unknown	32 78 64	18.4 44.8 36.8
Subtype Luminal Triple Negative HER2 Unknown	117 29 17 11	67.3 16.7 9.7 6.3
Pathological Stage (Local disease) Tumor Size 0-≤2 cms 2-≤5 cms >5 cms	54 82 14	36 54.6 9.3
Lymphatic Nodes (Local disease) Negative Positive 1-3 4-9 ≥10	62 87 43 19 25	41.4 58 28.6 12.6 18.7
Metastasis at diagnosis 1 site Bone Liver Skin ≥2 sites	11 9 1 1 3	78.6 64.3 7.1 7.1 21.4

Table 72: Treatments administered to the breast cancer patients in the study

Type of treatment	No of Patients	Percentage (%)
Surgical treatment		
No surgery	8	4.6
Mastectomy	110	63.2
Quadrantectomy	18	10.3
Tumorectomy	38	21.8
Axillary dissection		
No	3	1.8
Sentinel lymph node negative	24	14.5
Axillary lymph node dissection	139	83.7
Radiotherapy		
Yes	112	64.4
Axillary boost	25	22.3
No	61	35.1
Hormonal Treatment		
No	35	20.1
Tamoxifen	82	47.1
Aromatase inhibitors	57	32.8
Adjuvant treatment		
No adjuvant chemotherapy	12	8
Schemes containing anthracyclines	84	56
Schemes without anthracyclines	54	36
Adjuvant taxanes		
Schemes with taxanes	19	12.7

3.2. Controls

Eligible controls were women, 18 years or older with no previous or concurrent malignant disease. 310 controls were recruited between June 2004 and June 2005 in the Accident & Emergency Department at Hospital Universitario de Salamanca.

174 controls were matched with cases for age (± 3 years) and menstrual status. Median age was 61.5 (range 26.5-91.5). The difference with the case group is not statistically significant ($p=0.996$).

Another 126 women with age between 20.5 and 98.5 were included in order to enrich the control group with women of every age. Thus, the control group includes 300 women, 25 of which were younger than 35 years old (8.3%), 55 were older than 80 (18.3%) and the remaining 73.3% (220) was between 35 and 80 years old (Table 7).

3.3. SNPs genotyping

Blood samples of all patients and controls were collected into 10 ml heparinised tubes. Germline DNA was extracted using the alkaline lyses method and frozen at -20°C until the assay was performed.

At the time the study was started we did not have the required infrastructure to perform RT-PCR assays, and the gene polymorphisms were determined by PCR-RFLP. When a RT-PCR system was acquired, the study was finally completed with this technique.

3.3.1. PCR-RFLP

For XRCC3Thr241Met, a PCR product of 136 pb was obtained with the following primers (forward/reverse): 5'-GCC TGG TGG TCA TCG ACT C-3'; 5'-ACA GGG CTC TGG AAG GCA CTG CTC AGC TCA CGC ACC-3'. PCR reactions were carried out in a total volume of 25µl containing 20ng of genomic DNA. PCR amplifications consisted of an initial denaturing step of 95°C for 3 min and 35 cycles of denaturalization at 95°C (20 sec), annealing (60°C, 20 sec) and extension (72°C, 20 sec). A final extension at 72°C (min) was also included. 10µl of PCR product was incubated with the restriction enzyme *NcoI* (*Fermentas, Hanover, MD*) at 37°C for 6 hours. Products were resolved on 3% agarose gels and stained with ethidium bromide. Three fragments (136, 97 and 39 pb) were generated. A 136 pb band corresponded to the CC genotype, two bands of 97 and 39 pb, corresponded to the TT genotype, and three bands of 136, 97 and 39 pb corresponded to the TC genotype.

For XPDlys751Gln a PCR product of 161 pb was obtained with the following primers: (forward/reverse) 5'-CTG CTC AGC CTG GAG CAG CTA GAA TCA GAG GAG ACG CTG-3'; 5'-AAG ACC TTC TAG CAC CAC CG-3'. The conditions were the same as described above, but the annealing temperature was 62°C. 10µl of PCR product was incubated with the restriction enzyme

*Pst*I (Fermentas, Hanover, MD) at 37°C for 6 hours obtaining three fragments of 161, 120 and 41 pb. A 161pb band corresponded to the AA genotype and two bands of 120 and 41 pb corresponded to the CC genotype, whilst three bands of 136, 97 and 39 pb corresponded to the heterozygous phenotype.

Ninety five cases and ninety five controls were genotyped with PCR-RFLP. All the samples were genotyped twice for quality control purposes.

3.3.2. RT-PCR

The TaqMan assays (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) consists of two primers for PCR of the sequence of interest and two allele specific fluorescent probes. TaqMan probes and primers for each SNP are described in table 9.

PCR reactions were carried out in a total volume of 25µl containing 15ng of genomic DNA. PCR amplifications consisted of an initial denaturing step of 95°C for 10min and 40 cycles of denaturalization at 92°C (15 sec) and annealing (60°C/56°, 1.15min). A final extension at 60°C for 1 min was added.

Genotyping was conducted in StepOne system® (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Allelic Discrimination Program® software (*Applied Biosystems, Foster City, CA*), was used to determine the alleles in each sample. For quality control purposes, each sample was processed by duplicate.

XRCC1Arg399Gln allelic discrimination was performed using RT-PCR in the whole sample (174 patients and 300 controls). The same method was used to genotype XRCC3Thr241Met and XPDlys751 in 79 and 205 controls. In addition, another 20 cases and 20 controls previously genotyped with PCR-RFLP were randomly selected to be repeated with RT-PCR. The concordance was 100% so it was decided not to repeat the entire sample previously genotyped.

3.3.3. Statistical Methods

Descriptive parameters of demographic and clinical variables were described separately for cases and controls. Allelic distribution frequencies in each group were compared with Chi-square test. Median age and distribution was calculated for each allelic subgroup in both cases and controls and later compared using Kruskal-Wallis K tests.

Chi-square, Cochran-Armitage, Mann-Withnney U and Kruskal-Wallis K tests were used when appropriate to analyze the differences in demographic and clinical variables according to the polymorphisms distribution.

Breast cancer patient outcomes were also analyzed. For survival analysis, cases were classified into two subgroups: 1) patients with early breast cancer and 2) patients with metastatic disease. In the first group, Disease Free Survival (DFS) and Overall Survival (OS) were analyzed. OS from Metastasis (OS_M) was analyzed in those patients who presented with metastatic disease at diagnosis and in those who developed metastasis during the follow up.

Disease Free Survival (DFS) was defined as the time elapsed from date of initial surgical treatment until a disease related event occurred (either local or metastatic relapse, contralateral breast cancer or disease related death). Overall Survival (OS) was estimated until death. Overall Survival from Metastasis (OS_M) was defined as the time elapsed since the metastases were diagnosed until death. Data collection cut-off for this analysis was December 2009, when median follow-up was 62 months (range 11-228).

Survival rates and their 95% confident interval were estimated using the Kaplan-Meier Method. Survival curves plotted with the Kaplan-Meier Method were compared by Cox log-rank test. Survival Hazard Ratio were obtained using a Cox regression model in which all significant variables ($p \leq 0.05$) in the univariate analysis and those acting as potential confounding factors were introduced.

Statistical analysis was performed with SPSS version 15 (SPSS, Inc, Chicago, IL).

4. RESULTS

4.1. Genotypes distribution in cases and controls

We have not found any difference between cases and controls for XPD_{Lys751Gln} ($p=0.944$) and XRCC3_{Thr241Met} ($p=0.670$), but the difference observed for the Arg and Gln alleles of XRCC1_{Arg399Gln} is statistically significant (Table 21). Gln/Gln and Gln/Arg are more frequent in cases, while the Arg/Arg genotype is more common in controls [$p<0.002$; OR 1.96 (CI95% 1.3-3)].

4.2. Genotypes distribution in cases and controls by age

4.2.1. Controls:

Alleles and genotypes distribution by age in the control group is shown in table 23. No difference was found in the distribution of those SNP according to age in this group ($p=0.406$, $p=0.782$ and $p=0.667$, XPD_{Lys751Gln}, XRCC1_{Arg399Gln} and XRCC3_{Thr241Met}, respectively).

4.2.2. Cases:

Median age of cases carrying the XPD_{Arg751Lys/Lys} genotype was 65 years (range: 29.5–86.5), and 58.5 (26.5-91.5) and 58 (33.5-67.5) for those with the Lys/Gln and Gln/Gln genotypes, respectively. This difference is significant ($p<0.001$), OR: 3.52 (IC: 3-5.44) (Tables 24 and 25). When patients were stratified by menstrual status at diagnosis, the Lys/Lys genotype remained more frequent among postmenopausal women ($p=0.023$) (Table 26).

4.3. Genotype distribution and cutaneous toxicity following radiotherapy

4.3.1. Acute toxicity:

Acute toxicity data were incomplete in 26 cases that were excluded for this analysis. Majority of cases with acute toxicity following RT developed grade 1 or 2 cutaneous toxicity (24.1% and 25.9%, respectively) and only one patient presented with grade 4 toxicity (Table 28). No association

was seen in our study between the genetic variants and acute cutaneous toxicity following RT (Table 29) even when axillary boost was administered (Table 30).

4.3.1. Late toxicity:

Late cutaneous toxicity was present in 32 of the 91 patients included in the analysis (35.16%) Fibrosis was the commonest event, which is also related with surgery. In our sample, no association was seen between any SNPs and late cutaneous toxicity (Table 31). This toxicity is not associated with axillary boost either (Table 32).

4.3.2. Local relapse after RT:

After 62 months median follow up, 12 patients out of 112 (10.7%), who received RT presented local relapse. The XPD751 Lys/Lys was less common among the patients with local relapse (43% vs 8.3%), but the difference was not statistically significant. ($p=0.062$) (Table 33).

4.4. SURVIVAL ANALYSIS

Median follow up was 62 months (11-228), therefore survival analysis was done at 5 years. Considering the whole sample, 5-years DFS was 69.9% (CI95% 62.8-77.7) and 5-years OS was 84.2% (CI95% 78.1-90.3).

4.4.1. Early breast cancer

4.4.1.1. Disease Free Survival (DFS)

65 patients out of 150 with early breast cancer presented with an event in the 60 months after diagnosis, therefore 5-years DFS was 69.9 (CI95% 62.85%-77,75%). Classical prognostic factors for breast cancer were analyzed (tables 34 to 38). In our series, axillary node metastasis, high tumour grade, and HER2 amplification were associated with worse outcome ($p=0.002$, $p=0.013$ and $p=0.047$, respectively), whilst tumour size and hormone receptors expression were not ($p=0.537$ and $p=0.818$, respectively). None of the genetic variants analyzed was associated with DFS in these patients (table 39).

4.4.1.2. Overall Survival

84.2% of patients with early breast cancer were alive 5 years after diagnosis (CI95% 78.1-90.3). Median Overall Survival was 140.5 months (IC95% 108-172.3). Axillary nodes metastasis (p=0.023), tumor grade (p=0.007) and HER2 expression (p=0.016), XRCC3241Met/Met (p=0.022) were associated to 5-years OS (table 40 to 46). Tumor grade (p=0.022) and axillary node metastasis (p=0.05) remained to be independent prognostic factors in the multivariate analysis, whilst XRCC3241Met/Met failed (p=0.09).

4.4.1.3. Patients with early breast cancer treated with anthracyclines

4.4.1.3.1. Disease Free Survival

84 out 150 patients with early breast cancer were treated with chemotherapy regimens containing anthracyclines (14 neoadjuvant and 70 adjuvant treatments).

In this subgroup of patients, XRCC1 399Arg/Arg (84% vs 46.3%, p=0.007) and XRCC3241Met/Met (80.8% vs 56.3%, p=0.049) were associated to more prolonged DFS (table 47), as well as axillary nodes (p=0.003), and tumor size (p=0.001) (tables 48 to 52). Multivariate analyses showed XRCC1 399Arg/Arg and tumor size ≥5cms as independent prognostic factors [(p=0.035; HR=0.4, (CI95%0.2-0.9) and p=0.002, HR=2.5, (CI95% 1.41-4.43), respectively]

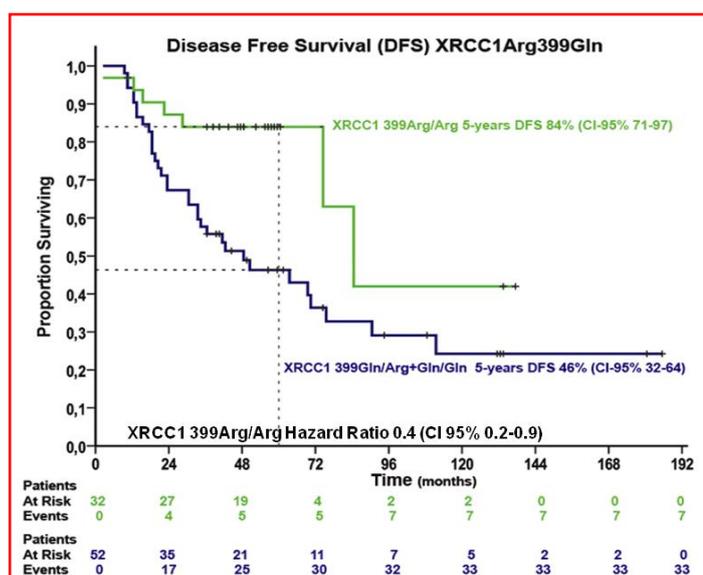


Figure 25: DFS in early breast cancer patients treated with anthracyclines and XRCCArg1399Gln genotypes

4.4.1.3.2. Overall Survival

In the subgroup of patients treated with anthracyclines, median OS was 97.5 months (CI95% 53-141) and 73.7% (65-83.89) were alive five years after diagnosis.

Patients with the XRCC3 241Met/Met genotype, presented with a longer 5-years OS (100%) than those with the Thr/Thr and Met/Thr genotypes (69.3%, IC95% 57.9-81.5) ($p=0.027$) (Table 53). Tumor size and Her2 expression were also positively associated to 5-years OS ($p=0.005$ and $p=0.006$, respectively) (table 54 to 58). Multivariate analysis reported XRCC3 241 Met/Met and tumor size ≥ 5 cms as independent prognostic factors [$p=0.05$, HR= 0.15 (IC95% 0.02-0.99), and $p=0.03$, HR= 1.8 (1.059- 3.492) respectively].

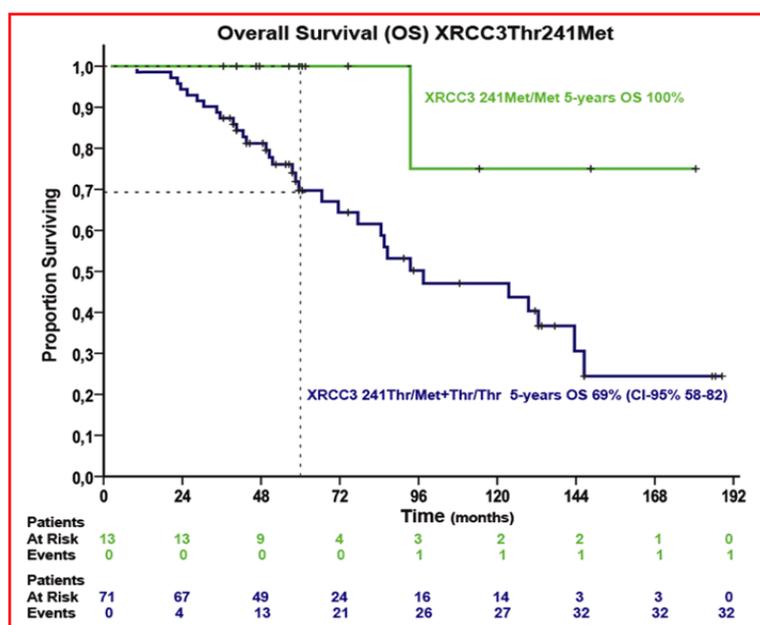


Figura 26: OS in early breast cancer patients treated with anthracyclines and XRCC3Thr241 genotypes

In order to avoid as many confounding factors as possible when evaluating the effect of anthracyclines in early breast cancer outcome, the analysis was repeated without the 19 patients who also received taxanes. In this subgroup of 65 patients, 5-years DFS was 55.8% (CI95% 44.2-67.6%) and median 5 years-DFS was 69.5 months (CI95% 44.5-94.45). Patients carrying the XRCC1 399Arg/Arg genotype presented prolonged 5years-DFS than those with the Arg/Gln and

Gln/Gln genotypes ($p=0.021$). Once again, axillary node metastasis and tumor size ≥ 5 cms were also related with outcome ($p<0.0001$ in both cases). The multivariate analysis did not support XRCC1Arg399Gln as independent prognosis factor ($p=0.206$).

5 years-OS in this group was 72.9% (CI95% 62.1-83.7), and median OS was 97.5 months (CI 54.89-140.1). 100% of patients carrying the XRCC3 241Met/Met genotype and 68.1% of those carrying the Met/Thr and Thr/Thr genotypes were alive 60 months after diagnosis ($p=0.034$), but this SNP failed as independent prognostic factor in the multivariate analysis ($p=0.052$)

4.4.2. Metastatic breast cancer patients

14 patients presented with metastasis at the time of diagnosis and in another 63 the diseases spread during the follow up. OS_M was 49 months (CI95% 38-60), and 37% of patients were alive 5 years after the diagnosis of metastasis (CI95% 25.6-48.4).

None of the factors previously reported as prognostic in metastatic breast cancer patients, such as DFS ≥ 24 months metastasis localization, hormone receptors expression or HER 2 amplification) were associated with OS_M in our series ($p=0.061$, $p=0.816$, $p=0.031$, $p=0.052$, respectively.) Neither were any of the genetic variants: XRCC1Arg399Gln ($p=0.763$), XRCC3Thr241Met ($p=0.073$), XPDlys751Gln ($p=0.051$). This subgroup was not stratified according to chemotherapy treatment.

5. DISCUSSION

5.1. CASE-CONTROL ASSOCIATION STUDY

The sample for this analysis consisted of 174 breast cancer patients and 174 controls matched on age (± 3 years), sex and ethnicity. The control group was enriched with 126 individuals between 20 to 98 years old.

We recognize that the sample size might be small to detect some differences in the allele frequency. Another limitation is that some risk factors for breast cancer, such as parity or the length of the fertile period were not taken in account when cases and controls were enrolled. On the other hand, it is remarkable that after an exhaustive review of the literature analyzing polymorphic variants of XRCC3, XPD and XRCC1, we found that majority of authors only matched cases and controls on age, sex and hormonal status at diagnosis. Only Shore et al, stratified cases and controls according to age, menstrual status, menarche, parity, contraceptives, hormonal replacement therapy, alcohol intake, body mass index and family history of breast cancer.

5.1.1. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln and XPDlys751Gln and breast cancer risk

In our series XRCC1399Arg/Arg is more frequent in the control group and the Arg/Gln and Gln/Gln genotypes are more common in cases ($p=0.002$, OR 1,96, CI95% 1.3-3). Our results are consistent with three published meta-analysis that found the Gln/Gln genotype to be associated to breast cancer. The association seems to be stronger in Asian than in Caucasian populations. Gln allele presented a decreased DNA repair ability in functional studies.

We have not found any association between XRCC3Thr241Met and XPDlys751Gln and breast cancer ($p=0.670$ and $p=0.944$) while some meta-analysis have reported the minor alleles (Met and Gln, respectively) to be associated with the disease (OR=1.07 and 1.05, respectively). These are very low penetrance genes, which would require the presence of many other factors, such as tobacco or other genetic variants, to increase the risk of breast cancer. Due to the modest

effect of these variants, a bigger sample than ours might be required to detect any difference in the allele distribution in cases and controls.

5.1.2. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln and XPDlys751Gln and age

Time-dependent accumulation of damage in cells and organs is associated with a gradual functional decline and aging. The molecular basis of this phenomenon remains unclear, whereas also in cancer, DNA alterations are the major culprit. Therefore, cancer and aging are two sides of the same DNA-damage problem. There is an increased incidence of cancer with age due to this intrinsic DNA repair decreased ability and the consequent DNA damage accumulation. But obviously, not all individuals develop cancer when getting older and we hypothesize that this could be in relation with their DNA repair ability.

5.1.2.1. Control Group

If, as we propose, individuals with a better DNA repair ability reach the last decades of life without developing cancer, it is reasonable to expect that the alleles associated with a better DNA repair ability would be more common among the older controls. Young individuals carrying the risk alleles or genotypes would have more chances of developing cancer along their lives and, consequently, would leave the control group.

All controls (n=300) were included for this analysis, so 25 of them were younger than 35 years (8.3%), 55 were older than 80 years (18.3%) and 120 were 35 to 79 years old.

In our series, the allelic distribution is very similar in all groups of age, without any difference between the younger and the elder women. Similar results were reported by Kazimirova, who demonstrated older individuals to accumulate more DNA aberrations than younger, even when the allelic distribution in both groups of age did not differ. In that case, the increased cancer incidence observed in the last decades of life could not be not only conditioned by the inherited

DNA ability, but by the ageing process itself, which could implicate epigenetic silencing of repairing genes.

5.1.2.2. Cases Group

In our study, women carrying the XPD751Lys/Lys genotype have been diagnosed with breast cancer later than those with the Lys/Gln or Gln/Gln genotypes (65.5 vs 58.5 and 58, respectively), $p=0.001$, $OR=3.52$ (CI95% 3-5.44). When stratified by menstrual status, Lys/Lys is more frequent in the women diagnosed in the menopause while Lys/Gln and Gln/Gln is more common in premenopausal patients ($p=0.023$). Previous studies have demonstrated that XPD751Gln presents a decreased DNA repair ability, but increases breast cancer risk very modestly ($OR=1.05$). It is possible that XPD751Gln enhance other damaging factors by not contributing to repair the lesions these could cause and so, many other elements have to concur to observe an increment in breast cancer risk associated to XPD751Gln. The same reasoning is applicable to XRCC1399Arg and XRCC3241Thr, as in our sample these alleles are more frequent in the patients with a later diagnosis, but the difference is not statistically significant.

To our knowledge, this is the first study comparing DNA repair genes allelic distribution according to the age of breast cancer diagnosis and contradicts some of the previous studies that analyze the allelic distribution according to the menstrual status at diagnosis. Nevertheless, Silva et al have taken in account the length of the fertile period while the others only dichotomize the patients in pre or postmenopausal, in spite of using a term that refers to estrogens presence and effect. As they do not take in consideration the period of exposition to estrogens, they are only setting an arbitrary cut-off for the analysis around 45-55 years, when the menopause usually occurs. Many factors that affect breast cancer risk concur with the estrogens exposition, including the aging process itself. Hence, we think that unless all these risk and confounding factors are considered for the analysis, it could be more accurate to compare the median age at diagnosis for each allele instead of comparing the allelic distribution in pre and postmenopausal patients.

5.2. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln and XPDlys751Gln in the cohort of breast cancer patients

This second part is a retrospective cohort study of outcome following radiotherapy and chemotherapy (anthracycline based) in breast cancer patients.

We are aware of our study weaknesses, such as the sample size, a possible selection bias in the case group, and the lack of some clinical data (e.g. HER2 amplification in 27% of patients). We neither compared the germline with the tumor genotype, but to our knowledge, but majority of reviewed pharmacogenomic studies have not done it either. Even though the statistical power of our study could be insufficient to obtain definitive conclusions, it could be considered an exploratory one.

5.2.1. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln and XPDlys751Gln and radiotherapy

Therapeutic exposure to ionising radiation can induce normal tissue side effects that differ among individuals. Age, body mass index, breast size or tobacco, are some of the factors related to skin toxicity following RT, but a genetic predisposition has also been reported. Persons with very compromised DNA repair capacity, have increased mutation rates, genomic instability and an increased risk of cancer, but in some cases, they also present with an increased sensitivity to RT. Nevertheless, even healthy individuals differ in intrinsic capacity to DNA damage repair, and this variation could be a result of polymorphic variations in genes involved in repair pathways. In fact, several common variants in these genes have been reported to significantly contribute to the amount of unrepaired DNA damage that result in an increase of genetic aberrations and clinical outcomes, such as side toxicity.

Nowadays, radiogenomics is one of the emerging fields of research that focuses on the study of genetic variations as an explanation of interindividual differences in response to accidental and therapeutic radiation exposure. Even when major advances have been introduced in RT treatments to decrease toxicity, 10% of patients who receive it still develop severe side effects. The identification of genetic variants associated with decreased DNA repair is important as they could

be used as biomarkers to predict the normal tissue response to radiotherapy and avoid, or at least decrease, RT side effects.

We have not found any significant association of XRCC1Arg399Gln, XRCC3Thr241Met and XPDlys751Gln with the occurrence of RT induced acute and late cutaneous side effects, which is in consonance with other authors. Up to date, no association of XPDlys751Gln with RT side effects has been reported, while both alleles of XRCC3Thr241Met have been related to fibrosis, although majority of studies were negative. On the other hand, many functional studies have shown that cells with the XRCC1 399Gln allele are more sensitive to ionising radiation than those with the Arg allele, and for that reason, this polymorphism has widely been studied in relation to RT side effects. Reported results are inconclusive as many studies have been negative, two have associated the Gln variant with an increased risk of side effects and another one has reported the Arg allele as the risk allele.

We also failed in reporting any association between these polymorphisms and local relapse after RT treatment. In our series, only 12 out of 112 patients treated with RT developed a local relapse (10.7%) and is possible that our study lacks of statistical power to detect a difference, if any. On the other hand, up to date, no polymorphism in DNA repair genes has been associated with local relapse after breast cancer treatment.

5.2.2. XRCC3Thr241Met, XRCC1Arg399Gln and XPDlys751Gln in early breast cancer treated with anthracyclines

Anthracyclines were isolated from *Streptomyces peucetius* in the 1960's and have been used for more than 40 years to treat different types of solid tumours, lymphoma and leukaemia. Its mechanisms of action have not been completely elucidated but include topoisomerase II inhibition, lipid peroxidation, reactive oxygen species generation, DNA intercalation and formation of cross-links and adducts. Majority of these processes led to DNA double strand break and consequently, induce apoptosis. DNA repair is substantial for cells survival, but repair of lesions produced by cytotoxic agents could be a mechanism of resistance to these drugs. On the contrary, cells with deficient DNA repair systems could be more sensible to certain forms of chemotherapy.

Identification of the specific mechanisms that repairs the lesions induced by different chemotherapy drugs could be very helpful for tailoring treatments.

As anthracyclines induce double strand break, Homologous Recombination should be principal in determining sensitivity to these drugs. Spencer and Saffi reported that XRCC3 deficient cells are 6 times more sensible to doxorubicine and 100 times more sensible to barminomicine. They also reported a similar result in those cells with a *XPD* deficiency. This was unexpected, as *XPD* is involved in NER but had not been reported to take part in DSB repair. No difference was seen for cells with a XRCC1 deficiency. These studies were conducted in cells with deleterious mutations of XRCC3, XRCC1 and *XPD*, but have not been repeated in cells carrying different alleles of polymorphic variants.

In our sample, early breast cancer patients carrying the XRCC3 241 Met/Met genotype presented better outcome than those with the Met/Thr or Thr/Thr genotypes. When the group of 150 patients is analyzed without stratifying by type of chemotherapy, a difference in OS is observed ($p=0.002$) but XRCC3Thr241Met fails as an independent prognostic factor in the multivariate analysis ($p=0.09$). On the contrary, when patients are stratified by treatment and only those who received anthracyclines are included, the difference in OS is statistically significant ($p=0.027$) and XRCC3Thr241Met remains as an independent prognostic factor in the multivariate analysis (Log Rank $p=0.05$, HR=0.15 (CI95% 0.02-0.9). In this subgroup of patients, XRCC3 241Met/Met was also associated to better DFS in the univariate analysis ($p=0.049$), but failed in the multivariate. When patients who also received taxanes were excluded ($n=65$), those with the Met/Met genotype presented again with better OS ($p=0.038$), but the polymorphism was not confirmed as independent prognostic factor in the multivariate analysis. In summary, XRCC3 Thr241Met could be an independent prognostic factor for anthracyclines based chemotherapy in early breast cancer.

We have not observed any association between *XPD*Lys751Gln and OS or DFS in early breast cancer patient. On the contrary, we have found that early breast cancer patients who received anthracyclines and carried the XRCC1399Arg/Arg genotype presented a more prolonged DFS than those with the other genotypes ($p=0.022$). XRCC1Arg299Gln was confirmed as an independent prognostic factor in the multivariate analysis (Log Rank $p=0.035$, HR 0.4, CI95% 0.2-0.9), but not when the patients treated with taxanes are excluded. These different results could be

due to the sample size reduction in the second analysis. It is also possible that the first result is mistaken, as the functional studies in culture cells do not support it either, but Bewick et al reported similar results in metastatic breast cancer patients treated with mitoxantrone.

We have exhaustively reviewed the literature, and we could not find any study analyzing XRCC3 Thr241Met, XRCC1 Arg399Gln and XPD Lys750Gln in early breast cancer patients treated with anthracyclines. Only Bewick et al analyzed these variants in 95 metastatic breast cancer patients who received mitoxantrone. They reported that XRCC3 241Met and XRCC1 399Gln, the alleles with decreased DNA repair ability, were associated with worse outcome. They do not offer any explanation or hypothesis, even when these results are opposite to those expected.

Rodriguez et al has recently reported a gene expression signature of DNA repair genes that predicts tumor response to anthracyclines in triple negative breast cancer. Tumors with decreased expression of these DNA repair genes presented a higher rate of pathological complete responses after neoadjuvant treatment with anthracyclines than those with normal expression. Nevertheless, XRCC3, XRCC1 and XPD have not been included in this signature.

There is only one more study analyzing these polymorphisms in patients treated with anthracyclines based chemotherapy. Berwick et al failed to report any association in 120 soft tissue sarcoma cases, although these results must be cautiously considered as some patients received treatment with anthracyclines while others received only local treatment with surgery \pm RT and there was no stratification by treatment for the survival analysis.

Many authors have studied these genetic variations in lung and head and neck cancer patients treated with platinum salts. Platins also produce double strand break and those patients with XRCC3 241Met/Met, XRCC1 399Gln/Gln or XPD751Gln/Gln might be more sensitive to these drugs and present better outcome than those with other genotypes. XRCC3Thr241Met has already been found to be an independent determinant of favourable survival in Non Small Lung Cancer and Head and Neck patients treated with cisplatin.

These studies and our current data further support the urgent need for incorporating DNA repair pharmacogenomic studies in order to better tailoring breast cancer treatment strategies.

6. CONCLUSIONS

1. XRCC1 399Gln/Gln and Agl/Arg genotypes are more frequent in breast cancer patients than in controls, suggesting that the Gln allele might be associated to an increased risk of breast cancer.
2. In breast cancer patients, XPD751Lys/Lys is associated with older age at diagnosis than in those with the Lys/Gln and Gln/Gln genotypes. This difference could be related with a proficient DNA repair ability, but it is also possible that XPD751Lys modulates other risk factors.
3. In our series, XRCC1Arg399Gln, XRCC3Thr241Met and XPDLys751Gln are not associated with acute or late cutaneous toxicity following radiotherapy treatment for breast cancer.
4. In our series, XRCC3Thr241Met y XRCC1Arg399Gln are associated to different outcome in early breast cancer patients, probably in relation with the ability to repair DNA double strand breaks secondary to anthracyclines. These polymorphisms might be predictive of survival outcome and could have farmacogenomic implications to better choose the most adequate treatment for breast cancer patients in early stages.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Boniol M, Heanue M, Colombert M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 18:581-92, 2007
2. Parkin DM, Ferlay J, Suarez B: Cancer Incidence in Five Continents. IARC CancerBase N°7, 2005
3. Thümmeler K, Kirch W: Data and Information on Women's Health in the European Union. Germany, Directorate General for Health and Consumers, 2010
4. López-Avente G, Pollán M., Aragonés N., et al: La situación del cáncer en España, Centro Nacional de Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2009
5. Ferlay J, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase N°5. Version 2.0, 2004
6. Botha JL, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 39:1718-19, 2003
7. Verdecchia A, Brenner H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-2002 period analysis of EURO-CARE-4 data. *Lancet Oncol* 8:784-96, 2007
8. Autier P, Boniol M, LaVecchia C, et al. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *Bmj* 341:c3620
9. de Vita V, Rosenberg S et al. *Cancer: Principles and practice of Oncology* (ed 8th). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2008
10. Liehr JG. Dual role of oestrogens as hormones and pro-carcinogens: tumour initiation by metabolic activation of oestrogens. *European Journal Cancer Prevention* 6:3-10, 1997
11. Raftogianis R. CC, and Weinshilboum R. Estrogen metabolism by conjugation. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 27:113-124, 2000
12. Ross J. HG, et al: *Molecular oncology of breast cancer*. Sudbury, Mayo, 2005
13. Brinton LA, Williams RR, Hoover RN, et al. Breast cancer risk factors among screening program participants. *J Natl Cancer Inst* 62:37-44, 1979
14. Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, et al. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med* 331:5-9, 1994
15. Dumitrescu RG. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *NJournal Cellular and Molecular Medicine* 9:208-21, 2005
16. Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, et al: Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 330:81-7, 1994
17. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-27, 2003
18. Brinton LA, Richesson D, Leitzmann MF, et al. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:3150-60, 2008
19. Marchbanks PA, Wilson HG et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine* 346:2025-32, 2002

20. McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: Can risk be modified? *The Oncologist* 8:326-334, 2003
21. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, et al. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol* 11:530-42
22. Armstrong D. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *International Journal of Cancer* 15:617-631, 1975
23. Willet W. Diet and Cancer. *The Oncologist* 5:393-404, 2000
24. Hunter DJ, Adami HO, et al. Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer—a pooled analysis. *New England Journal of Medicine* 334:356-361, 1996
25. Fung TT, Hu FB, Holmes MD, et al. Dietary patterns and the risk of postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer* 116:116-21, 2005
26. Agurs-Collins T, Rosenberg L, Makambi K, et al. Dietary patterns and breast cancer risk in women participating in the Black Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 90:621-8, 2009
27. Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, et al. Premenopausal dietary carbohydrate, glycemic index, glycemic load, and fiber in relation to risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1153-8, 2003
28. Horn-Ross PL, Canchola AJ, West DW, et al. Patterns of alcohol consumption and breast cancer risk in the California Teachers Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:405-11, 2004
29. Band RP, Fang R, Deschamps M. Carcinogenic and endocrine disrupting of cigarette smoke and risk of breast cancer. *Lancet* 360:1044-49., 2002
30. Cruz Hernández JJ. Cáncer de mama, in Sidonia N (ed): *Lecciones de Oncología Clínica* (ed 2ª). Madrid, 2004
31. Boyd NF, Jong RA, et al. Quantitative classification of mammographic densities and breast cancer risk: results from the Canadian National Breast Screening Study *Journal of National Cancer Institute* 87:670-675, 1995
32. Harvey JA. Quantitative assessment of mammographic breast density: relationship with breast cancer risk. *Radiology* 230:29-41, 2004
33. Cummings SR, Tice JA, Bauer S, et al. Prevention of breast cancer in postmenopausal women: approaches to estimating and reducing risk. *J Natl Cancer Inst* 101:384-98, 2009
34. Brisson J, Sadowsky NL et al. Mamographic features of the breast and breast cancer risk. *American Journal of Epidemiology* 115:428-437, 1982
35. Collaborative group on hormonal factors in breast cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *The Lancet* 358:1389-99, 2001
36. Ronckers CM, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of the current evidence. *Breast Cancer Research* 7:21-32, 2005
37. Brody JG. MK, Humblet O, et al. Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer* 109:2667-711, 2007

38. Clapp RW, Jacobs MM, Loechler EL: Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health* 23:1-37, 2008
39. Broca P. *Traite des tumeurs*. Paris, Asselin, 1866
40. Claus EB, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 73:643-51, 1994
41. Haites N. Overview of the clinical genetics of breast cancer, in Morrison P. HS, and Haites N (ed): *Familial breast and ovarian cancer*. Cambridge, Cambridge University Press, 2002, pp 6-21
42. Hodgson S, Eng C, and Maher E. Reproductive system, in Hodgson S (ed): *A practical guide to human cancer genetics*. Cambridge, Cambridge University Press, 2007, pp 67-85
43. Penrose LS, Karn MN. A genetic study of human mammary cancer. *Annals of Eugenics* 14:234-266, 1948
44. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266:66-71, 1994
45. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378:789-92, 1995
46. Balmain A. GJ, and Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics* 33:238-244, 2003
47. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343:78-85, 2000
48. Pharoah PD, Bobrow M, et al. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nature Genetics* 31:33-36, 2002
49. Peto J. Breast cancer susceptibility-A new look at an old model. *Cancer Cell* 1:411-2, 2002
50. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81:1879-86, 1989
51. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 23:1111-30, 2004
52. Costantino JP, Gail MH, Pee D, et al. Validation studies for models projecting the risk of invasive and total breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 91:1541-8, 1999
53. Rockhill B, Spiegelman D, Byrne C, et al. Validation of the Gail et al. model of breast cancer risk prediction and implications for chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 93:358-66, 2001
54. Gail MH. Value of adding single-nucleotide polymorphism genotypes to a breast cancer risk model. *J Natl Cancer Inst* 101:959-63, 2009
55. Gail MH, Mai PL. Comparing breast cancer risk assessment models. *J Natl Cancer Inst* 102:665-8
56. Jacobi CE, de Bock GH, Siegerink B, et al. Differences and similarities in breast cancer risk assessment models in clinical practice: which model to choose? *Breast Cancer Res Treat* 115:381-90, 2009

57. Claus EB, Risch NJ, Thompson WD. Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 131:961-72, 1990
58. Parmigiani G, Berry D, Aguilar O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 62:145-58, 1998
59. Antoniou AC, Pharoah PP, Smith P, et al. The BOADICEA model of genetic susceptibility to breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 91:1580-90, 2004
60. Boughey JC, Hartmann LC, Anderson SS, et al. Evaluation of the Tyrer-Cuzick (International Breast Cancer Intervention Study) model for breast cancer risk prediction in women with atypical hyperplasia. *J Clin Oncol* 28:3591-6
61. Alberts B, Bray D, Lwis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. El núcleo celular, in Omega (ed): *Biología Molecular de la célula* (ed 3ª). Barcelona, 1996, pp 258-265
62. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-52, 2000
63. Castro E, Bellido L. Tumores Basal-Like. Mucho más que triple Negativo. *Translational Oncology Reviews* 4:16-25, 2008
64. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours. a critical review. *Histopathology* 52:108-18, 2008
65. Rakha E, Ellis I, Reis-Filho J. Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clin Cancer Res* 14:618; author reply 618-9, 2008
66. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* 26:2568-81, 2008
67. Irvin WJ, Jr., Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* 44:2799-805, 2008
68. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5367-74, 2004
69. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999-2009, 2002
70. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al: Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 19:264-71, 2006
71. Savage K, Lambros MB, Robertson D, et al: Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res* 13:90-101, 2007
72. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, et al. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol* 20:474-81, 2007
73. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, et al. Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. *J Clin Pathol* 60:1006-12, 2007
74. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, et al. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 25:2273-84, 2006

75. Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, et al. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15901-5, 2003
76. Bueno-de-Mesquita JM, Linn SC, Keijzer R, et al. Validation of 70-gene prognosis signature in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 117:483-95, 2009
77. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10393-8, 2003
78. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 109:25-32, 2007
79. Hanahan D. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000
80. Osborne C., Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer. Potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist* 9:361-377, 2004
81. Knowles M. Oncogenes, in Selby Ka (ed): *Cellular and molecular biology of cancer* (ed 4). Oxford, Oxford University Press, 2005, pp 117-134
82. Laín S. Tumour suppressor genes, in P. Kmas (ed): *Cellular and molecular biology of cancer* (ed 4). Oxford, Oxford University Press, 2005, pp 135-155
83. Hodgson S, Eng C, and Maher E. Genetic counselling in a familial cancer clinic, in Hodgson S, Eng C, and Maher E (eds): *A practical guide to human cancer genetics*. Cambridge, Cambridge University Press, 2007, pp 3-9
84. Lallo F. How to evaluate a family history, Risk assessment and management in cancer genetics (ed 1st). Oxford, Oxford University Press, 2005
85. Wooster R, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378:789-792, 1995
86. Haites N. Overview of the clinical genetics of breast cancer, in Morrison P. HS, and Haites N., (ed): *Familial breast and ovarian cancer*. Cambridge, Cambridge University Press, 2002, pp 6-21
87. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 62:676-89, 1998
88. Milne RL, Osorio A, Cajal TR. The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clinical Cancer Research* 14:2861-9, 2008
89. Wang X, Pankratz VS, Fredericksen Z, et al. Common variants associated with breast cancer in genome-wide association studies are modifiers of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Hum Mol Genet*
90. Houlston RS, Tomlinson IP. Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead. *J Med Genet* 37:161-7, 2000
91. Eeles R. *Genetic predisposition to cancer*, (ed 2nd). London, Arnold, 2004
92. Easton D, Dunning A, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447:1087-1093, 2007

93. Smith T, Freimanis R, et al. Poligenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. *Carcinogenesis* 29:2132-2138, 2008
94. Balmain A, Gray J, and Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics* 33:238-244, 2003
95. Pharoah PD, Easton D, et al. Polygenes, risk prediction and targeted prevention of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 358:2796-803, 2008
96. Easton DF, Eeles RA. Genome-wide association studies in cancer. *Hum Mol Genet* 17:R109-15, 2008
97. Wacholder S, Hartge P, Prentice R, et al. Performance of common genetic variants in breast-cancer risk models. *N Engl J Med* 362:986-93
98. Kruglyak L and Nickerson DA. Variations is the spice of life. *Nature Genetics* 27:234-236, 2001
99. Strachan T. *Human Molecular Genetics*. Oxford, BIOS scientific, 1996
100. Newton-Cheh C, Hirschhorn J. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutation Research* 573:54-69, 2005
101. Wooster R, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378:789-792, 1995
102. Shen MR, Mohrenweiser H. Nonconservative Amino Acid Substitution Variants Exist at Polymorphic Frequency in DNA Repair Genes in Healthy Humans. *Cancer Research* 58:604-608, 1998
103. Gonzalez-Neira AR, Osorio A, et al. Genomewide high-density SNP linkage analysis of non BRCA1/2 breast cancer identifies various candidate regions and has greater power than microsatellite studies. *BMC Genomics* 8:299, 2007
104. Milne RL, Ribas G, et al. Evaluating new candidate SNPs as low penetrance risk factors in sporadic breast cancer: A two-stage Spanish case-control study. *Gynecological oncology* 112:210-214, 2009
105. Friedberg E. How Nucleotide excision repair protects against Cancer. *Nature reviews in Cancer*. 1:22-23, 2001
106. Ford BN, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 21:1977-1981., 2000
107. Wood RD, Sgouros J, and Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science*. 291:1284-1289., 2001
108. Hoeijmakers J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374, 2001
109. Kolodner R. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics & Development*. 9:89-96, 1999
110. Hanawalt PC, Ford JM, Lloyd DR. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. *Mutation Research* 544:107-114, 2003
111. Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 10:144-150, 2000

112. Modrich P. Strand-specific mismatch Repair in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:24727-24730, 1997
113. Hsieh P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutation Research* 486:71-87, 2001
114. Bronner CE, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 368:258-261, 1994
115. Eshleman JR, Marcowitz SD. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Current Opinion in Oncology* 7:83-89, 1996
116. Li G. DNA Mismatch Repair: Biological functions and molecular mechanisms, in Wei Q, and Chen D, (ed): *DNA repair, genetic instability and cancer*. London, World Scientific, 2007, pp 87-117
117. Lindahl T, Wood RD. DNA excision repair pathways. *Current Opinion in Genetics & Development*. 7:158-169, 1997
118. Lindahl T. Quality control by DNA Repair. *Science* 286, 1999
119. Haber J. Partners and Pathways repairing a double-strand break. *Trends in Genetics* 16:259-264, 2000
120. Sonoda E, Saberi A, Taniguchi Y, and Takeda S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA repair* 5:1021-1029, 2006
121. Shen Z, Nickoloff J. Mammalian homologous recombination repair and cancer intervention, in Wei Q, Chen D (ed): *DNA repair, genetic instability and cancer* London, World Scientific, 2007, pp 119-156
122. Mimitou EP, Symington LS. DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* 8:983-95, 2009
123. Jackson S. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-696, 2002
124. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* 77:229-57, 2008
125. Li L. Nucleotide Excision Repair, in Wei Q, Chen D (ed): *DNA repair, genetic instability and cancer*. London, World Scientific, 2007, pp 63-85
126. Hoeijmakers JH. TFHIIH: a key component in multiple DNA transactions. *Current Opinion in Genetics & Development* 6: 26-33, 1996
127. Laat WL, and Hoeijmakers J. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes and development* 13:768-785, 1999
128. De Boer J, Hoeijmakers J. Nucleotide excision repair and human syndroms. *Carcinogenesis* 21:453-360, 2000
129. Hang B. Base Excision Repair, in Wei Q. LL, and Chen D., (ed): *DNA repair, genetic instability and cancer*. London, World Science, 2007, pp 23-64
130. Ladiges WC. Mouse models of XRCC1 DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene* 25:1612-1619, 2006

131. Chen D, Yu Z, Zhu Z, et al. E2F1 regulates the base excision repair gene XRCC1 and promotes DNA repair. *J Biol Chem* 283:15381-9, 2008
132. Tebbs RS, Flannery ML, Meneses JJ, et al. Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol* 208:513-29, 1999
133. Shen MR, Zdzienicka MZ, Mohrenweiser H, et al. Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair. *Nucleic Acids Res* 26:1032-7, 1998
134. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, et al. Conformational effects of a common codon 399 polymorphism on the BRCT1 domain of the XRCC1 protein. *Protein J* 26:541-6, 2007
135. Duell EJ, Cheng TJ, Varkonvi A, Zuo ZF, Ashok TD, Mark EJ, Wain JC, Cristiani DC, Kelse KT. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 21:965-971, 2000
136. Matullo G, Palli D, Peluso M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 22:1437-45, 2001
137. Saadat M, Ansari-Lari M. Polymorphism of XRCC1 (at codon 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures. *Breast Cancer Res Treat* 115:137-44, 2009
138. Saadat M, Kohan L, Omidvari S. Genetic polymorphisms of XRCC1 (codon 399) and susceptibility to breast cancer in Iranian women, a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* 111:549-53, 2008
139. Hu Z, Ma H, Chen F, et al. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1810-8, 2005
140. Hu JJ, Smith TR, Miller MS, et al: Genetic regulation of ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Environ Mol Mutagen* 39:208-15, 2002
141. Li H, Ha TC, Tai BC: XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk in different populations: a meta-analysis. *Breast* 18:183-91, 2009
142. Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, et al: XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell* 1:783-93, 1998
143. Brenneman MA, Weiss AE, Nickoloff JA, et al: XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat Res* 459:89-97, 2000
144. Schild D, Lio YC, Collins DW, et al: Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem* 275:16443-9, 2000
145. Henry-Mowatt J, Jackson D, Masson JY, et al: XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes. *Mol Cell* 11:1109-17, 2003
146. Nagaraju G, Hartlerode A, Kwok A, et al: XRCC2 and XRCC3 regulate the balance between short- and long-tract gene conversions between sister chromatids. *Mol Cell Biol* 29:4283-94, 2009
147. Xu ZY, Loignon M, Han FY, et al: Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 314:495-505, 2005

148. Alsbeih G, El-Sebaie M, Al-Harbi N, et al: Radiosensitivity of human fibroblasts is associated with amino acid substitution variants in susceptible genes and correlates with the number of risk alleles. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68:229-35, 2007
149. Griffin CS: Aneuploidy, centrosome activity and chromosome instability in cells deficient in homologous recombination repair. *Mutat Res* 504:149-55, 2002
150. Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, et al: Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6354-8, 1995
151. Au WW, Salama SA, Sierra-Torres CH: Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect* 111:1843-50, 2003
152. Krupa R, Synowiec E, Pawlowska E, et al: Polymorphism of the homologous recombination repair genes RAD51 and XRCC3 in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 87:32-5, 2009
153. Han S, Zhang HT, Wang Z, et al: DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies. *Eur J Hum Genet* 14:1136-44, 2006
154. Manuguerra M, Karagas M, et al. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide Polymorphisms and the risk of cancer: a HuGe review. *American Journal of Epidemiology* 164:297-302, 2006
155. Garcia-Closas M, Newcomb P, et al. Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and risk of breast cancer: two population-based studies in USA and Poland and meta-analyses. *Human Genetics*, 2006
156. de las Penas R. S-RM, Alberola V, et al. Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine treated non-small cell lung cancer patients. *Annals of Oncology* 17:668-675, 2006
157. Bewick MA, Conlon MS, Lafrenie RM: Polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and CCND1 and survival after treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 24:5645-51, 2006
158. Farnebo L, Jedlinski A, Ansell A, et al: Proteins and single nucleotide polymorphisms involved in apoptosis, growth control, and DNA repair predict cisplatin sensitivity in head and neck cancer cell lines. *Int J Mol Med* 24:549-56, 2009
159. Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, et al: The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J* 13:2388-92, 1994
160. Andreassen J, Wit J, et al. An Xpd mouse model for the combined xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome exhibiting both cancer predisposition and segmental progeria. *Cancer Cell* 10:121-132, 2006
161. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85:1101-11, 2003
162. Clarkson SG, Wood RD. Polymorphisms in the human XPD (ERCC2) gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: an appraisal. *DNA Repair (Amst)* 4:1068-74, 2005
163. Broughton BC, Steingrimsdottir H, Lehmann AR. Five polymorphisms in the coding sequence of the xeroderma pigmentosum group D gene. *Mutat Res* 362:209-11, 1996

164. Monaco R, Rosal R, Dolan MA, et al. Conformational effects of a common codon 751 polymorphism on the C-terminal domain of the xeroderma pigmentosum D protein. *J Carcinog* 8:12, 2009
165. Lunn R, Parsahd R, Umbach D, Harris E, Sanford K, Bell A. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 4:551-555, 2000
166. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 25:757-63, 2004
167. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4, 1985
168. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-50, 1987
169. Kubista M, Bengtsson M, et al. The real time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27:95-125, 2006
170. Higuchi R, Dolling G, Watson R. PCR-analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026-1030, 1993
171. Ma H, Chen G, Quiao T, Chuang M. Application of real-time polymerase chain reaction. *The Journal of American Science* 2:1-15, 2006
172. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, et al. Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* 75:1318-23, 1997
173. Kataja V, Castiglione M. Primary breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4:10-4, 2009
174. Fisher B, Anderson S, Tan-Chiu E, et al. Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. *J Clin Oncol* 19:931-42, 2001
175. Levine MN, Bramwell VH, Pritchard KI, et al. Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 16:2651-8, 1998
176. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, et al: Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol* 123:21-7, 2005
177. De Maeyer L, Van Limbergen E, De Nys K, et al: Does estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast carcinoma exist? *J Clin Oncol* 26:335-6; author reply 336-8, 2008
178. Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, et al: Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer* 83:83-90, 1999
179. Gatti RA: The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* 40:702-11, 2001

180. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, et al: Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr*:96-102, 2001
181. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U: Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer* 41:1170-8, 1978
182. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, et al: Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 11:2090-100, 1993
183. Bloom HJ, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11:359-77, 1957
184. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, et al: Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 64:1914-21, 1989
185. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al: Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 6:1076-87, 1988
186. Crowe JP, Hubay CA, Pearson OH, et al: Estrogen receptor status as a prognostic indicator for stage I breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2:171-6, 1982
187. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-12, 1989
188. Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al: HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 10:599-605, 1992
189. Andrulis IL, Bull SB, Blackstein ME, et al: neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 16:1340-9, 1998
190. Florez: *Farmacologia Humana* (ed 3). Barcelona, 1999
191. Martin M, Pienkowski T, Mackey J, et al: Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* 352:2302-13, 2005
192. Mamounas EP, Bryant J, Lembersky B, et al: Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol* 23:3686-96, 2005
193. Hirschhorn JN, Daly MJ: Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6:95-108, 2005
194. Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, et al: Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 29:306-9, 2001
195. Cardon LR, Bell JI: Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2:91-9, 2001

196. Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A, Currie D, et al: Polymorphisms in XPC and ERCC2 genes, smoking and breast cancer risk. *Int J Cancer* 122:2101-5, 2008
197. Lee SA, Lee KM, Park SK, et al: Genetic polymorphism of XRCC3 Thr241Met and breast cancer risk: case-control study in Korean women and meta-analysis of 12 studies. *Breast Cancer Res Treat* 103:71-6, 2007
198. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, et al: XPD common variants and their association with melanoma and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 98:209-15, 2006
199. Patel AV, Calle EE, Pavluck AL, et al: A prospective study of XRCC1 (X-ray cross-complementing group 1) polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 7:R1168-73, 2005
200. Han J, Haiman C, Niu T, et al: Genetic variation in DNA repair pathway genes and premenopausal breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 115:613-22, 2009
201. Au WW, Navasumrit P, Ruchirawat M: Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes. *Int J Hyg Environ Health* 207:301-13, 2004
202. Vodicka P, Stetina R, Polakova V, et al: Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis* 28:657-64, 2007
203. Synowiec E, Stefanska J, Morawiec Z, et al: Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. *Mutat Res* 648:65-72, 2008
204. Kazimirova A, Barancokova M, Dzapinkova Z, et al: Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutat Res* 661:35-40, 2009
205. Weng H, Morimoto K: Differential responses to mutagens among human lymphocyte subpopulations. *Mutat Res* 672:1-9, 2009
206. Weng H, Weng Z, Lu Y, et al: Effects of cigarette smoking, XRCC1 genetic polymorphisms, and age on basal DNA damage in human blood mononuclear cells. *Mutat Res* 679:59-64, 2009
207. Millikan RC, Player JS, Decotret AR, et al: Polymorphisms in DNA repair genes, medical exposure to ionizing radiation, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2326-34, 2005
208. Figueiredo JC, Knight JA, Briollais L, et al: Polymorphisms XRCC1-R399Q and XRCC3-T241M and the risk of breast cancer at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:583-91, 2004
209. Han J, Hankinson SE, Ranu H, et al: Polymorphisms in DNA double-strand break repair genes and breast cancer risk in the Nurses' Health Study. *Carcinogenesis* 25:189-95, 2004
210. Jacobsen NR, Nexø BA, Olsen A, et al: No association between the DNA repair gene XRCC3 T241M polymorphism and risk of skin cancer and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:584-5, 2003
211. Matullo G, Dunning AM, Guarrera S, et al: DNA repair polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study. *Carcinogenesis* 27:997-1007, 2006

212. Harms C, Salama SA, Sierra-Torres CH, et al: Polymorphisms in DNA repair genes, chromosome aberrations, and lung cancer. *Environ Mol Mutagen* 44:74-82, 2004
213. Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, et al: Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 22:593-7, 2001
214. Ye W, Kumar R, Bacova G, et al: The XPD 751Gln allele is associated with an increased risk for esophageal adenocarcinoma: a population-based case-control study in Sweden. *Carcinogenesis* 27:1835-41, 2006
215. Huang WY, Berndt SI, Kang D, et al: Nucleotide excision repair gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma: XPC polymorphisms modify smoking-related risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:306-11, 2006
216. Seedhouse C, Bainton R, Lewis M, et al: The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood* 100:3761-6, 2002
217. Moreno V, Gemignani F, Landi S, et al: Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:2101-8, 2006
218. Jiang J, Zhang X, Yang H, et al: Polymorphisms of DNA repair genes: ADPR1, XRCC1, and XPD and cancer risk in genetic epidemiology. *Methods Mol Biol* 471:305-33, 2009
219. Li C, Jiang Z, Liu X: XPD Lys(751)Gln and Asp (312)Asn polymorphisms and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 37:301-9
220. Le Morvan V, Longy M, Bonaiti-Pellie C, et al: Genetic polymorphisms of the XPG and XPD nucleotide excision repair genes in sarcoma patients. *Int J Cancer* 119:1732-5, 2006
221. Huang Y, Li L, Yu L: XRCC1 Arg399Gln, Arg194Trp and Arg280His polymorphisms in breast cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis* 24:331-9, 2009
222. Kuschel B, AA, McBride S., Novik L., Antoniou A., Lipscombe J., Day N., Easton D., Ponder B., Pharoah P., and Dunning A., : Variants in DNA double-strand break repair genes and breast cancer susceptibility. *Human Molecular Genetics* 11, 2002
223. Economopoulos KP, Sergentanis TN: XRCC3 Thr241Met polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 121:439-43
224. Kuschel B, Chenevix-Trench G, Spurdle AB, et al: Common polymorphisms in ERCC2 (Xeroderma pigmentosum D) are not associated with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1828-31, 2005
225. Brewster AM, Jorgensen TJ, Ruczinski I, et al: Polymorphisms of the DNA repair genes XPD (Lys751Gln) and XRCC1 (Arg399Gln and Arg194Trp): relationship to breast cancer risk and familial predisposition to breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 95:73-80, 2006
226. Shen J, Desai M, Agrawal M, et al: Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and DNA repair capacity phenotype in sisters discordant for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1614-9, 2006
227. Costa S, Pinto D, Pereira D, et al: XRCC1 Arg399Gln and RAD51 5'UTR G135C polymorphisms and their outcome in tumor aggressiveness and survival of Portuguese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 109:183-5, 2008

228. Jorgensen TJ, Visvanathan K, Ruczinski I, et al: Breast cancer risk is not associated with polymorphic forms of xeroderma pigmentosum genes in a cohort of women from Washington County, Maryland. *Breast Cancer Res Treat* 101:65-71, 2007
229. Rajaraman P, Bhatti P, Doody MM, et al: Nucleotide excision repair polymorphisms may modify ionizing radiation-related breast cancer risk in US radiologic technologists. *Int J Cancer* 123:2713-6, 2008
230. Jiang Z, Li C, Xu Y, et al: Associations between XPD polymorphisms and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*
231. Andressoo JO, Hoeijmakers JH, Mitchell JR: Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell Cycle* 5:2886-8, 2006
232. Kirkwood TB: Understanding the odd science of aging. *Cell* 120:437-47, 2005
233. Hughes KA, Reynolds RM: Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu Rev Entomol* 50:421-45, 2005
234. Martin GM: Modalities of gene action predicted by the classical evolutionary biological theory of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1100:14-20, 2007
235. Hoeijmakers JH: DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361:1475-85, 2009
236. Arai T, Sawabe M, Hosoi T, et al: Role of DNA repair systems in malignant tumor development in the elderly. *Geriatr Gerontol Int* 8:65-72, 2008
237. Polosak J, Roszkowska-Gancarz M, Kurylowicz A, et al: Decreased expression and the Lys751Gln polymorphism of the XPD gene are associated with extreme longevity. *Biogerontology* 11:287-97
238. Silva SN, Moita R, Azevedo AP, et al: Menopausal age and XRCC1 gene polymorphisms: role in breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 31:303-9, 2007
239. Sram RJ, Beskid O, Binkova B, et al: Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms. *Mutat Res* 620:22-33, 2007
240. Perez-Cadahia B, Laffon B, Valdiguésias V, et al: Cytogenetic effects induced by Prestige oil on human populations: the role of polymorphisms in genes involved in metabolism and DNA repair. *Mutat Res* 653:117-23, 2008
241. Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 347:1233-41, 2002
242. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al: Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 347:1227-32, 2002
243. Twardella D, Popanda O, Helmbold I, et al: Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy. *Radiother Oncol* 69:145-53, 2003
244. Popanda O, Ebbeler R, Twardella D, et al: Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55:1216-25, 2003

245. Alsbeih G, Al-Harbi N, Al-Buhairi M, et al: Association between TP53 codon 72 single-nucleotide polymorphism and radiation sensitivity of human fibroblasts. *Radiat Res* 167:535-40, 2007
246. Alsbeih G, Torres M, Al-Harbi N, et al: Evidence that individual variations in TP53 and CDKN1A protein responsiveness are related to inherent radiation sensitivity. *Radiat Res* 167:58-65, 2007
247. Popanda O, Marquardt JU, Chang-Claude J, et al: Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. *Mutat Res* 667:58-69, 2009
248. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, et al: Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 69:127-35, 2003
249. Andreassen CN: Can risk of radiotherapy-induced normal tissue complications be predicted from genetic profiles? *Acta Oncol* 44:801-15, 2005
250. Lilla C, Ambrosone CB, Kropp S, et al: Predictive factors for late normal tissue complications following radiotherapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 106:143-50, 2007
251. Chang-Claude J, Popanda O, Tan XL, et al: Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 11:4802-9, 2005
252. Chang-Claude J, Ambrosone CB, Lilla C, et al: Genetic polymorphisms in DNA repair and damage response genes and late normal tissue complications of radiotherapy for breast cancer. *Br J Cancer* 100:1680-6, 2009
253. Popanda O, Tan XL, Ambrosone CB, et al: Genetic polymorphisms in the DNA double-strand break repair genes XRCC3, XRCC2, and NBS1 are not associated with acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1048-50, 2006
254. Sterpone S, Cozzi R: Influence of XRCC1 Genetic Polymorphisms on Ionizing Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J Nucleic Acids* 2010
255. Sterpone S, Cornetta T, Padua L, et al: DNA repair capacity and acute radiotherapy adverse effects in Italian breast cancer patients. *Mutat Res* 684:43-8
256. Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J, et al: ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64:776-83, 2006
257. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J, et al: TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. *Radiother Oncol* 75:18-21, 2005
258. Suga T, Ishikawa A, Kohda M, et al: Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:685-93, 2007
259. Giotopoulos G, Symonds RP, Foweraker K, et al: The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *Br J Cancer* 96:1001-7, 2007
260. Moullan N, Cox DG, Angele S, et al: Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1168-74, 2003

261. Andreassen CN, Alsner J: Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review. *Radiother Oncol* 92:299-309, 2009
262. Ho AY, Atencio DP, Peters S, et al: Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65:646-55, 2006
263. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, et al: Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226:466-8, 1984
264. Gutteridge JM, Quinlan GJ: Free radical damage to deoxyribose by anthracycline, aureolic acid and aminoquinone antitumor antibiotics. An essential requirement for iron, semiquinones and hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 34:4099-103, 1985
265. Sinha BK, Mimnaugh EG, Rajagopalan S, et al: Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells: protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res* 49:3844-8, 1989
266. Bustamante J, Galleano M, Medrano EE, et al: Adriamycin effects on hydroperoxide metabolism and growth of human breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat* 17:145-53, 1990
267. Feinstein E, Canaani E, Weiner LM: Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin. *Biochemistry* 32:13156-61, 1993
268. Griffin-Green EA, Zaleska MM, Erecinska M: Adriamycin-induced lipid peroxidation in mitochondria and microsomes. *Biochem Pharmacol* 37:3071-7, 1988
269. Fukuda F, Kitada M, Horie T, et al: Evaluation of adriamycin-induced lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 44:755-60, 1992
270. Skladanowski A, Konopa J: Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity. *Biochem Pharmacol* 47:2279-87, 1994
271. Skladanowski A, Konopa J: Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. *Biochem Pharmacol* 47:2269-78, 1994
272. Zeman SM, Phillips DR, Crothers DM: Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11561-5, 1998
273. Di Marco A, Silvestrini R, Di Marco S, et al: Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic daunomycin on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells. *J Cell Biol* 27:545-50, 1965
274. Zunino F, Gambetta R, Di Marco A, et al: A comparison of the effects of daunomycin and adriamycin on various DNA polymerases. *Cancer Res* 35:754-60, 1975
275. Gewirtz DA: A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-41, 1999
276. Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, et al: Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 66:4863-71, 2006
277. Patel S, Sprung AU, Keller BA, et al: Identification of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug doxorubicin: implications for the mechanisms of doxorubicin action and cytotoxicity. *Mol Pharmacol* 52:658-66, 1997
278. Moro S, Beretta GL, Dal Ben D, et al: Interaction model for anthracycline activity against DNA topoisomerase II. *Biochemistry* 43:7503-13, 2004

279. Harris LN, Yang L, Liotcheva V, et al: Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res* 7:1497-504, 2001
280. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, et al: retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 23:7483-90, 2005
281. Tanner M, Isola J, Wiklund T, et al: Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. *J Clin Oncol* 24:2428-36, 2006
282. Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, et al: HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 8:1107-16, 2002
283. Harris LN, Broadwater G, Abu-Khalaf M, et al: Topoisomerase II{alpha} amplification does not predict benefit from dose-intense cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil therapy in HER2-amplified early breast cancer: results of CALGB 8541/150013. *J Clin Oncol* 27:3430-6, 2009
284. Jackson SP, Bartek J: The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071-8, 2009
285. Spencer DM, Bilardi RA, Koch TH, et al: DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutat Res* 638:110-21, 2008
286. Saffi J, Agnoletto MH, Guecheva TN, et al: Effect of the anti-neoplastic drug doxorubicin on XPD-mutated DNA repair-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)* 9:40-7
287. De Laurentiis M, Canello G, D'Agostino D, et al: Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 26:44-53, 2008
288. Jones SE, Savin MA, Holmes FA, et al: Phase III trial comparing doxorubicin plus cyclophosphamide with docetaxel plus cyclophosphamide as adjuvant therapy for operable breast cancer. *J Clin Oncol* 24:5381-7, 2006
289. Roche H, Fumoleau P, Spielmann M, et al: Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol* 24:5664-71, 2006
290. Yarosh DB, Pena A, Brown DA: DNA repair gene polymorphisms affect cytotoxicity in the National Cancer Institute Human Tumour Cell Line Screening Panel. *Biomarkers* 10:188-202, 2005
291. Rodriguez AA, Makris A, Wu MF, et al: DNA repair signature is associated with anthracycline response in triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 123:189-96
292. Berwick M, Matullo G, Song YS, et al: Association between aryl hydrocarbon receptor genotype and survival in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 22:3997-4001, 2004

293. Chew HK, Doroshow JH, Frankel P, et al: Phase II studies of gemcitabine and cisplatin in heavily and minimally pretreated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27:2163-9, 2009
294. de las Penas R, Sanchez-Ronco M, Alberola V, et al: Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 17:668-75, 2006
295. Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H, et al: DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 10:118-23, 2009
296. Sun X, Li F, Sun N, et al: Polymorphisms in XRCC1 and XPG and response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 65:230-6, 2009
297. Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, et al: DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J Clin Oncol* 24:4333-9, 2006
298. Ruzzo A, Graziano F, Kawakami K, et al: Pharmacogenetic profiling and clinical outcome of patients with advanced gastric cancer treated with palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* 24:1883-91, 2006
299. Vangsted A, Gimsing P, Klausen TW, et al: Polymorphisms in the genes ERCC2, XRCC3 and CD3EAP influence treatment outcome in multiple myeloma patients undergoing autologous bone marrow transplantation. *Int J Cancer* 120:1036-45, 2007

