

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Cuantificación de miRNAs en suero de mujeres con cáncer de mama y su relación con características clínico-patológicas



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

**Alejandra López Vázquez**

Hermosillo, Sonora

Enero de 2019

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

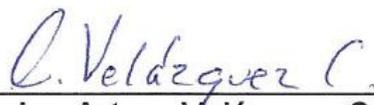
## APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Alejandra López Vázquez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



---

**Dr. Humberto Francisco Astiazarán García**  
Director de tesis



---

**Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras**  
Secretario



---

**Dr. Iván Anduro Corona**  
Sinodal



---

**Dra. Julie Dutil**  
Sinodal

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Experimental del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. y en el Laboratorio de Investigación en Cáncer de la Universidad de Sonora.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante mis estudios.

Al Laboratorio de Investigación en Cáncer de la Universidad de Sonora y al Laboratorio de Patología Experimental del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. y el Laboratorio de Patología Experimental por las facilidades brindadas en sus instalaciones para el desarrollo de mi tesis.

A mi comité sinodal, les agradezco su apoyo y confianza. Al Dr. Iván Anduro por todo su tiempo, paciencia, experiencia, ayuda y guía durante el desarrollo y culminación de mi tesis. Por sus consejos y sabiduría que me brindó. A mi director de tesis, Dr. Humberto Astiazarán por abrirme las puertas de su laboratorio y sobre todo por tener la confianza con la que me permitió desarrollar mi tema de tesis. Al Dr. Carlos Velázquez por todo su apoyo, confianza y brindarme la oportunidad de crecer en mi formación profesional. A la Dra. Julie Dutil por ser una fuente de inspiración, a quien admiro por su trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Fermín Mar Aguilar, Profesor-Investigador de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por recibirme en su laboratorio para una estancia de investigación y enseñarme las técnicas que me permitieron llevar a cabo la metodología del presente estudio, al igual que a la Dra. Diana Reséndez Pérez por sus atenciones durante mi estancia.

A las Instituciones y personal de salud que colaboró facilitando el desarrollo de mi proyecto, agradezco a:

- **Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez”, ISSSTESON**

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Elizabeth Amaya por apoyarme durante el desarrollo de mi tesis, por ser clave en el proceso de reclutamiento y siempre brindarme ayuda en los procesos que en mi estudio se requerían.

Al Dr. Arturo López por su apoyo para la recolección de datos. Los médicos especialistas Dr. Heliodoro González, Dr. Ramses Ortega, Dr. Armando Jaime. A la Dra. Rocío Franco por sus atenciones para facilitar mi acceso durante la recolección de muestras. A Rosa Elena Cordova por toda su amabilidad y atención brindada.

- **Hospital General del Estado de Sonora**

Un gran agradecimiento a los patólogos, Dr. Roberto De León y Dr. Minor Cordero por todo su apoyo, confianza, tiempo y conocimientos brindados desde siempre, mi más profundo respeto y admiración. Les estoy muy agradecida, al igual que a los médicos residentes por todo su apoyo y colaboración: Dra. Karla Navarro, Dra. Dayna Salas, Dr. Luis Roberto Olivas, Dr. David Romo, Dr. Manuel Azuara, QB. Omar Ríos, muchas gracias. Por su amabilidad y orientación dentro de los procesos del hospital, muchas gracias a la Lic. Patricia Camou.

Muchas gracias también al Centro de Patología Avanzada por su colaboración.

- **Centro Estatal de Oncología**

Gracias a la Lic. Sonia Mendoza por su apoyo y disposición para el ayudar en el proceso de reclutamiento. Gracias al personal de archivo por su amabilidad y brindarme facilidades para la revisión de datos clínicos. Muchas gracias a la Dra. Paola Othon y a la Lic. Anahí Meras por todo su apoyo desde la evaluación de mi proyecto hasta su ejecución, especialmente al Dr. Ernesto Rivera Claisse por su calidad humana y siempre disponibilidad para apoyar el desarrollo de investigaciones.

- **Hospital Infantil e Integral de la Mujer**

Gracias a los médicos especialistas y residentes por su apoyo y disponibilidad.

A mis compañeros y amigos de la maestría, por compartir conmigo sus conocimientos, por ser los mejores tutores para aquellas materias que nos robaban el sueño. Los admiro a todos.

Un enorme agradecimiento a la Dra. Jacqueline Zepeda por todo su apoyo, conocimientos y orientación, con un gran corazón y pasión por lo que hace.

Muchas gracias a todos quienes me ayudaron en la toma de muestras, siempre con mucha disposición y apoyo incondicional, gracias Brenda Samaniego, David Ortega, Bertha Isabel Pacheco Moreno, Keyla Acosta y Denia Abril Montes. Muchas gracias Denia por tu apoyo y consejos, admiro tu dedicación y calidad como persona, gracias por tu amistad. A la M.C. Ana Limón, por su amistad y apoyo durante estos años, sus palabras de aliento y sobre todo por escucharme cuando lo he necesitado, mi amiga y compañera Lourdes Valencia por su apoyo en la recolección de muestras.

Gracias a cada una de las personas que con su apoyo y asesorías ayudaron a la culminación de mi trabajo: MC. Consuelo Villegas, Universidad de Sonora, Dr. Humberto González Ríos, CIAD, Dr. Héctor Duarte Tagles.

Gracias a mi familia por todo su amor y apoyo, a mi papá y mamá que siempre me han impulsado en cada paso de mi vida. Gracias Adalberto Navarro por todo tu amor, apoyo y esfuerzo que me han acompañado en el camino de mi trabajo y esas palabras de ánimo que me calmaron en los momentos difíciles.

Mi más profundo agradecimiento a las hermosas mujeres que dentro del difícil camino de la enfermedad, con un gran corazón y deseos de ayudar, me brindaron su confianza al participar en el estudio. Mi trabajo me apasiona porque deseo profundamente poner un granito de arena a los esfuerzos que se hacen a nivel mundial para mejorar el manejo de la enfermedad.

## **DEDICATORIA**

A cada una de las mujeres maravillosas que he tenido oportunidad de conocer en el transcurso de mi trabajo.

Ustedes me inspiran a hacer lo que amo.

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
OBJETIVOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
Generalidades de los miRNAs.....	5
miRNAs en Cáncer de Mama .....	8
miR-145.....	9
miR-155.....	11
miR-181a.....	13
miR-205.....	14
Planteamiento del Problema.....	16
Pregunta de Investigación .....	17
Hipótesis.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Diseño del estudio .....	18
Tamaño de la muestra.....	18
Reclutamiento de Pacientes .....	18
Criterios de Inclusión.....	20
Criterios de Exclusión.....	20
Criterios de Eliminación.....	20
Recolección de Datos Clínicos-Patológicos .....	22
Recolección y procesamiento de muestras .....	23
Extracción de RNA .....	27
Síntesis de cDNA y Cuantificación de miRNAs por qRT-PCR .....	27
Cálculo de la Expresión Relativa de miRNAs.....	28

Análisis Estadístico.....	33
Consideraciones Éticas .....	33
Aprobación del Comité de Ética .....	34
Consentimiento Informado .....	34
Beneficios de la Investigación .....	34
Participantes.....	35
Confidencialidad.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
Datos clínicos y patológicos .....	36
Extracción de RNA .....	41
Evaluación del Control Exógeno cel-miR-39 .....	43
Nivel de Expresión de miRNAs.....	45
Expresión de miRNAs entre Casos y Controles .....	45
Nivel de Expresión vs Grupos de Edad .....	50
Relación de Niveles de Expresión de miRNAs con Características Clínicas- patológicas .....	52
miR-181a.....	52
miR-145.....	56
miR-155.....	57
miR-205.....	59
CONCLUSIONES .....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
APÉNDICES .....	70
Apéndice 1. Consentimiento Informado para Casos .....	70
Apéndice 2. Consentimiento Informado para Controles .....	73
Apéndice 3. Cuestionario de Factores de Riesgo.....	76

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Panel de miRNAs seleccionados, reportados en la literatura con asociación a cáncer de mama y características clínico-patológicas .....	10
<b>Tabla II.</b> Número de nuevos casos de mujeres con cáncer de mama en Hermosillo, 2015 y 2016. ....	19
<b>Tabla III.</b> Descripción de variables en estudio .....	23
<b>Tabla IV.</b> Criterios de clasificación de subtipos moleculares de cáncer de mama por inmunohistoquímica.....	26
<b>Tabla V.</b> Componentes de la reacción de transcripción reversa.....	29
<b>Tabla VI.</b> Parámetros del termociclador para reacción de transcriptasa reversa. ....	29
<b>Tabla VII.</b> Información de iniciadores empleados. ....	30
<b>Tabla VIII.</b> Parámetros para la reacción de PCR en tiempo real .....	30
<b>Tabla IX.</b> Componentes de la reacción para PCR.....	30
<b>Tabla X.</b> Agrupación de pacientes con cáncer de mama y sanas con base en la edad.....	32
<b>Tabla XI.</b> Resumen de características clínicas y patológicas de las pacientes con cáncer de mama. ....	37
<b>Tabla XII.</b> Resultados de concentración e índice de pureza del RNA total extraído de muestras de suero de casos y controles.....	42
<b>Tabla XIII.</b> Índice de cambio (fold change) del panel de miRNAs en suero de pacientes con cáncer de mama .....	46
<b>Tabla XIV.</b> Expresión de miR-181a y relación con características clínico-patológicas.....	55
<b>Tabla XV.</b> Expresión de miR-155 y relación con características clínico-patológicas.....	58

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de estadio clínico de pacientes con cáncer de mama en el estudio. ....	39
<b>Figura 2.</b> Comparación del Ct de cel-miR-39 en pacientes con cáncer de mama, grupo casos y pacientes sanas, grupo controles. ....	44
<b>Figura 3.</b> Expresión de A) miR-181a, B) miR-145, C) miR-155 y D) miR-205, entre casos y controles. ....	47
<b>Figura 4.</b> Niveles de expresión de los miRNAs en estudio por grupos de edad. ....	51
<b>Figura 5.</b> Niveles de expresión de miR-181a por estadio clínico I y II (con valor atípico). ....	54
<b>Figura 6.</b> Niveles de expresión de miR-181a por estadio clínico I y II (sin valor atípico). ....	54

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Cuantificar los niveles de miRNAs en suero de mujeres con cáncer de mama y establecer su relación con características clínicas y patológicas.

### **Objetivos Específicos**

- Cuantificar y comparar los niveles en suero del panel de miRNAs (miR-155, miR-145, miR-181a y miR-205) entre mujeres con diagnóstico de cáncer de mama y mujeres sanas, mediante qRT-PCR
- Evaluar la relación entre los niveles de miRNAs en suero y las características clínico-patológicas del tumor

## RESUMEN

El cáncer de mama es un problema de salud que presenta alta incidencia y mortalidad. Limitaciones en los métodos de detección y complejidad de la enfermedad hacen necesario el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas. Diversos estudios demuestran el potencial de miRNAs, como biomarcador para cáncer de mama, como método diagnóstico menos invasivo, más rápido y que proporciona información sobre la enfermedad. La cuantificación sérica de miRNAs en pacientes con cáncer de mama surge como herramienta potencial en el diagnóstico de la enfermedad. En el presente estudio se cuantificaron, mediante PCR en tiempo real, un panel de miRNAs (miR-181a, miR-145, miR-155, y miR-205) seleccionado de la literatura, en suero de mujeres con cáncer de mama y mujeres sanas, y se exploró la relación entre su expresión con características clínicas y patológicas. El miR-205 presentó diferencias entre pacientes con cáncer de mama y sanas ( $P=0.0009$ ), con baja-expresión en pacientes con la enfermedad. Se observaron diferencias en la expresión de miR-145 ( $P=0.002$ ), miR-155 ( $P=0.004$ ) y miR-205 ( $P=0.04$ ) respecto al grupo de edad. El análisis de medianas de los niveles de expresión (fold change) de miRNAs con relación a las características clínico-patológicas indicó relación entre miR-181a y miR-155 y presencia de invasión linfovascular y ganglios linfáticos involucrados; relación entre miR-181a y estadio clínico, así como miR-181a y miR-145 con el subtipo Luminal A. Los resultados sugieren que el análisis en suero del panel de miRNAs posee potencial para su uso como biomarcador en cáncer de mama, sin embargo, se recomienda aumentar el número de muestras para el análisis de la relación entre expresión y las características clínico-patológicas.

Palabras clave: miRNAs, suero, cáncer de mama, RT-qPCR.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es un problema de salud global, siendo la segunda neoplasia no melanoma más comúnmente diagnosticada, después de cáncer de pulmón. En el 2012, se diagnosticaron 1.7 millones de casos de cáncer de mama (11.9% entre todos los tipos de cáncer) (Stewart y col., 2014). En la Región de las Américas, la Organización Mundial de la Salud, registro en el 2012, aproximadamente 408,000 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y 92,000 mujeres que fallecieron por la enfermedad.

En México, a partir del año 2006, el cáncer de mama desplazó al cáncer cervicouterino para ubicarse como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Se estima una ocurrencia anual de 20,444 casos en mujeres, con una incidencia de 35.4 casos por 100,000 mujeres. En el año 2013, se registraron 5,405 defunciones con una tasa de 16.3 defunciones por 100,000 mujeres. Las entidades con mayor mortalidad por cáncer de mama son Coahuila (24.2), Sonora (22.6) y Nuevo León (22.4) (CNEGSR, 2013).

Se estima que la incidencia y mortalidad del cáncer de mama seguirán aumentando de manera importante debido al envejecimiento poblacional, a los cambios en los patrones reproductivos, a una mayor prevalencia de los factores de riesgo y a los problemas para el acceso oportuno a la detección, el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado (NOM-041-SSA2-2011).

El cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea que puede ser clasificada en 3 subtipos terapéuticos con base en expresión de receptores específicos analizados por pruebas de inmunohistoquímica: receptor de estrógeno (ER) positivo, siendo el grupo más numeroso y diverso, con opción de terapia endocrina; receptor de HER2 amplificado (también llamados ERBB2, factor de receptor de crecimiento epidérmico humano 2), para el cual se emplean terapias de anticuerpos monoclonales; y el grupo denominado triple-negativo

(TNBC, por sus siglas en inglés) también conocido como de tipo basal, los cuales carecen de la expresión de los receptores (ER, PR y HER2), son un grupo con solo opciones quimioterapéuticas y que posee un incremento en la incidencia dentro de pacientes con mutaciones germinales en *BRCA1* o ancestría africana (CGAN, 2012).

En el 2000, Perou y col. analizaron patrones de expresión de genes en cáncer de mama empleando la técnica de microarreglos, con el objetivo de desarrollar un sistema para clasificar tumores con base en su patrón de expresión de genes, reportando asociación entre los subtipos clínicos de cáncer de mama.

Actualmente, con base en técnicas de análisis genético, el cáncer de mama es clasificado dentro de seis subtipos intrínsecos moleculares: luminal A, luminal B, HER2+, tipo normal, basal, y bajo-claudin, los cuales están relacionados con la clasificación clínica y pronóstico de la enfermedad. Los de tipo Luminal son comúnmente dependientes de hormonas (ER y/o PR) y poseen mejor pronóstico. Los de tipo Basal y bajo-Claudin se superponen con el subtipo clínico denominado triple negativo, los cuales poseen el peor pronóstico (Graveel y col., 2015).

Las diferencias en las repuestas al tratamiento de los subtipos tumorales soportan la necesidad clínica de mejorar los análisis predictivos y pronóstico del cáncer de mama. Sin embargo, a la fecha, la clasificación y pronóstico del cáncer de mama se basa principalmente en parámetros clínico-patológicos, tales como tamaño del tumor, grado histológico, estadio, nódulo linfático (LN, por sus siglas en inglés) infiltrado, y propiedades moleculares incluyendo la expresión de ER, PR y HER2 (Tofigh y col., 2014). A pesar del avance en la sub-clasificación clínica y molecular del cáncer de mama, así como la determinación de esquemas de tratamiento y pronóstico para dicha clasificación, la detección oportuna es clave importante para el manejo y pronóstico de la enfermedad.

Actualmente, la mamografía es la herramienta de detección estándar, no invasiva, para cáncer de mama en etapas tempranas, sin embargo, el costo y la experiencia requerida para realizar e interpretar una mamografía ha obstaculizado la amplia aplicación de este procedimiento. Además, posee sensibilidad limitada en su uso en mujeres jóvenes y en mujeres con mamas densas. Por lo anterior, nuevos métodos de detección temprana de mínima invasión son necesarios para suplementar las técnicas actuales. Métodos alternativos como la detección de marcadores tumorales en sangre, tales como CA15.3 y antígeno carcinoembrionario (CEA) empleados en algunos centros de salud, no son específicos y poseen sensibilidad limitada. Por lo que existe una necesidad para desarrollar métodos costo-efectivos, menos invasivos, rápidos y precisos para detección de este cáncer de mama (Ng y col., 2013).

En los últimos años, las investigaciones en busca de marcadores tumorales para detección y diagnóstico de cáncer han tenido gran desarrollo. Entre los candidatos a biomarcadores de cáncer más estudiados se encuentran los microRNAs, también denominados miRNAs, una clase de RNAs no codificantes, que participan en la regulación de la expresión de genes involucrados en procesos tales como proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Los miRNAs han sido identificados en diferentes muestras biológicas, donde se ha observado cambios en su expresión que han sido relacionados con el desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama. Se ha descubierto que ciertos miRNAs son capaces de discriminar entre muestras de pacientes con cáncer de mama y de individuos saludables, ayudan en la estratificación adecuada del tumor, predecir respuesta a tratamientos, riesgo de recurrencia y progresión de la enfermedad, o incluso presentar un nuevo blanco terapéutico (Heneghan y col., 2010).

Actualmente, diversos miRNAs son evaluados para su uso como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y vigilancia del cáncer de mama (Graveel y col., 2015). Recientes estudios de los niveles de expresión de miRNAs en cáncer de mama, han mostrado la existencia de una correlación de los patrones de expresión y la clasificación histopatológica de la enfermedad, así como otras variables clínicas, lo cual aumenta el valor potencial de miRNAs como herramienta para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama. Sin embargo, pocos estudios han evaluado un panel específico de miRNAs con la capacidad de detectar el cáncer de mama y proporcionar información sobre las características clínico-patológicas de la enfermedad para ser implementados en la práctica clínica.

## **ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

### **Generalidades de los miRNAs**

Los miRNAs (microRNAs) son una clase de RNAs endógenos, cortos con una longitud de 17 – 25 nucleótidos, son secuencias que no codifican para proteínas puesto que su función es la regulación de genes a nivel post-transcripcional, y están presentes en animales, plantas y eucariotas unicelulares. El proceso de regulación consiste en la unión de un miRNA con un RNA mensajero (mRNA), mediante complementariedad de bases, de forma tal que inhibe su traducción o provoca su degradación. Los miRNA participan en la regulación de diversos eventos celulares tales como desarrollo, diferenciación, proliferación y apoptosis (Melo y col., 2014).

La biogénesis de los miRNAs se resume a través de una serie de pasos: 1) RNA polimerasa II (o en ocasiones III) transcriben miRNAs en el núcleo como transcritos primarios, denominados pri-miRNA (aprox. 500-3000 nucleótidos); 2) la enzima RNasa Drosha y el gen codificante DGCR8, cortan el pri-miRNA a aprox. 70 nucleótidos y construyen una estructura denominada tallo-horquilla, lo cual da lugar al precursor de miRNA o pre-miRNA. La proteína Exportina 5 transfiere la hebra de pre-miRNA hacia el citoplasma, donde la enzima RNasa denominada Dicer lo corta en un RNA dúplex de 22-nucleótidos. En la mayoría de los casos, la hebra con menor número de bases apareadas en el extremo 5' es el miRNA maduro, mientras que la otra hebra es degradada. El miRNA maduro construye un complejo con la proteína Argonauta 2 (AGO), y la proteína heterodímero R2D2 y Dicer-2 forman el complejo RNA de inducción de silenciamiento (RISC). El complejo RISC es capaz de silenciar la expresión de un gen blanco, mediante el enlace de la región 3'UTR de gen blanco (mRNA). Este enlace inhibe al ribosoma de traducir el gen, lo cual produce la reducción de expresión del gen blanco (Mathe y col., 2014).

Existen tres maneras posibles en las cuales los miRNAs pueden afectar negativamente la traducción de sus mRNA blanco. Si el apareamiento de bases entre mRNA y miRNA es completo, es más probable que se produzca la degradación de mRNA debido al impedimento estérico para el reclutamiento y movimiento de ribosomas. En segundo lugar, mediante el apareamiento incompleto, el sitio de iniciación de la RNA polimerasa se encuentra bloqueado lo cual conduce a la disminución de la transcripción de mRNA. La tercera opción es que el complejo miRNA-RISC se transloca a los denominados cuerpos de procesamiento (P-bodies, en inglés), los cuales carecen de componentes ribosomales y funcionan como un almacén de mRNA y pueden mediar el decaimiento de mRNA (Mathe y col., 2014).

Actualmente se conocen 2024 miRNAs en humanos, y se estima que alrededor de 30% de los genes humanos son regulados por miRNAs, también han sido descritos en otros organismos, tales como peces, nematodos, insectos, plantas, entre otros, los cuales pueden ser consultados en la base de datos denominada miRBase [<http://www.mirbase.org/>], donde se provee información acerca de la secuencia de diversos miRNAs, así como predicciones de sus genes blanco (Márquez y col., 2014; Zaleska, 2015).

La presencia de miRNAs no es exclusiva dentro de las células, actualmente se sabe que los miRNAs también están presentes en fluidos corporales como saliva, orina, fluido cerebro espinal y sangre. Aunque la presencia de miRNA extracelular no es claramente conocida, existen investigaciones cuya hipótesis indica que los miRNA son liberados selectivamente como un mecanismo de señalización célula-célula, o como resultado de actividad fisiológica de la célula o por muerte celular. Los transportadores extracelulares de miRNAs reportados son: exosomas, microvesículas, lipoproteínas de alta densidad (HLD), asociadas a proteínas de la familia AGO y en cuerpos apoptóticos (Turchinovich y col., 2013). Los diferentes tipos de transporte extracelular de los miRNAs pueden

explicar su estabilidad y resistencia a la degradación fuera de la célula, lo cual es una de las características que promueven su uso como biomarcador.

Los miRNA han sido propuestos como biomarcadores potenciales de diversos tipos de cáncer debido a que poseen diversas características que los convierten en una excelente herramienta de diagnóstico (Ferracin y col., 2015; Khoury y col., 2015).

- Los miRNAs son liberados en circulación, por lo que representan una alternativa menos invasiva para pruebas diagnóstico.
  - Pueden ser detectados y aislados a partir de tejido congelado o fijado en formalina y embebidos en parafina (FFPE), así como de diversos fluidos biológicos tales como sangre total, plasma, suero, orina, esputo o saliva.
- Poseen alta estabilidad.
  - miRNAs en suero pueden permanecer estables después de exposición a niveles altos o bajos de pH, almacenamiento prolongado, temperaturas de ebullición y ciclos de congelación-descongelación.
- Poseen implicaciones para detección de individuos con riesgo de cáncer o para el manejo de pacientes con cáncer, ya que pueden potencialmente predecir la agresividad del tumor, metástasis y resultados de la enfermedad.
- Los niveles de miRNA circulantes son significativamente diferentes entre sujetos sanos y enfermos con algún tipo de cáncer.

Las características antes descritas confieren a los miRNAs características deseables como biomarcadores para su uso en la detección no invasiva del cáncer de mama.

Actualmente, existen tres métodos principales para determinar los niveles de expresión global de miRNAs y predecir su potencial como biomarcador de

cáncer. Las metodologías son: transcripción reversa en PCR-tiempo real (RT-qPCR), microarreglos y secuenciación de RNA pequeño. Particularmente, RT-qPCR es considerado el estándar de oro para la evaluación y validación de biomarcadores de miRNA, debido a su capacidad de cuantificar adecuadamente bajas copias de miRNAs (Kelly y col., 2015).

### **miRNAs en Cáncer de Mama**

Actualmente, existen numerosos estudios que han reportado la relación que existe entre la expresión de ciertos miRNAs provenientes de diferentes tipos de muestras, con la presencia de cáncer de mama. Zhu y col. (2015) identificaron miRNAs expresados diferencialmente en tejido tumoral y suero de pacientes con cáncer de mama, comparados con individuos saludables, 174 miRNAs en tejido tumoral y 109 miRNAs en suero de pacientes, de los cuales, solo 10 miRNAs se expresaban diferencialmente en ambos tipos de muestras, sugiriendo que solo una pequeña porción de miRNAs relacionados al tumor son liberados en el suero de forma selectiva.

En un estudio reportado para población mexicana por Mar Aguilar y col. (2013) donde se evaluó la expresión de miRNAs en suero pre-cirugía de pacientes con cáncer de mama y grupo control, mediante técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR), se encontró siete miRNAs con diferentes patrones de expresión en pacientes con cáncer de mama comparados con el grupo control (miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-145, miR-155, miR-191 Y miR-382). El miR-155 identificado por Mar-Aguilar, concuerda con el resultado obtenido por Roth y col. (2010) cuya concentración relativa en suero discrimina significativamente pacientes con cáncer de mama primario de mujeres saludables, así como de pacientes con enfermedad metastásica de controles saludables. Posteriormente este mismo miRNA fue evaluado para rastrear el efecto del tratamiento clínico del cáncer de mama por Sun et al. (2012), indicando

que los niveles de miR-155 se ven reducidos en suero de pacientes posterior al tratamiento.

Avances en el estudio de la expresión de miRNAs han demostrado que además de distinguir pacientes con cáncer de mama de individuos saludables, presentan asociación entre sus niveles de expresión y las características clínicas y patológicas del tumor, evidencia sugiere que los perfiles de expresión del miRNA pueden agrupar tipos similares de tumor más adecuadamente que los perfiles de expresión de genes de mRNA codificadores de proteínas (Ng y col., 2013).

En una revisión de la literatura sobre miRNAs desregulados en cáncer de mama y que pudieran presentar información adicional acerca del tumor, se identificaron 205 microRNAs desregulados, de los cuales se seleccionaron 4 miRNAs de interés: miR-145, miR-155, miR-181a y miR-205 (Ver tabla I), por su capacidad para distinguir entre pacientes con cáncer de mama e individuos saludables, así como presentar asociación con características clínicas y patológicas del tumor.

### **miR-145**

miR-145 presenta baja expresión en pacientes con cáncer de mama comparado con grupo control en muestras de tejido, suero y plasma (Romero-Cordoba y col., 2012; Chan y col., 2013; Ng y col., 2013; Min y col., 2014; Kodahl y col., 2014), principalmente mediante técnicas de RT-qPCR. Romero-Cordoba y col. (2012) analizaron la expresión de miRNAs en muestras de tejido tumoral y normal en pacientes mexicanas con cáncer de mama, encontrando a miR-145 como capaz de discriminar entre muestras PR positivo de PR negativo. En relación a la asociación de miR-145 y estatus de ER y HER2, Min y col. (2014), reportaron correlación entre miR-145 con ER negativo y HER2 negativo.

**Tabla I.** Panel de miRNAs seleccionados, reportados en la literatura con asociación a cáncer de mama y características clínico-patológicas.

miRNA	Expresión	Característica clínico-patológica asociada	Tipo de muestra	Referencia
miR-145	Baja expresión	ER/PR + HER2 – NL+ Tamaño del tumor	Suero, plasma, tejido	Romero-Cordoba y col., 2012; Ng y col., 2013; Chan y col., 2013; Kodahl y col., 2014; Min y col., 2014
miR-155	Sobrexpresado	HER2 + NL+ Post-menopausica	Suero, plasma, tejido	Zhu y col., 2009; Sun y col., 2012; Liu y col., 2013; Sochor y col., 2014; Wang y col., 2014; Zeng y col., 2014; Shaker y col., 2015; Wu y col., 2015; Hou y col., 2016
miR-181a	Baja expresión	ER+ PR+ HER2-	Suero, sangre, tejido, fluido de lavado ductal	Guo y col., 2013; McDermott y col., 2014; Do Canto y col., 2016
miR-205	Baja expresión	ER- PR- HER2-	Suero y tejido	Savad y col., 2012; Liu y col., 2013; Zhang y col., 2015, Fiannac y col., 2015

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano  
 NL: Nódulo linfático (ganglio linfático)  
 ER: Receptor de estrógeno  
 PR: Receptor de progesterona  
 (+): Positivo  
 (-): Negativo

Gao y col. (2015) demostraron que miR-145 es capaz de suprimir la expresión de la proteína 1-asociada a resistencia de multidroga (MRP1), proteína de membrana transportadora cuya sobreexpresión se asocia a la quimioresistencia del cáncer de mama. La región 3' no codificante del mRNA de la proteína MRP1 es blanco directo de miR-145, el cual suprime la expresión de MRP1. Mediante en ensayos *in vitro* con células de cáncer de mama, Gao y col. observaron un aumento en la sensibilidad de las células al agente terapéutico doxorubicina al inducir la sobreexpresión de miR-145, por lo que la baja expresión de miR-145 en pacientes con cáncer de mama puede ser evaluado como biomarcador con características predictivas para quimio-resistencia.

En un estudio más reciente, Ye y col. (2018), mediante la sobreexpresión de miR-145 en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, reportaron a miR-145 con efectos inhibidores en la proliferación celular, formación de colonias, capacidad invasión y migración celular. Efecto que puede explicarse por el estudio Zheng y col. (2015) donde asocian a miR-145 con la proteína kinasa 1-asociada a Rho (ROCK1), la cual participa en la migración celular y anclaje al sustrato. Zheng y col. (2015) a través de ensayos *in vitro* con la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, observaron una reducción de los niveles de la proteína ROCK1, así como de su mRNA, mediante la sobreexpresión de miR-145. Correlación inversa que fue confirmada en muestras de tejido tumoral de cáncer de mama.

### **miR-155**

El miR-155 ha sido ampliamente reportado por presentar sobre-expresión en pacientes con cáncer de mama comparado con individuos saludables en diferentes tipos de muestras, tales como: plasma (Liu y col., 2013), tejido (Nassar y col., 2014; Wu y col., 2015) y principalmente en suero (Zhu y col., 2009; Sun y col., 2012; Liu y col., 2013; Sochor y col., 2014; Shaker y col., 2015). Adicionalmente, se han descubierto asociaciones entre la sobreexpresión de miR-155 y características clínico-patológica del tumor. En un meta-análisis que

incluía 15 estudios sobre miR-155 en cáncer de mama y su asociación con características clínico-patológicas, realizado por Zeng y col. (2014), se mostró la relación de dicho miRNA con cáncer de mama, el cual se encontraba elevado en tumores con HER2 positivo o nódulos linfáticos positivos a metástasis, mientras que para el estatus ER+ o PR+ fue significativamente menos expresado.

Nassar y col. (2014), analizaron la expresión de miRNAs en muestras de tejido tumoral y normal adyacente de pacientes con carcinoma ductal invasivo, fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE), mediante la técnica de RT-qPCR. MiR-155 fue reportado como sobreexpresado en tejido tumoral comparado con tejido normal, además se asoció a pacientes post-menopáusicas, mayores de 40 años. En cuanto a su asociación con estatus hormonal, miR-155 se correlacionó positivamente con sobreexpresión de HER2 y negativamente con la expresión de PR.

La relación inversa entre los niveles de miR-155 y expresión de receptores hormonales positivos, ha sido estudiada en líneas celulares de cáncer de mama ER+ por He y col. (2016), en las cuales se encontró que miR-155 reprime la expresión del gen de receptor de estrógeno denominado *ErbB2* mediante dos mecanismos: a nivel transcripcional, al inhibir a *HDAC2*, un activador transcripcional de *ErbB2*; o a nivel post-transcripcional, al inhibir directamente la región codificante de *ErbB2*.

La expresión de miR-155 también ha sido asociada con la proliferación celular, formación de colonias y crecimiento tumoral, relación que fue estudiada por Jiang y col (2010), quienes identificaron al gen supresor de la señalización de citoquinas (SOCS)-1, como gen blanco del miR-155. Dicho gen produce una proteína que reprime la activación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), el cual está relacionado con la proliferación celular. Jiang y col. observaron que la sobreexpresión de miR-155 reprimía a SOCS-1, lo cual provocaba la activación de STAT3 desencadenando la proliferación celular,

formación de colonia y el crecimiento de tumores en ratones con injerto de células tumorales mamarias.

### **miR-181a**

miR-181a presenta baja expresión en diferentes muestras de pacientes con cáncer de mama comparado con grupos control, así como en diferentes tipos de muestra, tales como suero, fluido de lavado ductal (Guo y col., 2012; Do Canto y col., 2016), sangre total y tejido (McDermott y col., 2014).

Gou y col. (2012) cuantificaron los niveles en suero de miR-181a mediante RT-PCR, reportando niveles significativamente más bajos de dicho miRNA en pacientes con cáncer de mama comparado con individuos saludables. Adicionalmente evaluaron y compararon la sensibilidad y especificidad de miR-181a para el diagnóstico de cáncer de mama comparado con los marcadores tumorales convencionales CA153 y CEA, obteniendo mejores valores en sensibilidad y especificidad para miR-181a, con 70.7 y 59.9%, respectivamente, mientras que para los marcadores CA153 y CEA, su sensibilidad fue de 10.53 y 9.21%.

En cuanto a la relación de los niveles de expresión de miR-181 con características patológicas del tumor, McDermott y col. (2014), validaron la expresión alterada de miR-181a dentro de un panel de 3 miRNAs (miR-29, miR-181a y miR-652) en muestras de sangre de mujeres con cáncer de mama de subtipo luminal A (ER+ PR+ HER2-), indicando el potencial de miR-181a para dicho subtipo de cáncer de mama.

A nivel molecular, miR-181a ha sido identificado por Kastrati y col (2015), como regulador de la proteína denominada PHLDA1 (Dominio de tipo homología Pleckstrin, familia A, miembro 1), implicada en la sobrevivencia celular y propiedades de tipo célula madre en células cancerígenas. Kastrati y col. estudiaron el efecto de la vía de receptor de estrógeno (ER) y la vía inflamatoria del factor nuclear KB (NFKB), en cultivo de mamosferas ER+, es decir, células de

cáncer de mama, receptores estrógeno positivas con características no adherentes y con condiciones no diferenciadas, donde observaron la sobreexpresión de PHLDA1 y baja expresión de miR-181a. Al estudiar el efecto de la sobreexpresión de miR-181a en este modelo, se bloqueaba la proteína PHLDA1, impidiendo significativamente la formación de mamóferas. Lo cual puede explicar la relación entre la baja expresión de miR-181a observado en cáncer de mama, particularmente del tipo ER+.

### **miR-205**

miR-205 ha sido identificado como miRNA de baja expresión en pacientes con cáncer de mama comparado con grupo control en muestra de tejido (Savad y col., 2012; Fiannac y col., 2015) y suero (Liu y col., 2013; Zhang y col., 2015). En comparación con otros tipos de cáncer, miR-205 se manifiesta con baja expresión en cáncer de mama, por el contrario, se sobreexpresa en cáncer de pulmón, vejiga y endometrio (Hou y col., 2016).

Zhang et al. (2015) evaluaron los niveles de expresión en suero de miR-205 de pacientes con cáncer de mama y controles saludables mediante qRT-PCR, así como la sensibilidad y especificidad de miR-205 para el diagnóstico de la enfermedad, encontrando una sobre-expresión de miR-205 en los controles saludables, por lo tanto, baja expresión en pacientes con la enfermedad. En la evaluación de sensibilidad y especificidad para diagnóstico de cáncer de mama por miR-205, fue de 86.2% y 82.8%, respectivamente, por lo que posee moderadamente alta precisión en la discriminación de pacientes con cáncer de mama entre controles saludables.

En asociación a características patológicas del tumor, la baja expresión de miR-205 ha sido relacionada con cáncer de mama subtipo triple negativo (ER- PR- HER2-) en muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama (Savad y col., 2012; Fiannac y col., 2015). miR-205 también ha sido asociado a cáncer de

mama inflamatorio, una de las formas más agresivas de cáncer de mama (Hou y col., 2016).

En cuanto a la relación de miR-205 y cáncer de mama, miR-205 ha sido asociado a la regulación de la expresión de e-cadherina, proteína involucrada en la transición de células epiteliales a mesenquimales, proceso fundamental en el mecanismo de invasión y metástasis del cáncer. Mediante la supresión de los represores de transcripción de e-cadherina, ZEB1 y ZEB2, miR-205 regula la expresión el proceso de transición epitelial-mesenquimal. En estudios de hibridización in situ de miR-205 en tejido de cáncer de mama, se observa una reducción de e-cadherina en asociación con baja expresión de miR-205 (Hou y col., 2016).

Zhang y Fan (2015) identificaron a la proteína AMOT (angiotion), implicada en migración celular, como blanco de miR-205. Observaron que el decremento en la expresión de miR-205 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, resulta en el aumento de AMOT, lo cual contribuye al crecimiento e invasión del cáncer de mama.

Los estudios recientes demuestran el potencial de los miRNAs como biomarcadores en suero para diagnóstico del cáncer de mama, los cuales ofrecen un método menos invasivo, más rápido y que proporciona información relevante sobre la enfermedad. Por tal motivo, la cuantificación sérica de miRNAs en pacientes con cáncer de mama surge como una herramienta potencial en el diagnóstico, generando la necesidad de desarrollar un panel de miRNAs capaz de distinguir entre mujeres con cáncer de mama y mujeres saludables, que adicionalmente proporcione información sobre características clínico-patológicas del tumor que permitan un adecuado manejo de la enfermedad.

## **Planteamiento del Problema**

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres alrededor del mundo. A pesar de los avances en la comprensión de la enfermedad, así como en el diagnóstico y tratamiento del mismo, biomarcadores de interés clínico no son muy numerosos. Actualmente, existen investigaciones sobre miRNAs como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de mama.

La mamografía es el estándar de oro actual para la detección de cáncer de mama en mujeres mayores a los 39 años. Sin embargo, sus limitaciones incluyen altas tasas de falsos-positivos, lo cual lleva a imágenes adicionales, biopsias, y bajas tasas de éxito en detección de tejido neoplásico dentro de tejido mamario denso. La combinación de mamografía con resonancia magnética y otras plataformas de imagenología pueden mejorar la detección de tumores, pero estas imágenes adicionales son costosas y no son procedimientos de detección rutinarios. Consecuentemente, ensayos más sensibles y específicos para la detección son necesarios para evitar imágenes adicionales y cirugías innecesarias de resultados de mamografía falsos-positivos. El análisis de miRNA en sangre ofrece un método de detección económico y no invasivo del cáncer de mama en etapas tempranas, así como la posibilidad de examinar más a fondo a los individuos de alto riesgo, aquellos con predisposición genética o pacientes post-tratamiento en riesgo de recurrencia.

Los estudios recientes demuestran el potencial de los miRNAs como biomarcadores en suero para diagnóstico del cáncer de mama, los cuales ofrecen un método menos invasivo, más rápido y que proporciona información relevante sobre la enfermedad. Por tal motivo, en este estudio se ha seleccionado un panel de miRNAs (miR-155, miR-145, miR-181a y miR-205) para su cuantificación en suero de pacientes con cáncer de mama comparado con un grupo de mujeres

sanas, con el objetivo de establecer su relación con características clínicas y patológicas del tumor.

### **Pregunta de Investigación**

¿El panel de miRNAs seleccionado (miR-155, miR-145, miR-181a y miR-205) es capaz de detectar la presencia de cáncer de mama y se relacionará con características clínico-patológicas del tumor?

### **Hipótesis**

Los niveles de los miRNAs (miR-155, miR-145, miR-181a y miR-205) evaluados en suero de mujeres con cáncer de mama permitirá la detección de la enfermedad, así como su relación con las características clínico-patológicas del tumor (estadio clínico, tamaño del tumor, tipo y grado histológico, invasión linfovascular, ganglios linfáticos involucrados, estatus de receptores hormonales ER/PR, estatus HER2, subtipo clínico).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del Estudio**

El estudio fue de tipo exploratorio, analítico, prospectivo. Las variables dependientes fueron los niveles de expresión de miRNAs miR-181a, miR-145, miR-155 y miR-205, las variables independientes incluyeron las características clínico-patológicas del tumor, tales como estadio clínico, tamaño del tumor, y marcadores histopatológicos (RE, RP, Her2).

### **Tamaño de la Muestra**

Se realizó una revisión de los nuevos casos de cáncer de mama reportados en la semana 1 hasta la semana 37 del 2015 y 2016, para el Estado de Sonora por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, se presentaron en el municipio de Hermosillo, Sonora 70 nuevos casos en el 2015 y 69 nuevos casos en el 2016. En dichos reportes se indica el número de nuevos casos de mujeres con cáncer de mama en Hermosillo, así como la institución de salud donde fueron reportados (Tabla II).

Por medio de los reportes de nuevos casos de cáncer de mama en los últimos dos años, para este estudio se estimó un tamaño de muestra de aproximadamente 30 participantes durante el periodo de un año, sin embargo, solo se reclutaron 15 pacientes debido a la participación de 4 de 5 sitios de reclutamiento contemplados.

### **Reclutamiento de Pacientes**

Se llevó a cabo un muestreo por conveniencia en hospitales públicos de la ciudad de Hermosillo, Sonora, con previa autorización de los comités de ética e investigación de los hospitales.

**Tabla II.** Número de nuevos casos de mujeres con cáncer de mama en Hermosillo, 2015 y 2016.

<b>Institución de Salud</b>	<b>No. nuevos casos de cáncer de mama, semana 1 a 37 de 2015</b>	<b>No. nuevos casos de cáncer de mama, semana 1 a 37 de 2016</b>
IMSS	19	18
ISSSTE	3	20
SSA	3	8
OTROS	45	21
SEDENA	0	2
<b>TOTAL</b>	<b>70</b>	<b>69</b>

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (ISSSTE); Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA); Secretaría de Defensa Nacional (SEDENA).

Las instituciones de salud participantes fueron:

- Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez”, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (ISSSTESON)
- Hospital General del Estado de Sonora “Dr. Ernesto Ramos Bours”
- Centro Estatal de Oncología
- Hospital Integral de la Mujer en el Estado de Sonora

El proyecto se realizó con base en las guías del hospital, acatando la Declaración de Helsinki sobre los principios éticos para la investigación médica que involucra sujetos humanos.

#### **Criterios de Inclusión**

- Mujeres  $\geq$  18 años de edad.
- Diagnóstico confirmado de cáncer de mama
- Estadio clínico I, IIA, IIB y IIIA

#### **Criterios de Exclusión**

- Historial previo de cualquier tipo de cáncer, metástasis o tratamiento previo para cáncer de mama.
- Padecimiento de enfermedad psiquiátrica y/o situación específica que limite la capacidad de comprensión y firma del consentimiento informado.
- Participante que no tenga disposición de firmar el consentimiento informado.

#### **Criterios de Eliminación**

- Participante que no cuenten con reporte de marcadores tumorales RE, RP y Her2.
- Participante que se niegue a la donación de muestra de sangre.

- Participante que retire su consentimiento informado.

La identificación de participantes con cáncer de mama candidatas al estudio se realizó con la colaboración de personal clave en los hospitales participantes: oncólogo cirujano y trabajadora social.

El reclutamiento de pacientes sanas se realizó en el Centro Médico “Dr. Ignacio Chávez”, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (ISSSTESON). Se recluto a pacientes aparentemente sanas sin historial previo de cáncer, mismo rango de edad que las pacientes reclutadas con cáncer de mama y con resultado por imagenología negativo a cáncer de los primeros 6 meses a la fecha de reclutamiento, es decir, reportes con BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System) categorías 1 y 2, que corresponden al diagnóstico de ninguna anomalía importante que reportar, y hallazgo benigno (no canceroso), respectivamente.

A todas las participantes se les aplicó consentimiento informado, posteriormente se les realizó un cuestionario de factores de riesgo de cáncer de mama y solicitó la toma de muestra de sangre para la investigación, previa a su cirugía programada. Las pacientes cuyo tratamiento inicial asignado fuera quimioterapia neoadyuvante, la toma de sangre se realizó previo a iniciar la quimioterapia, mientras que las pacientes referidas a cirugía primaria (previo a quimioterapia), la muestra de sangre se obtuvo antes de la cirugía programada

En este estudio, el análisis de miRNAs se realizó en muestras de suero, sin embargo, a partir de los resultados de esta investigación, se pretenden efectuar estudios genéticos posteriores con aquellos miRNAs que presenten relación estadísticamente significativa con la presencia del tumor y características clínico-patológicas del mismo. Para estos estudios posteriores relacionados a cáncer de mama, como se refiere en el consentimiento informado, se recolectó material adicional en el grupo pacientes con diagnóstico de cáncer de mama:

- Muestra de tejido tumoral y tejido normal adyacente en bloque de parafina y congelado en fresco (alrededor de 500 a 1000 mg), sin comprometer el diagnóstico patológico correspondiente. Dicho material se obtuvo a partir de la resección quirúrgica del tumor, dentro del laboratorio de patología de los hospitales participantes y con la colaboración de personal asignado al área.
- Muestra de sangre post-cirugía, mínimo 14 días después de la cirugía.

Se reclutó un total de 15 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama confirmando de cáncer de mama primario no metastásico (estadio clínico I, II y III). Así como un grupo de 5 mujeres aparentemente sanas, sin historial previo de cáncer, mismo rango de edad y con resultado por imagenología negativo a cáncer de los primeros 6 meses a la fecha de reclutamiento.

### **Recolección de Datos Clínicos-Patológicos**

Los datos clínicos-patológicos de las pacientes en estudio se obtuvieron a partir de la revisión de sus expedientes clínicos en archivo de los hospitales participantes, los datos recolectados son descritos en la tabla III. Descripción de variables en estudio.

Adicionalmente, se coleccionarán datos sobre factores de riesgo de cáncer de mama de la participante, con el fin de determinar las características epidemiológicas y antecedentes familiares de cáncer de mama de las participantes para posteriores estudios. La información se obtuvo mediante un cuestionario aplicado por el investigador responsable, posterior a la firma del consentimiento informado, preferentemente previo a la cirugía.

Los subtipos moleculares de cáncer de mama de las pacientes se determinaron con base en sus resultados de inmunohistoquímica obtenida de sus reportes de patología diagnóstica de la enfermedad, asignándole el subtipo

correspondiente basado en los criterios descritos por Carey y col. (2006) (Ver tabla IV).

### **Recolección y Procesamiento de Muestras**

Se colectaron muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama antes de iniciar cualquier tratamiento, sea quimioterapia neoadyuvante o cirugía primaria. La muestra de sangre de las pacientes sanas se obtuvo dentro de los primeros 6 meses posteriores al estudio de imagenología con resultado negativo a cáncer de mama.

La muestra de sangre de ambos grupos se obtuvo en ayunas. La toma de sangre se realizó de forma aséptica mediante venopunción. Se colectó una muestra de aproximadamente 10 ml de sangre venosa con tubos BD Vacutainer SSTTM (REF. 368159 volumen de 5 ml, tubos de plástico con gel para separación de suero). La sangre obtenida fue transportada con compresas frías al Laboratorio de Investigación en Cáncer de la Universidad de Sonora, donde fue procesada en un tiempo no mayor a 2 horas (posterior a los 30 min de recolección, una vez ocurrida la coagulación).

En el laboratorio, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1,200 g x 15 min a 25°C en una centrifuga Sorvall ST 40R (marca Thermo Scientific) para la separación del suero, el cual se transfirió cuidadosamente en alícuotas de 0.5 ml dentro de crioviales de 1.5 ml estériles, libres de RNasa y almacenados a -80°C, para su posterior extracción de RNA. Los viales se identificaron con clave numérica cuyo enlace con las pacientes se mantiene bajo resguardo con el fin de resguardar la confidencialidad.

**Tabla III.** Descripción de variables en estudio.

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Escala de medición o clasificación estadística</b>	<b>Indicador</b>	<b>Clasificación causa-efecto</b>
<b>Nivel de cada miRNA en estudio</b>	Cuantificación de miRNA en suero de pacientes	Cuantificación de miRNAs por la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ del análisis de muestras en qRT-PCR	Cuantitativa continua, índice de cambio en la expresión (fold-change)	Presencia o ausencia de cáncer de mama, relación con característica clínico-patológica	Dependiente
<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</b>					
<b>Estadio clínico (AJCC)</b>	Medida de la extensión y propagación del tumor	Estadio clínico determinado por el sistema TNM	Cualitativo ordinal, clasificación de la AJCC (I, II, III y IV)	Extensión y propagación del tumor	Independiente
<b>Tamaño del tumor</b>	Medida del tamaño del tumor	Medición en cm del tumor, medida realizada en el laboratorio de patología	Cuantitativa continua, medida del tumor en cm	Tamaño del tumor	Independiente
<b>Ganglios linfáticos involucrados</b>	Se refiere al número y ubicación de los ganglios linfáticos que tienen cáncer, clasificación TNM	Estado ganglionar determinado por el sistema TNM	Cuantitativa ordinal N0, N1, N2, N3 o NX, sistema de clasificación TNM	Metástasis a ganglios linfáticos	Independiente
<b>Tipo histológico</b>	Patrones morfológicos de cáncer de mama	Identificación al microscopio de patrones morfológicos de cáncer de mama	Cualitativo nominal	patrones morfológicos	Independiente
<b>Grado histológico</b>	Descripción de tumor con base en forma de las células tumorales al microscopio	Evaluación por el sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson	Cuantitativa discreta, clasificado como grado 1, 2 o 3	Rapidez con la cual se dividen las células cancerosas, menor grado = crecimiento lento, mayor grado = crecimiento rápido	Independiente

**Tabla III.** Descripción de variables en estudio (continuación).

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición o clasificación estadística	Indicador	Clasificación causa-efecto
<b>CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS</b>					
<b>Estatus ER</b>	Evaluación de la expresión del receptor hormonal de estrógeno en tejido tumoral	Estatus de receptor de estrógeno en tejido tumoral por inmunohistoquímica reportado por patología	Cualitativa nominal (positivo o negativo)	Células tumorales positivas o negativas a la expresión del receptor hormonal de estrógeno	Independiente
<b>Estatus PR</b>	Estatus del receptor hormonal de progesterona en tejido tumoral	Estatus de receptor de progesterona en tejido tumoral por inmunohistoquímica reportado por patología	Cualitativa nominal (positivo o negativo)	Células tumorales positivas o negativas a la expresión del receptor hormonal de progesterona	Independiente
<b>Estatus HER2/neu</b>	amplificación del gen o sobreexpresión de proteína HER2/neu	Estatus de expresión de HER2/neu en tejido tumoral por inmunohistoquímica reportado por patología quirúrgica	Cualitativa nominal (positivo o negativo)	Células tumorales positivas o negativas a la expresión de HER2/neu	Independiente
<b>Subtipo moleculares</b>	Clasificación del cáncer de mama basados en resultados de inmunohistoquímica (criterios descritos por Carey y col., 2006)	Subtipos moleculares de cáncer de mama determinados por estatus de sus receptores hormonales, Her2 y Ki67	Cualitativa nominal (Luminal A, Luminal B, HER, Triple negativo)	Clasificación molecular del cáncer de mama dada por parámetros de inmunohistoquímica	Independiente

**Tabla IV.** Criterios de clasificación de subtipos moleculares de cáncer de mama por inmunohistoquímica.

SUBTIPO	PERFIL DE INMUNOHISTOQUÍMICA		
	Estatus ER y PR	Estatus Her2	Estatus Ki67
Luminal A	ER+ ( $\geq 5\%$ ) y/o PR+ ( $\geq 5\%$ )	HER2-	Ki67 $< 13\%$ (-)
Luminal B	ER+ ( $\geq 5\%$ ) y/o PR+ ( $\geq 5\%$ )	HER2+	Ki67 $> 13\%$ (+)
Her2	ER- y PR-	HER2+	
Triple negativo	ER+ ( $< 5\%$ ) y/o PR+ ( $< 5\%$ )	HER2-	

ER: Receptor de Estrógeno

PR: Receptor de Progesterona

HER2: Receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano

(-): Negativo

(+): Positivo

## **Extracción de RNA**

La extracción de RNA total se realizó mediante el miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) para aislar el RNA total libre de células, usando un volumen de 200 µl del suero previamente descongelado en hielo, de acuerdo al protocolo del fabricante. Durante el proceso de extracción, se agregó el miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (QIAGEN), un miRNA sintético de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39-3p), como control para la normalización de los datos.

La concentración y pureza del RNA de todas las muestras fue evaluada mediante espectrometría mediante el NanoDrop1000 (Thermo Scientific), la concentración se midió por la absorbancia a 260 nm y el índice de pureza se determinó usando la relación A260/280. Las muestras de RNA obtenidas fueron almacenadas a -80°C hasta continuar con el proceso de transcripción reversa y PCR en tiempo real.

## **Síntesis de cDNA y Cuantificación de miRNAs por qRT-PCR**

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), así como los primers específicos para los miRNAs en estudio (TaqMan™ MicroRNA Assay- Applied Biosystems), cuyos primers para transcripción reversa contienen una modificación de tallo-orquilla lo cual les permite detectar miRNAs maduros y biológicamente activos.

El proceso de síntesis de cDNA consistió en 3 pasos:

1. Preparación de la master mix de RT (Transcriptasa Reversa, por sus siglas en inglés)
2. Preparación de la reacción RT
3. Ejecución de la transcripción reversa

Para la preparación de la master mix de RT se emplearon los componentes descritos en la Tabla V. Debido a las características de los primers y el kit de RT, diseñados para la generación de cDNA específicos, se modificó el volumen de primer RT en la mezcla de master mix (se agregó 1.43  $\mu$ l de cada primer RT, en lugar de 3  $\mu$ l) para agregar los primers RT de los 4 miRNAs en estudio a una sola reacción de RT por cada muestra de pacientes (sanas y con la enfermedad), no fue necesario añadir agua libre de nucleasas.

Las muestras de RNA de cada paciente fueron diluidas con el propósito de agregar 5  $\mu$ l de muestra de RNA con 5 ng de RNA total por cada reacción de RT. Los tubos de RT se colocaron en termociclador (T100 BIO-RAD) usando los parámetros descritos en la Tabla VI.

Los niveles de expresión de miRNAs fueron cuantificados usando el PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems). Se emplearon primers marcados con fluorocromo FAM (emisión a 518 nm) para los miRNAs en estudio, mientras que el primer del Spike-In Control se adquirió marcado con el fluorocromo VIC (emisión a 554 nm) (Ver tabla VII), de esta manera las reacciones de PCR se realizaron en dúplex, es decir, dentro de una misma reacción de PCR se agregó el primer del miRNA en estudio más el primer del miRNA control. Los parámetros para el termociclador de PCR en tiempo real se describen en la tabla VIII.

Las reacciones de PCR se realizaron con base en lo descrito por el fabricante, con modificaciones en el volumen de componentes, como se muestra en la Tabla IX para un volumen de reacción final de 10  $\mu$ l.

### **Calculo de la Expresión Relativa de miRNAs**

La expresión relativa de los miRNA maduros se calculó mediante el método del doble delta Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). El Ct se define como el ciclo de PCR en el cual la señal de fluorescencia del colorante reportero cruza un umbral de amplificación.

**Tabla V.** Componentes de la reacción de transcripción reversa.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen para 15 <math>\mu</math>l de reacción de Master Mix</b>
100 mM dNTPs (con dTTP)	0.15
Transcriptasa reversa MultiScribe™ 50 U/ $\mu$ l	1.00
Buffer de transcripción reversa 10X	1.50
Inhibidor de RNase, 20 U/ $\mu$ l	0.19
RT Primer miR-181a	1.43
RT Primer miR-145	1.43
RT Primer miR-155	1.43
RT Primer miR-205	1.43

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

**Tabla VI.** Parámetros del termociclador para reacción de transcriptasa reversa.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>30</b>	16
<b>30</b>	42
<b>5</b>	85
$\infty$	4

**Tabla VII.** Información de iniciadores empleados.

<b>MicroRNA (Sonda FAM)</b>	<b>Número de Acceso en miRBase</b>	<b>Secuencia</b>
hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558	5'ACCACUGACCGUUGACUGUACC3'
hsa-miR-145-3p	MIMAT0004601	5'GGAUUCUGGAAAUACUGUUCU3'
hsa-miR-155-3p	MIMAT0004658	5'CUCCUACAUAUUAGCAUUAACA3'
hsa-miR-205-3p	MIMAT0009197	5'GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC3'
<b>Primer control (Sonda VIC)</b>	<b>Número de Acceso en miRBase</b>	<b>Secuencia</b>
cel-miR-39	MIMAT0000010	5'UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG3'

miRBase: Base de datos para secuencias de miRNAs publicadas (<http://www.mirbase.org/>)

**Tabla VIII.** Parámetros para la reacción de PCR en tiempo real.

<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>2 min</b>	50
<b>10 min</b>	95
<b>40 ciclos</b>	
<b>15 seg</b>	95
<b>60 seg</b>	60

**Tabla IX.** Componentes de la reacción para PCR.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (µl) para 10 µl de reacción</b>
TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	5
Agua libre de nucleasas	3.535
Primer en estudio (marcado con sonda FAM)	0.4
Primer control (marcado con sonda VIC)	0.4
cDNA, producto de la reacción RT	0.665

Se empleó el fluoróforo ROX como referencia pasiva.

Los datos de Ct se colectan en la fase exponencial de la amplificación de PCR. El valor numérico del Ct es inversamente relacionado a la cantidad de amplicón en la reacción.

A continuación, se describen los pasos realizados para el cálculo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen y Livak, 2008).

### 1. Normalización de los datos

A cada valor de Ct de cada miRNA se le resta el Ct del miRNA control (cel-miR-39), siguiendo la fórmula:

$$\Delta Ct = (\text{Ct del gen de interés} - \text{Ct del control interno})$$

La fórmula anterior se aplicó a los resultados de Ct de todas las muestras, tanto de pacientes con la enfermedad y pacientes sanas.

### 2. Cálculo del $\Delta\Delta Ct$

Los resultados  $\Delta Ct$  de las muestras de pacientes con cáncer de mama se agruparon de acuerdo a la edad de las pacientes sanas (+/- 4 años de diferencia entre sanas y enfermas, ver tabla X). Posteriormente se resta el  $\Delta Ct$  de la paciente sana a los  $\Delta Ct$  de las pacientes con la enfermedad, el resultado de dicha resta corresponde al  $\Delta\Delta Ct$ , al cual se aplica la exponencial  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El valor resultante representa el nivel de expresión relativa del miRNA en estudio de las muestras de suero evaluadas.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{[(\text{Ct del gen de interés} - \text{Ct del control interno})_{\text{paciente con cáncer de mama}}] - (\text{Ct del gen de interés} - \text{Ct del control interno})_{\text{paciente sana}}}{(\text{Ct del gen de interés} - \text{Ct del control interno})_{\text{paciente sana}}}$$

Los resultados obtenidos a partir de la fórmula se interpretan como la expresión relativa del miRNA de interés de la muestra de pacientes con cáncer de mama respecto a las muestras de pacientes sanas, que para este estudio se denominarán como grupo de casos y grupo control, respectivamente.

**Tabla X.** Agrupación de pacientes con cáncer de mama y sanas con base en la edad.

<b>Pacientes sanas Edades</b>	<b>Pacientes con cáncer de mama Edades</b>
<b>30</b>	31
<b>42</b>	40-42
<b>53</b>	50-54
<b>58</b>	58
<b>63</b>	61-67

### **3. Cálculo del fold-change**

Para calcular el índice de cambio en la expresión del miRNA en estudio de las pacientes con la enfermedad respecto a las sanas, se calculó la mediana de los valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los valores mayores a 1 indican una sobreexpresión del miRNA, mientras que los valores menores a 1 representan una baja expresión.

### **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos clínicos y patológicos se realizó mediante el cálculo de la media y desviación estándar. Para el análisis de los niveles de expresión de los miRNAs en estudio y su comparación entre casos y controles, así como con las características clínicas y patológicas se emplearon las medianas de la expresión de los miRNAs. Se usó la prueba U de Mann-Whitney para analizar la relación entre la expresión de miRNAs y las características clínico-patológicas en los casos correspondientes, dado que los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad. Se empleó el paquete estadístico NCSS versión 11 y XLSTAT versión 2017.

### **Consideraciones Éticas**

El presente protocolo se ajustó a los principios de la Declaración de Helsinki, Informe de Belmont de 1978, así como a los requerimientos indicados en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud; la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; Norma Oficial Mexicana NOM-168-SSA1-1998, del expediente clínico.

El nivel de riesgo del estudio, en conformidad con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la

salud, se clasifica como Investigación con riesgo mínimo, debido a que se requería de la extracción de sangre por punción venosa.

### **Aprobación del Comité de Ética**

El presente estudio se realizó con previa autorización de la Comisión de Bioética e Investigación del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora, así como de los comités de Ética e Investigación de las instituciones de salud participantes.

### **Consentimiento Informado**

El consentimiento informado fue requerido para todas las participantes en el estudio, sanas y con cáncer de mama. Se explicó a las pacientes el contenido del consentimiento en un lenguaje claro y accesible, respondiendo, en caso de presentarse, a todas las preguntas relacionadas con el estudio. Todas las candidatas al estudio firmaron el consentimiento por escrito, previamente aprobado por los comités de ética correspondientes, y recibieron una copia del consentimiento firmado. Se aclaró a las candidatas al estudio que si se negaba a participar sería tratada sin prejuicio, enfatizando que la calidad de su atención médica no sería afectada si se rehusaba a participar y si decidía participar, también podría retirar su consentimiento si así lo decide, en cualquier momento, y esto tampoco afectará la atención que su institución de salud le brinda.

### **Beneficios de la Investigación**

La ejecución del presente protocolo tuvo como beneficio aportar al conocimiento científico de información reciente, que puede aplicarse en el desarrollo de protocolos potenciales para el diagnóstico del cáncer de mama de forma no invasiva y con valor de clasificación clínica-patológica del tumor. Lo anterior, propone futuros beneficios al manejo de pacientes.

## **Participantes**

La información generada de esta investigación no presentó beneficio directo a las participantes, ya que la información obtenida no se incluyó en su expediente clínico, ni afectó el tratamiento recibido, sin embargo, proporcionó información acerca de la expresión de miRNAs en las pacientes, lo cual podrá aportar a futuras investigaciones que permitan mejorar la atención de esta enfermedad.

Es importante mencionar que en caso de detectar niveles desregulados de los miRNAs correspondientes a diagnóstico de cáncer de mama en un caso del grupo control, se procedería a emitir un informe de los hallazgos por escrito acompañado de una explicación verbal por parte del investigador que realiza el estudio hacia el médico tratante, informe que recomendaría realizar una mamografía y/o ultrasonido complementario lo más pronto posible al hallazgo, así como un examen posterior a los 6 meses. Sin embargo, este caso no se presentó durante el desarrollo del estudio.

## **Confidencialidad**

Toda participante que firmó el consentimiento, se le asignó un número de identificación compuesto por 4 dígitos. Este número se asignó a las muestras de sangre y tejido recolectadas, así como alícuotas obtenidas, y en los formatos de datos clínico-patológicos e historial de antecedentes familiares de cáncer de la participante; de esta manera, la información y muestras obtenidas no presentaban información personal manteniendo el anonimato.

La documentación que se generó en el estudio (consentimiento informado, formatos de datos clínico-patológicos e historial de antecedentes familiares de cáncer), se encuentra archivada bajo llave y resguardadas en el Laboratorio de Investigación en Cáncer de la Universidad de Sonora. El acceso a la base de datos que identifique a la paciente con sus respectivas muestras y expediente de investigación es de uso limitado y exclusivo para los investigadores correspondientes a este estudio.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Dentro de los hospitales participantes, se detectaron 33 pacientes con cáncer de mama candidatas al estudio. Solo 15 pacientes con cáncer de mama otorgaron su consentimiento informado, quienes para fines de este estudio se denominarán como “grupo casos” y 5 pacientes sanas, denominadas “grupo control”.

### **Datos Clínicos y Patológicos**

El promedio de edad del grupo de casos en estudio fue de  $54.5 \pm 10.6$  años (media  $\pm$  desviación estándar), con una mínima de edad de 31 años y una máxima de 67 años. En el grupo control la edad promedio fue  $49.2 \pm 13.3$  años (media  $\pm$  desviación estándar), con una mínima de edad de 30 años y una máxima de 63 años.

A nivel nacional, en el 2015, de acuerdo a datos del INEGI, la incidencia de cáncer de mama en mujeres mexicanas fue más alta en el grupo de 60 a 64 años de edad (68.05 por cada 100 000 mujeres de ese grupo de edad), seguido por el grupo de 50 a 59 años de edad (54.2 por cada 100 000 mujeres de ese grupo de edad). En nuestro estudio, observamos un comportamiento ligeramente diferente, con un 40% de nuestros casos en los rangos de edad de 50-59 años y otro 40% en el rango de 60-69 años. Con el menor número de casos en edades de 40-49 años (13.3%) y de 30-39 años (6.6%).

Los datos clínicos y patológicos se obtuvieron mediante la revisión de expedientes clínicos y reportes de patología de las pacientes con cáncer de mama (Tabla XI). El total de pacientes con cáncer de mama fue diagnosticado con tipo histológico de carcinoma ductal infiltrante, una de las cuales presentó el subtipo medular y en solo 5 pacientes (33.3%) se observó componente de carcinoma ductal in situ, adicional al infiltrante. En relación al tamaño del tumor,

**Tabla XI.** Resumen de características clínicas y patológicas de las pacientes con cáncer de mama.

Paciente	Edad (años)	Diámetro máximo (cm)	Tipo histológico	Estadio clínico	Clasificación TNM			Grado del tumor	Invasión Linfo-vascular	Inmunohistoquímica				Subtipo	Niveles de expresión			
					T	N	M			ER	PR	HER2	Ki67		miR181a	miR145	miR155	miR205
1	53	1.5	CDI	IIA	T1b	N1	M0	2	Si	+	+	-	-	Luminal A	1.019	1.111	1.031	0.912
2	67	1	CDI	IA	T1b	N0	M0	2	Si	+	+	-	<14%	Luminal A	0.982	0.858	0.968	0.715
3	63	1	CDI	IA	T1b	N0	M0	1	No	+	+	+	>14%	Luminal B	0.991	0.851	0.936	0.872
4	54	0.6	CDI	I	T1	N0	M0	NR	No	+	-	-	<14%	Luminal A	0.946	1.058	1.043	0.888
5	31	5.5	CDI	IIIA	T3	N1	M0	3	Si	-	-	+	30%	HER2	1.143	1.070	0.984	0.855
6	40	7	CDI	IIA	T3	N1	M0	2	Si	-	+	-	>14%	Luminal A	0.934	0.837	1.003	0.679
7	65	3	CDI	IIA	T2	N0	M0	NR	Si	+	+	+	>14%	Luminal B	1.032	0.959	0.988	0.850
8	58	4	CDI	IIB	T2	N1	M0	2	Si	+	+	-	<14%	Luminal A	1.026	0.998	1.008	1.040
9	42	4	CDI	IIIA	T3	N2	M0	2	No	+	-	-	>14%	Luminal A	0.890	0.836	0.962	0.977
10	67	0.7	CDI	IIA	T1b	N1	M0	NR	Si	+	-	+	<14%	Luminal B	1.057	0.912	1.002	0.806
11	50	2	CDI	IA	T1c	N0	M0	NA	Si	+	+	+	>14%	Luminal B	0.940	0.986	1.008	0.853
12	50	3	CDI	IIA	T2	N0	M0	2	No	+	+	NR	NR	NR	1.023	0.973	0.997	0.881
13	54	1	CDI	I	T1b	N0	M0	1	No	+	-	+	<14%	Luminal B	0.971	0.961	1.042	0.732
14	62	0.5	CDI	IA	T1c	NR	M0	1	No	+	+	+	<14%	Luminal B	1.005	0.876	0.975	0.741
15	61	1.5	CDI	IIB	T2	N3	M0	2	Si	-	-	+	>14%	HER2	0.894	0.938	0.956	0.523

TNM: Tumor-Nódulo-Metástasis; CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante; (-): negativo; (+): positivo; (+-): leve positivo; NR: No Reportado; NA: No Aplica; Grado del tumor: 1, bien diferenciado; 2, moderadamente diferenciado; 3, mal diferenciado (índice de Nottingham)

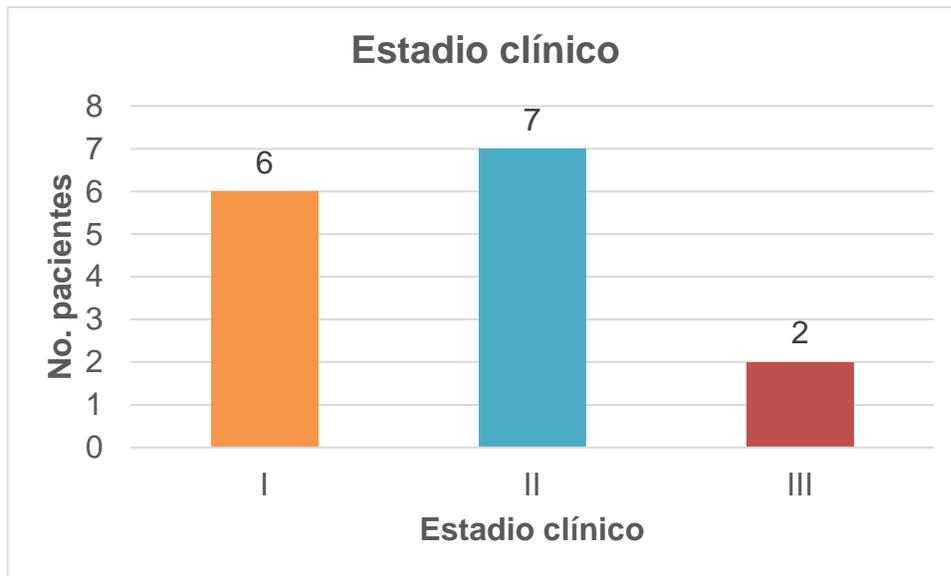
el tamaño promedio del diámetro máximo (cm) fue de 2.42 cm  $\pm$ 1.96 (media  $\pm$  desviación estándar), con una mínima de 0.5 cm y máxima de 7 cm.

Respecto al estadio del tumor, este se obtuvo del expediente clínico de las pacientes el cual es reportado con base en el sistema de estadificación TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC), donde T representa el tamaño y extensión del tumor, N se refiere a la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos y M a la presencia de metástasis distante. En este sistema, se añade un número después de cada letra el cual corresponde a detalles acerca del cáncer [<https://www.cancer.gov>].

Con base en los criterios de inclusión de este estudio, solo se reclutaron pacientes en estadios tempranos de cáncer de mama, los cuales incluyen a los estadios I, IIA, IIB y IIIA. El 46.66 % de las pacientes reclutadas presentó estadio clínico II, el 40 % estadio I y solo el 13.33 % estadio III. En la figura 1 se observa la distribución de estadios clínicos entre las pacientes reclutadas.

Entre las características patológicas del tumor, se determina el grado del tumor, el cual indica la rapidez con la cual puede crecer y extenderse, la clasificación se basa en la observación al microscopio de la morfología celular y su similitud con las células normales, clasificándose en Grado 1, bien diferenciado (crecimiento celular lento, morfología parecida a células normales); Grado 2, moderadamente diferenciado (crecimiento moderado, células de aspecto intermedio entre grado 1 y 3) y Grado 3, pobremente diferenciado (crecimiento acelerado, carecen de características normales).

Con relación al grado del tumor, 46.66% de las pacientes se clasificó con grado 2, el 20% grado 1, el 6.66 % grado 3, hubo 4 (26.66%) pacientes para las cuales no se localizó el dato en expediente clínico. Respecto a la invasión de células tumorales al sistema linfovascular y a ganglios linfáticos, se encontró que el 60 % de las pacientes se diagnosticó con presencia de invasión linfovascular



**Figura 1.** Distribución de estadio clínico de pacientes con cáncer de mama en el estudio.

de células tumorales, el 40 % no presentó invasión, esto con respecto al reporte de patología.

En cuanto a la invasión de ganglios linfáticos, dato obtenido por la clasificación N (sistema TNM), el 53.33% no presentó invasión a ganglios, mientras que el 46.66% si presentó.

Los subtipos moleculares de cáncer de mama identificados entre las pacientes fueron Luminal A en un 40% (6 casos), Luminal B con 40% (6 casos) y Her2 en 13.33% (2 casos). Una paciente no pudo ser clasificada debido a que su estudio de inmunohistoquímica para Her2 estaba en proceso, sin embargo, sus receptores hormonales ER y PR fueron diagnosticados como positivos, por lo que su subtipo se definiría entre Luminal A o B. Dicha subclasificación concuerda con la frecuencia promedio de los subgrupos en población mexicana, donde se ha reportado al 60% de los casos con receptores hormonales positivos (Luminal A y luminal B), el 20.4% Her2 positivo y el 23.1% triples negativos (Cárdenas y col., 2017).

En un estudio con población mexicana realizado por Maffuz-Aziz y col. (2017), donde se evaluaron las características clínico-patológicas de 4,411 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama, se reportó un promedio de edad de 53 años, similar al de nuestra muestra (54.5 años), las etapas clínicas con mayor porcentaje fueron I y IIA (36%) y de IIB a IIIC (45%), rangos en los cuales se reportaron para nuestras pacientes. El 79% fueron de tipo histológico ductal, mientras que el 7.8% lobulillar, comparado con nuestra muestra, solo se presentó el tipo ductal.

Maffuz-Aziz y col. (2017), reportaron al 41.2% de sus casos con permeación linfovascular tumoral y 58% no la presentó, comparado con nuestra muestra, encontramos valores invertidos, con 60% de pacientes con invasión linfovascular y 40% sin invasión. Respecto al grado tumoral, Maffuz-Aziz y col. reportan al grado 2 con el mayor número de casos (54.1%) similar a lo obtenido para

nuestras muestras (46.66% grado 2). Respecto a los subtipos de cáncer de mama reportaron el 65.7% de los casos como luminales A, 10.9% luminal Her positivo (luminal B), 8.72% Her 2 positivo puro y 14.63% triple negativo, en comparación con nuestro estudio, donde encontramos una distribución homogénea entre los luminales, luminal A, 40% y luminal B con 40%, pero al igual que en el estudio de Maffuz-Aziz y col., los subtipo luminales se presentaron con mayor frecuencia en nuestra muestra, y similar porcentaje de Her2 (13.33% de casos), pero sin casos reportados para el subtipo triple negativo.

### **Extracción de RNA**

Se evaluó la cantidad de RNA extraído de las muestras de suero del grupo de casos y controles (Tabla XII). La concentración promedio de RNA en pacientes con cáncer de mama fue de  $11.22 \pm 3.11$  ng/ $\mu$ l en 30  $\mu$ l con una relación A260/280 (índice de pureza) promedio de  $1.43 \pm 0.10$ , valor que se considera bajo, puesto que un RNA “puro” se determina con un valor A260/280 aproximado a 2.0, por lo que podría indicar la presencia de fenol u otros contaminantes del proceso de extracción. En el grupo de muestras de pacientes sanas se observan resultados similares, con un promedio de concentración de RNA de  $14.22 \pm 3.16$  ng/ $\mu$ l y un índice de A260/280 de  $1.39 \pm 0.07$ .

A pesar de que la concentración de RNA y el índice de pureza podría considerarse bajo, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Mar-Aguilar y col. (2014), quienes realizaron el mismo protocolo de extracción a nuestro estudio y obtuvieron valores de RNA total en el rango de 3 a 15 ng/ $\mu$ l y relaciones de absorbancia de 260/280 y 260/230 bajos (DNA y RNA absorbancia a 260 nm, proteínas a 280 nm y contaminantes, ej. EDTA, a 230 nm), de entre 0.3 a 0.6, indicando que la detección de bajos niveles de RNA no es eficiente en relación de absorbancia de 260/280 y 260/230.

**Tabla XII.** Resultados de concentración e índice de pureza del RNA total extraído de muestras de suero de casos y controles.

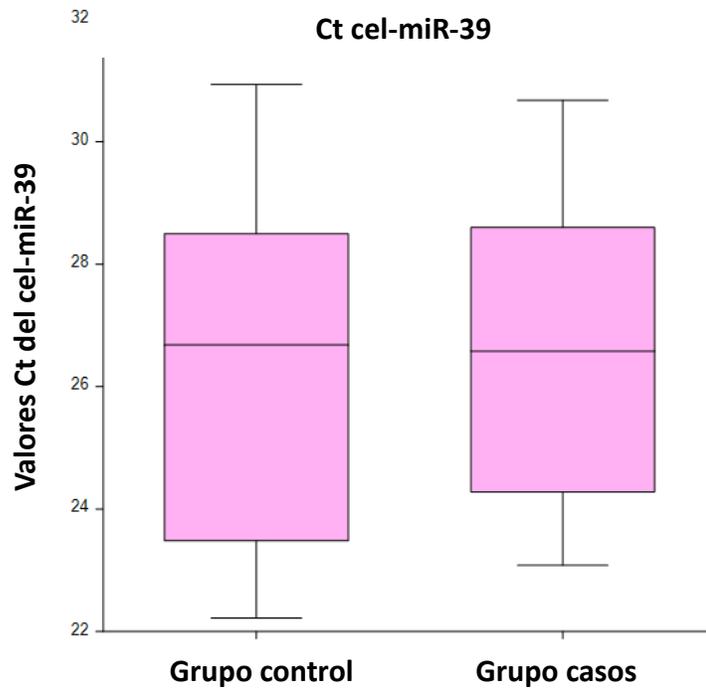
<b>Concentración de RNA (ng/μl)</b>		<b>Relación A260/280 (índice de pureza)</b>	
<b>Casos</b>	<b>Controles</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
12.33	18.73	1.45	1.29
11.83	9.93	1.21	1.5
9.3	13.33	1.36	1.39
7.23	15	1.47	1.41
12.15	14.15	1.52	1.36
13.56		1.28	
12.9		1.45	
13		1.38	
6.43		1.56	
6.9		1.51	
13.46		1.44	
6.95		1.5	
11.5		1.57	
14.5		1.37	
16.4		1.47	

### **Evaluación del Control Exógeno cel-miR-39**

El cel-miR-39 ha mostrado poseer características deseables para su uso como control exógeno (Zhu y col., 2009), entre ellas que carece de homología con miRNAs humanos endógenos, por lo tanto, no interfiere en su análisis. Para confirmar si su amplificación fue estable en las diferentes muestras de nuestro estudio, con el fin de usarlo como normalizador en el proceso de PCR, se realizó una comparación entre los valores Ct obtenidos para cel-miR-39 entre casos y controles.

La comparación de los Ct de cel-miR-39, se realizó mediante la selección de 20 valores de Ct del grupo control y el mismo número de datos del grupo de casos. Se seleccionaron todos los valores Ct de cel-miR-39 obtenidos de las muestras control. Considerando una N=5 del grupo control y que durante la evaluación del panel de 4 miRNAs mediante PCR se obtuvieron 5 valores de Ct de cel-miR-39 por cada miRNA del panel. En cambio, para el grupo de casos, con N=15, se obtuvieron 60 valores para Ct de cel-miR-39 (15 valores de Ct por cada miRNA del panel analizado), por ello se realizó una selección aleatoria de 20 Ct de cel-miR-39 para comparar casos y controles con mismo número de datos.

La media del Ct de cel-miR-39 en las pacientes sanas fue de 26.35 (rango, 22.21-30.95), mientras que para las pacientes con cáncer de mama fue de 26.68 (rango, 23.08-30.68) (Ver Figura 2). El análisis de los datos mediante la prueba U de Mann Whitney mostró que no existe diferencia significativa entre los niveles de cel-miR-39 de las pacientes con cáncer de mama y las pacientes sanas (P=0.63). Por lo tanto, cel-miR-39 muestra ser un buen control exógeno, cuyos datos obtenidos a partir de PCR son adecuados para el proceso de normalización de nuestros datos.



**Figura 2.** Comparación del Ct de cel-miR-39 en pacientes con cáncer de mama, grupo casos y pacientes sanas, grupo controles.

### **Nivel de Expresión de miRNAs**

Se obtuvieron las medianas de los valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de los miRNAs en estudio (miR-181a, miR-145, miR-155 y miR-205) en las muestras de suero de pacientes con cáncer de mama. La mediana del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  calculada representa el índice de cambio o fold change en la expresión del miRNA respecto al grupo control. Los valores de fold change obtenidos para los 4 miRNAs en estudio de nuestra muestra (N=15) presentaron baja expresión (Ver tabla XIII).

### **Expresión de miRNAs entre Casos y Controles**

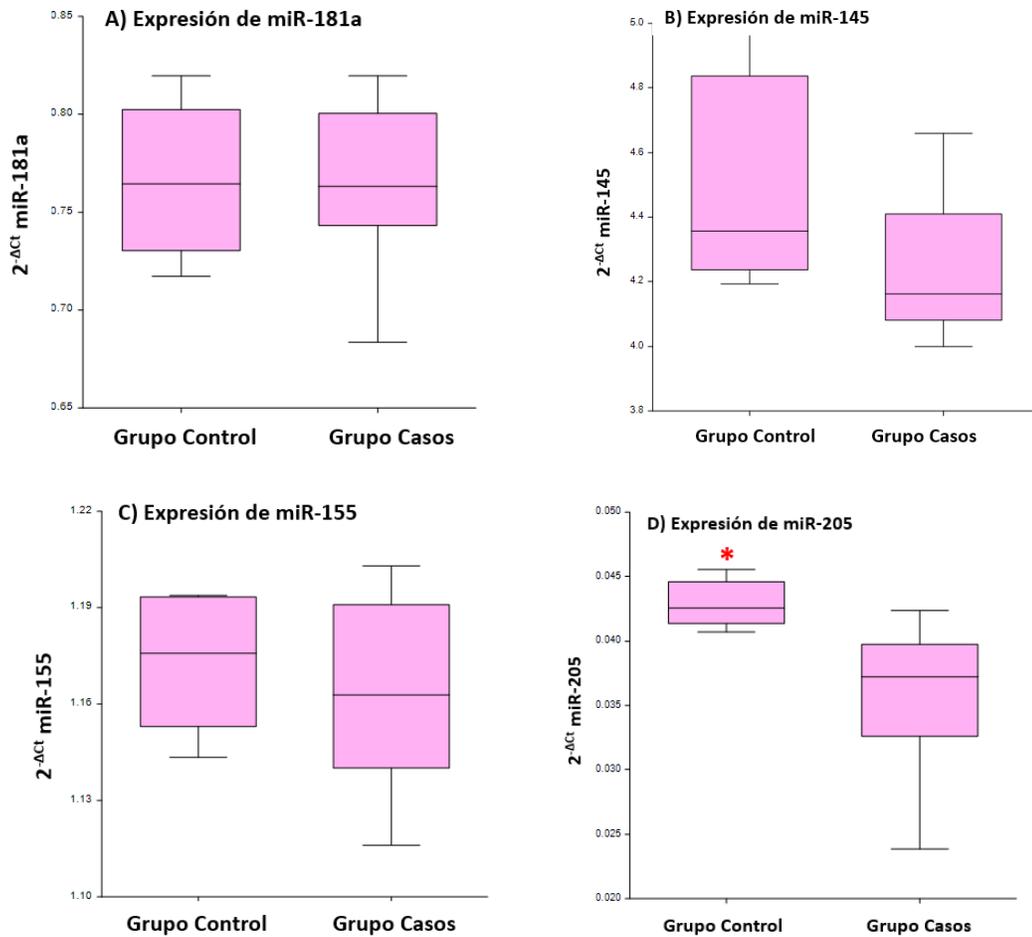
Se realizó una prueba U de Mann Withney para determinar si existen diferencias entre las medianas de la expresión de los miRNAs en estudio entre casos y controles. Los valores empleados para este análisis fueron las medianas de los  $2^{-\Delta Ct}$  de los miRNAs (miR-181a, miR-145, miR-155 y miR-205).

El miR-205 fue el único miRNA del panel en estudio que presentó diferencias en su expresión entre pacientes casos y controles ( $P=0.0009$ ) (Figura 3), con una baja expresión en el grupo de casos comparado con los controles. En un estudio realizado por Liu y col. (2013), donde compararon los niveles de miR-205 y miR-155 en suero de 20 pacientes con cáncer de mama y 10 controles, observaron que el miR-205 presenta baja expresión en las pacientes con cáncer de mama comparado con los controles, esto concuerda con los hallazgos en nuestro estudio, mientras que el miR-155 se sobre-expresaba en las pacientes con cáncer de mama, lo cual no pudimos comprobar con el análisis de nuestra muestra.

La baja expresión de miR-205 en cáncer de mama ha sido asociado a su función en la regulación de la transición epitelio-mesenquimal, proceso fundamental en la invasión de cáncer de mama. La baja expresión de miR-205 permite la expresión de represores de transcripción de e-cadherina, proteína de

**Tabla XIII.** Índice de cambio (fold change) del panel de miRNAs en suero de pacientes con cáncer de mama.

<b>miRNA</b>	<b>Índice de cambio (mediana de <math>2^{\wedge-\Delta\Delta Ct}</math>)</b>	<b>Alta o Baja expresión</b>
<b>miR-181a</b>	0.991	Baja
<b>miR-145</b>	0.959	Baja
<b>miR-155</b>	0.997	Baja
<b>miR-205</b>	0.853	Baja



\*El asterisco en las figuras representa diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ )

**Figura 3.** Expresión de A) miR-181a, B) miR-145, C) miR-155 y D) miR-205, entre casos y controles.

adhesión entre células epiteliales, por lo que su inhibición favorece el fenotipo mesenquimal (células con capacidad migratoria) de las células tumorales.

En nuestro estudio, miR-145, miR-155 y miR-181a, no presentaron diferencias en sus niveles de expresión entre casos y controles. Sin embargo, miR-155, ha sido ampliamente reportado con sobreexpresión en suero de casos vs controles (Wang y col., 2010; Mar-Aguilar y col., 2013; Sun y col., 2012; Liu y col., 2013; Zearo y col., 2014; Han y col., 2017). En cuanto a miR-145, existen reportes opuestos, Kodahl y col., 2014 reportó baja expresión en suero de pacientes con cáncer de mama comparado con grupo control, mientras que Mar-Aguilar y col., 2013, observaron una alta expresión en suero de casos vs controles, sin embargo, en el estudio de Kodahl y col., 2014 solo se incluyeron pacientes con receptor de estrógeno positivo, lo podría explicar los resultados opuestos entre estudios.

Mar-Aguilar y col. (2013) evaluaron la expresión de 7 miRNAs en suero de pacientes mexicanas con cáncer de mama (N=61) y grupo control (N=10), entre los cuales miR-145 y miR-155 fueron significativamente altos en los casos respecto a los controles. Adicionalmente evaluaron su eficiencia (porcentaje de sujetos correctamente clasificados en enfermos o sanos) reportando el 94% para miR-145 y 96.4% para miR-155.

Existen estudios donde comparan la expresión de miR-181a, entre suero de pacientes con cáncer de mama y controles en los cuales reportan sobre expresión de miR-181a en las pacientes con cáncer de mama (Wu y col. 2012; Godfrey y col, 2013). Sin embargo, uno de dichos estudios, realizado por Godfrey y col. (2013), quienes inicialmente detectaron la sobreexpresión de miR-181a mediante microarreglos en una muestra grande de casos y controles (205 pacientes por grupo), al realizar una réplica independiente con una muestra pequeña (5 casos y 5 controles) usando qRT-PCR no observaron diferencia de miR181a entre casos y controles. Lo anterior, puede explicar que, debido al

tamaño pequeño de muestra de nuestro estudio, no se observó diferencias entre las pacientes con cáncer de mama y pacientes sanas.

En otro estudio, realizado por Guo y Zhang (2012) observaron una reducción en los niveles de miR-181a en pacientes con cáncer de mama comparado con controles sanos, sin embargo, en su estudio evaluaron a miR-181a-5p, el cual es diferente al de nuestro estudio (miR-181a-3p), la diferencia se refleja en la terminación -5p y -3p, la cual representa la posición de la hebra de miR-181a en el precursor (pre-miRNA) del miRNA maduro. Se sabe que las hebras alternativas pueden mostrar expresión diferente en diferentes muestras, especies o estados patológicos (Desvignes y col., 2015), lo cual explica la diferencia de nuestros hallazgos.

Eichelser y col. (2013), reportan una baja expresión en suero de miR-155 en pacientes con metástasis distante (M1, por su clasificación TNM) comparado con el de pacientes sin metástasis (M0) y mujeres sanas, lo cual sugiere que miR-155 puede indicar la presencia de tumores avanzados, los cuales no fueron considerados en los criterios de selección de nuestro estudio.

En contraste con los reportes antes mencionados, existen estudios con resultados similares al nuestro, donde no observan diferencias entre la expresión de miR-145 y/o miR-155 entre suero de pacientes con cáncer de mama y sanas (Zhu et al., 2009; Heneghan y col., 2010; Eichelser y col., 2013), sin embargo, entre los estudios se observan diferencias en el manejo y procesamiento de muestras, así como en el número de casos y controles, lo que puede afectar los resultados obtenidos.

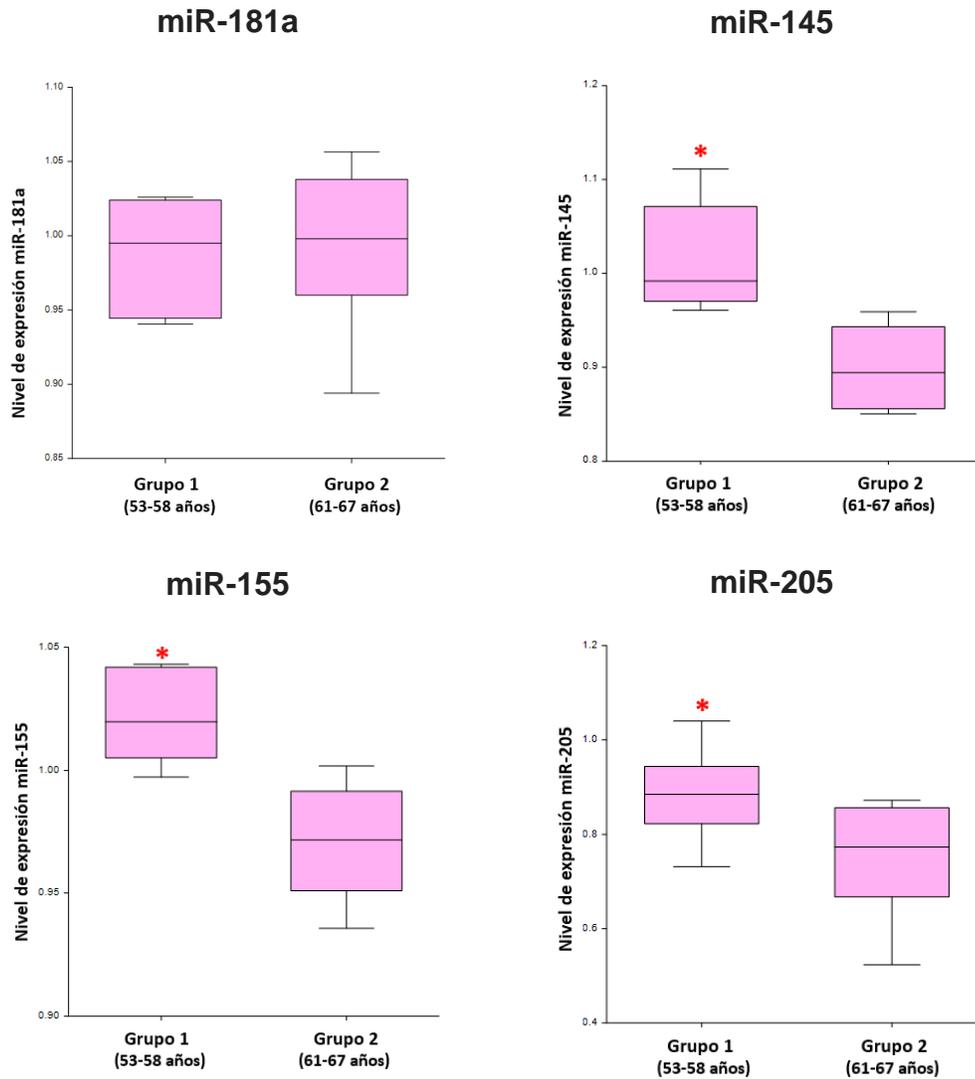
Considerando que en un mayor número de estudios se observan diferencias en la expresión de miR-145 y miR-155 entre casos y controles, al contrario de lo que en este estudio se encontró, debido probablemente al limitado tamaño de muestra en nuestro estudio.

## **Nivel de Expresión vs Grupos de Edad**

Se evaluó la diferencia en los niveles de expresión de los miRNAs en estudio entre grupos de edad mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Para este análisis, se formaron 2 grupos, Grupo 1 (53-58 años de edad) y Grupo 2 (61-67 años de edad). Debido al bajo número de casos en el rango de los 40-49 años con 2 casos y de 30-39 años con 1 caso, estos fueron excluidos del análisis.

El miR-181a no presentó diferencias ( $P=0.69$ ) en sus niveles de expresión respecto a la edad de las pacientes, mientras que los miR-145 ( $P=0.002$ ), miR-155 ( $P=0.004$ ) y miR-205 ( $P=0.04$ ) si presentaron diferencias en sus niveles de expresión respecto al grupo de edad (Ver figura 4). Lo cual sugiere, que un análisis entre casos y variables clínico-patológicas estratificado por edad podría ser necesario, sin embargo, dado las limitaciones en el tamaño de nuestra muestra, así como las variables analizadas, se decidió realizar los siguientes análisis con la mezcla de los datos del grupo 1 y 2.

Previamente, Wang y col. (2010) reportaron variaciones en los niveles de expresión de miR-155 en pacientes con cáncer de mama en relación con la edad de la paciente, observado un incremento en la expresión en las pacientes mayores a 48 años comparado con las menores de 48 años de edad. Aunque en nuestro estudio solo contamos con 2 grupos de edades mayores a 50 años, Grupo 1 (53-58 años de edad) y Grupo 2 (61-67 años de edad), si se observó diferencias entre ambos grupos, con una mayor expresión de miR-155 en Grupo 1 en contraste con el Grupo 2, es necesario contar con un numero de muestra mayor en el rango de edad de los 40 años para poder determinar si se observan diferencias como en el estudio de Wang et al.



\*El asterisco en las figuras representa diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ )

**Figura 4.** Niveles de expresión de los miRNAs en estudio por grupos de edad.

## **Relación de Niveles de Expresión de miRNAs con Características Clínicas-patológicas**

Se evaluó la relación entre los niveles de expresión de los miRNAs en estudio y las características clínico-patológicas. Se analizaron las medianas de los niveles de expresión de miR-181a, miR-145, miR-155 y miR-205 de suero de pacientes con cáncer de mama y evaluó la diferencia de su expresión comparado con las características clínico-patológicas del tumor, para este análisis se excluyeron 3 casos, correspondientes a las edades de 30 y 40 años (n=12).

Debido a que en nuestra muestra no se obtuvieron valores representativos para comparación entre estatus hormonal y Her2 con los niveles de expresión de los miRNAs en estudio, el análisis de estas asociaciones en nuestros datos fue excluido.

### **miR-181a**

En la comparación de medianas de los niveles de expresión del miR-181a con las características clínico-patológicas se encontró que al comparar la mediana de expresión del miR-181a entre las pacientes con estadio clínico I y II, el miR-181 se sobre-expresa en el estadio clínico II (fold change=1.024) a comparación del I (fold change=0.976). Se comprobó si la diferencia entre los niveles de miR-181a entre estadios era estadísticamente significativa mediante la prueba U de Mann Whitney.

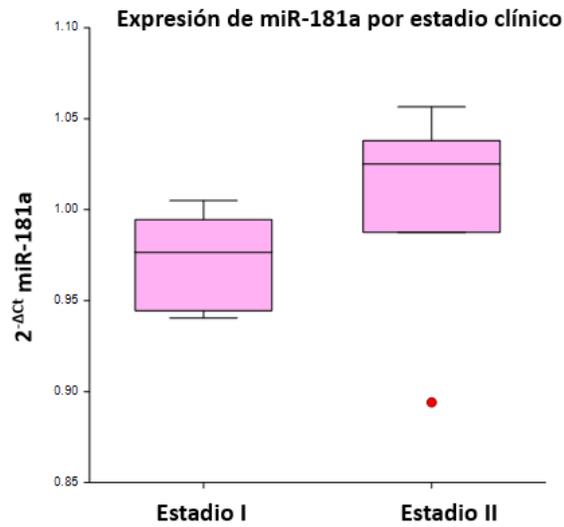
Debido a que se observó un valor atípico, es decir, numéricamente distante del resto de los datos, en los niveles de expresión de miR-181a de las muestras de pacientes con estadio II (Ver figura 5), se procedió a realizar la prueba de Grubbs para detectar outliers.

La prueba de Grubbs determinó que no existen outliers en nuestros datos, sin embargo, se realizó un análisis adicional, en otra serie de datos obtenidos por PCR de la muestra 15 de la cual proviene el dato atípico (fold change=0.894), se calculó su  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  con un valor de expresión de 1.931, lo cual indica sobreexpresión,

que concuerda con el resto de los valores de expresión de miR-181a presentes en las muestras con estadio clínico II. Sin embargo, este valor también es considerado atípico cuando se compara con el resto de las muestras, dato que confirmamos mediante la prueba de Grubbs.

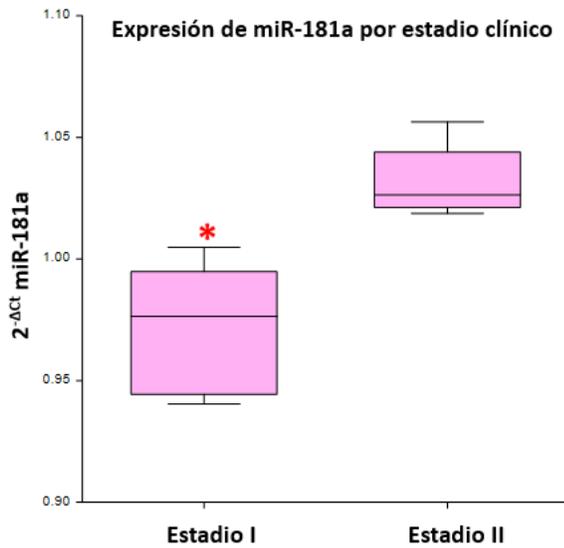
A pesar de que la prueba de Grubbs no identifico al valor de miR-181a de la muestra 15 como valor atípico, se procedió con el análisis de U de Mann Whitney, eliminando dicho dato (fold change=0.894). Se encontró diferencias ( $P=0.004$ ) entre la expresión de miR-181a entre pacientes con estadio clínico I y II, observándose una sobreexpresión (fold change= 1.024) en el estadio II y baja expresión en el estadio I (fold change=0.976) (Ver Figura 6).

En relación a la comparación de medianas de la expresión de miR-181a y la presencia de invasión linfovascular, ganglios linfáticos involucrados y subtipo de cáncer de mama, se observó que el miR-181a se sobre-expresa en las pacientes con invasión linfovascular (fold change=1.018) y ganglios linfáticos involucrados, (fold change=1.022), por el contrario, se observa una baja-expresión de miR-181a en las pacientes que no presentaron invasión linfovascular (fold change=0.991), ni ganglios linfáticos afectados (fold change=0.986). En cuanto a la expresión de miR-181a y el subtipo de cáncer de mama, solo se observó que en las pacientes con subtipo Luminal B se presentó una baja expresión de miR-181a (fold change=0.991) (Tabla XIV).



El punto en los datos del estadio II representa el valor atípico detectado

**Figura 5.** Niveles de expresión de miR-181a por estadio clínico I y II (con valor atípico).



\*El asterisco en las figuras representa diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ )

**Figura 6.** Niveles de expresión de miR-181a por estadio clínico I y II (sin valor atípico).

**Tabla XIV.** Expresión de miR-181a y relación con características clínico-patológicas.

<b>Característica</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Fold change miR-181a</b>	<b>Baja o Alta expresión</b>
<b>Estadio clínico</b>	Estadio I	0.976	Baja
	Estadio II	1.025	Alta
<b>Invasión linfovascular</b>	Si	1.019	Alta
	No	0.991	Baja
<b>Ganglios linfáticos involucrados</b>	Si	1.023	Alta
	No	0.987	Baja
<b>Subtipo</b>	Luminal B	0.991	Baja

En un estudio realizado por McDermott y col. (2014) en sangre total de pacientes con subtipo Luminal A de cáncer de mama, no se encontró diferencia en la expresión de miR-181a en pacientes con o sin presencia de ganglios linfáticos involucrados. En contraste con nuestro estudio, donde se observa una expresión alta de miR-181a (fold change= 1.023) en pacientes con ganglios involucrados. Esta diferencia puede deberse a que en nuestro estudio evaluamos la expresión de miR-181a contra el estado del ganglio linfáticos independiente del subtipo del cáncer de mama que presentaba la paciente. Debido al tamaño reducido de nuestra muestra, no fue posible la agrupación en número de individuos similares del estado de ganglios linfáticos respecto al subtipo luminal.

Considerando que miR-181a, ha sido reportado como mediador del factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el cual induce la transición epitelial-mesenquimal, proceso necesario en el desarrollo de la invasión tumoral y metástasis (Taylor y col., 2013). La relación observada en nuestro estudio, entre la expresión de miR-181a y la presencia de invasión linfovascular y de ganglios linfáticos, podría ser explicada por efecto del miR-181a en el TGF- $\beta$ , sin embargo, es necesario realizar estudios in vitro e in vivo de los efectos de miR-181a y el proceso de invasión en cáncer de mama.

### **miR-145**

En la comparación de medianas de los niveles de expresión del miR-145 con las características clínico-patológicas, solo se detectó diferencias de expresión en relación al subtipo de cáncer de mama. Se observó que las pacientes con clasificación Luminal A, presentan sobreexpresión del miR-145 (fold change=1.027), mientras que las pacientes con clasificación Luminal B (fold change=0.959), se observa una baja expresión del mismo.

Expresión alta en suero de miR-145 en pacientes con cáncer de mama, ha sido asociado con pacientes con diagnóstico positivo para receptor de progesterona comparado con pacientes con resultados negativos (Kodahl y col.,

2014). También se ha reportado baja expresión en suero de miR-145 en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Thakur y col., 2016).

A pesar que en nuestro estudio no se observó relación del miR-145 con características clínico-patológicas, a excepción del subtipo de cáncer de mama, Thakur y col. (2016) reportaron una relación inversa entre la expresión de miR-145 en suero de pacientes cáncer de mama y el grado histológico del tumor, así como estadio clínico, es decir, la expresión de miR-145 disminuye mientras se incrementa el grado histológico de 1 y 2 a 3, así mismo, disminuye mientras se aumenta el estadio clínico de I y II, ha estadios III y IV. Sin embargo, Mar-Aguilar y col. (2013) en población mexicana, no encontraron asociación entre miR-145 en suero con el estadio clínico de cáncer de mama.

### **miR-155**

En la comparación de medianas de los niveles de expresión del miR-155 con las características clínico-patológicas, se observó sobreexpresión del miR-155 en presencia de invasión linfovascular (fold change= 1.001) y ganglios linfáticos involucrados (fold change= 1.004). Este resultado concuerda con lo reportado por Zeng y col. (2014) en un meta-análisis de miR-155 y cáncer de mama, en el cual se observa una sobreexpresión del miR-155 en pacientes con cáncer de mama que presentan ganglios linfáticos con metástasis (Tabla XVI).

A pesar de que en nuestro estudio no se encontró asociación entre miR-155 y estadio clínico de cáncer de mama, Liu y col. (2013) reportan diferencias en la expresión de miR-155 en suero de pacientes con cáncer de mama, con sobreexpresión en el estadio III y baja expresión en forma descendente en los estadios II y I. En contraste con lo reportado por Han y col. (2017) quienes al comparar en suero de pacientes con cáncer de mama la relación entre los niveles

**Tabla XV.** Expresión de miR-155 y relación con características clínico-patológicas.

<b>Característica</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Fold change miR-155</b>	<b>Baja o Alta expresión</b>
<b>Invasión linfovascular</b>	Si	1.001	Alta
	No	0.997	Baja
<b>Ganglios linfáticos involucrados</b>	Si	1.004	Alta
	No	0.993	Baja

de expresión de miR-155 y estadio clínico, observan una sobreexpresión en las pacientes con estadios I y II, comparado con el estadio III.

Han y col. (2017) reportan sobreexpresión de miR-155 en el subtipo triple negativo, lo cual concuerda con el estudio de Wang y col. (2010), quienes observan la sobreexpresión en suero de miR-155 en pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales (ER y PR) negativos, así como sobreexpresión en tumores grado 2 y 3. Debido a que nuestro estudio no se presentó casos triples negativo, no fue posible corroborar dicha relación.

Aunque se ha reportado una concentración de miR-155 significativamente alta en suero de pacientes con cáncer de mama triple negativo y Her2+. Posiblemente, debido a que en nuestro estudio no contamos con casos representativos a estos subtipos, no se encontró una asociación entre el nivel de miR-155 y los subtipos moleculares de cáncer de mama basados en inmunohistoquímica.

### **miR-205**

En nuestra muestra, no se observaron diferencias en las medianas de los niveles de expresión del miR-205 comparado con las características clínico-patológicas. El fold change del miR-205 se mantuvo con baja expresión entre las diferentes variables estudiadas. Liu y col. (2013) también evaluaron la asociación entre los niveles de expresión de miR-205 en suero de pacientes con cáncer de mama y características clínico-patológicas sin encontrar evidencia de correlación.

En relación con la asociación entre la expresión en suero de miR-205 en mujeres con cáncer de mama y su estatus de receptores hormonales, Zeng y col. (2014) reportan baja expresión con receptores hormonales (ER o PR) positivos. Por el contrario, observan una sobreexpresión en Her2 positivos y ganglios linfáticos involucrados.

A pesar de que el miR-205 no presentó asociación con las características clínicas y patológicas del cáncer de mama, es un candidato potencial para el diagnóstico de cáncer de mama, ya que ha sido reportado por poseer alta sensibilidad (86.2%) y especificidad (82.8%) para el diagnóstico de cáncer de mama (Zhang y col., 2015).

Adicionalmente, estudios (Wu y col., 2009; Iorio y col. 2009) han sugerido que miR-205 actúa como supresor de cáncer de mama, por lo que estudios con líneas celulares de cáncer de mama pueden proporcionar mayor información sobre el efecto y relación del miR-205 y el tumor.

Debido a la amplia variación entre el número de individuos durante la subdivisión de grupos con base en las variables clínico-patológicas como tamaño del tumor o estatus de receptor hormonal, así como la baja representación de subtipos de cáncer de mama, Her2 y triple negativo, estas variables no fueron consideradas para su asociación con los niveles de expresión de los miRNAs en estudio.

El contraste observado entre la expresión de miRNAs y su relación con características clínico-patológicas del presente estudio comparado con otros, puede deberse principalmente a la limitación en el tamaño de nuestra muestra y adicionalmente, a las diferencias en los métodos de procesamiento de las muestras (procesos de extracción, plataformas para el análisis). Por lo anterior, se recomienda incrementar el número de muestra para realizar análisis posteriores con el panel de miRNAs propuesto, para validar los resultados obtenidos, así como evaluar su relación con otras variables clínico-patológicas no presentes en la muestra analizada.

## **CONCLUSIONES**

- El nivel de expresión del miRNA-205 puede permitir discriminar entre pacientes con cáncer de mama y voluntarias sanas.
- Se encontró una expresión diferencial de los miR-145, miR-155 y miR-205 con respecto a la edad de las pacientes.
- La sobreexpresión del miR-181a en estadio clínico II con respecto al estadio clínico I puede ser una herramienta complementaria para la clasificación del cáncer de mama.

## BIBLIOGRAFÍA

- Cancer Genome Atlas Network. 2014. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 490(7418): 61-70.
- Cárdenas y col. 2017. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. 7ma ed. Masson Doyma México S.A. Cd de México.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. 2006. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 295(21):2492-502.
- Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva (CNEGSR). 2015. Defunciones de mujeres de 25 años y más por tumor maligno de mama (C50) 2000-2013. *Secretaría de Salud*. Última modificación 04 de febrero de 2015. Disponible en línea:  
<http://www.cnegsr.salud.gob.mx/contenidos/descargas/cama/MortalidadCaMa2000a2013.pdf>
- Chan M, Liaw CS, Ji SM, Tan HH, Wong CY, Thike AA, Tan PH, Ho GH, Lee AS. 2013. Identification of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Detection. *Clinical Cancer Research*. 19(16): 4477-4487
- Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, Singer A, Postlethwait JH. 2015. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet*. 31(11):613-26.
- Do Canto LM, Marian C, Willey S, Sidawy M, Da Cunha PA, Rone JD, Li X, Gusev Y, Haddad BR. 2016. MicroRNA analysis of breast ductal fluid in breast cancer patients. *International Journal of Oncology*. 48:2071-2078
- Eichelsner C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. 2013. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs

- miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clin Chem*. 59(10):1489-96.
- Ferracin M, Lupini L, Salamon I, Saccenti E, Zanzi MV, Rocchi A, Negrini M. 2015. Absolute quantification of cell-free microRNAs in cancer patients. *Oncotarget*. 6(16): 14545-14555.
- Fiannac A, La Rosa M, La Paglia L, Rizzo R, Urso A. 2015. Analysis of miRNA expression profiles in breast cancer using biclustering. *BioMed Central*. 16 (4).
- Gao M, Miao L, Liu M, Li C, Yu C, Yan H, Yin Y, Wang Y, Qi X, Ren J. 2016. miR-145 sensitizes breast cancer to doxorubicin by targeting multidrug resistance-associated protein-1. *Oncotarget*. 7(37):59714-59726.
- Guo LJ & Zhang QY. 2012. Decreased serum miR-181a is a potential new tool for breast cancer screening. *International Journal of Molecular Medicine*. 30: 680-686
- Graveel CR, Calderone HM, Westerhuis JJ, Winn ME, Sempere LF. 2015. Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast Cancer*. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 7: 59-79.
- Godfrey AC, Xu Z, Weinberg CR, Getts RC, Wade PA, DeRoo LA, Sandler DP, Taylor JA. 2015. Serum microRNA expression as an early marker for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort. *Breast Cancer Res*. 15(3):R42. doi: 10.1186/bcr3428.
- Han JG, Jiang YD, Zhang CH, Yang YM, Pang D, Song YN, Zhang GQ. 2017. A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer. *Ann Surg Treat Res*. 92(2):55-66.
- He XH, Zhu W, Yuan P, Jiang S, Li D, Zhang HW, Liu MF. 2016. miR-155 downregulates ErbB2 and suppresses ErbB2-induced malignant transformation of breast epithelial cells. *Oncogene*. 35(46):6015-6025.

- Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. 2010. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *The oncologist*. 15(7): 673-682.
- Huo L, Wang Y, Gong Y, Krishnamurthy S, Wang J, Diao L, Liu CG, Liu X, Lin F, Symmans WF, Wei W, Zhang X, Sun L, Alvarez RH, Ueno NT, Fouad TM, Harano K, Debeb BG, Wu Y, Reuben J, Cristofanilli M, Zuo Z. 2016. MicroRNA expression profiling identifies decreased expression of miR-205 in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol*. 29(4):330-46.
- Hou Y, Wang J, Wang X, Shi S, Wang W, Chen Z. 2016. Appraising MicroRNA-155 as a Noninvasive Diagnostic Biomarker for Cancer Detection. *Medicine*. 95 (2)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2016. Estadística a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). Aguascalientes, Ags. Pg. 1-13
- Iorio MV1, Casalini P, Piovan C, Di Leva G, Merlo A, Triulzi T, Ménard S, Croce CM, Tagliabue E. 2009. microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer. *Cancer Res*. 69(6):2195-200.
- Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H, Liu MF, Wang ED. 2010. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res*. 70(8):3119-27.
- Kastrati I, Canestrari E, Frasor J. 2015. PHLDA1 expression is controlled by an estrogen receptor-NFκB-miR-181 regulatory loop and is essential for formation of ER+ mammospheres. *Oncogene*. 34(18):2309-16.
- Kelly H, Downing T, Tuite NL, Smith TJ, Kerin MJ, Dwyer RM, Clancy E, Barry T, Reddington K. 2015. Cross Platform Standardisation of an Experimental Pipeline for Use in the Identification of Dysregulated Human Circulating MiRNAs. *PLoS One*. 10(9).

- Khoury S, Tran N. 2015. Circulating microRNAs: potential biomarkers for common malignancies. *Biomarkers in medicine*. 9(2): 131-151.
- Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, Cold S, Gravgaard K, Knoop AS, Ditzel HJ. 2014. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: A case control study. *Molecular oncology*. 8: 874-883
- Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S, Zhang J. 2013. Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin J Cancer Res*. 25(1):46-54.
- Lv M, Zhu X, Chen W, Zhao J, Tang J. 2013. Searching for candidate microRNA biomarkers in detection of breast cancer: A meta-analysis. *Cancer Biomarkers*. 13, 395–401
- Maffuz-Aziza A, Labastida-Almendaro S, Espejo-Fonseca A, Rodríguez-Cueva S. 2017. Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. *Cirugía y Cirujanos*. 85(3):201-207
- Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramírez JA, Malagón-Santiago I, Espino-Silva PK., Santuario-Facio SK, Ruiz-Flores P, Reséndez-Pérez D. 2013. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Disease markers*. 34(3): 163-169.
- Mar-Aguilar F, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D. 2014. Use of Serum-Circulating miRNA Profiling for the Identification of Breast Cancer Biomarkers. *Cancer Cell Signaling, Methods in Molecular Biology*. 2da ed. Pp: 263
- Márquez YVA, López ÁPB, Balcázar IB, Aristizábal FA. 2014. Rol biológico y aplicaciones de los miRNAs en cáncer de seno. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 16(1): 188-202.
- Mathe A, Scott RJ, Avery-Kiejda KA. 2015. miRNAs and Other Epigenetic Changes as Biomarkers in Triple Negative Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci*. 16, 28347–28376

- McDermott AM, Miller N, Wall D, Martyn LM, Ball G, Sweeney KJ, Kerin MJ. 2014. Identification and Validation of Oncologic miRNA Biomarkers for Luminal A-like Breast Cancer. *PloS ONE*. 9 (1)
- Melo CA, Melo SA. 2014. Biogenesis and Physiology of MicroRNAs. In Non-coding RNAs and Cancer. *Springer New York*. p. 5-24.
- Min W, Wang B, Li J, Han J, Zhao Y, Su W, Dai Z, Wang X, Ma Q. 2014. The expression and significance of five types of miRNAs in breast cancer. *Med Sci Monit Basic Res*. 20: 97-104
- Nassar FJ, Sabban ME, Zgheib NK, Tfayli A, Boulos F, Jabbour M, El Saghir NS, Talhouk R, Bazarbachi A, Calin GA, Nasr R. 2014. miRNA as Potential Biomarkers of Breast Cancer in the Lebanese Population and in Young Women: A Pilot Study *PloS one*. 9 (9).
- Ng EK, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CP, Ma ES, Kwong A. 2013. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PloS one*. 8(1).
- Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega Rosa, Quintanar-Jurado V, Maffuz-Aziz A, Jimenez-Sanchez G, Bautista-Piña V, Arellano-Llamas R, Hidalgo-Miranda A. 2012. Identification and Pathway Analysis of microRNAs with No Previous Involvement in Breast Cancer. *PLoS ONE*. 7 (3).
- Roth C, Rack B, Müller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H. 2010. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*. 12(6): R90.
- Savad S, Mehdipour P, Miryounesi M, Shirkoohi R, Fereidooni F, Mansouri F, Modarressi MH. 2012. Expression Analysis of MiR-21, MiR-205, and MiR-342 in Breast Cancer in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 13:873-877
- Schmittgen TD y Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 3(6):1101-8.

- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. NOM-041-SSA2-2011.
- Sochor M, Basova P, Pesta M, Dusilkova N, Bartos J, Burda P, Pospisil V, Stopka T. 2014. Oncogenic MicroRNAs: miR-155, miR 19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer*. 14:448
- Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization.
- Shaker O, Maher M, Nassar Y, Nazih G, Samir Z. 2015. Role of microRNAs 29b-2, -155, -197 and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene*.
- Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, Li J. 2012. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PloS one*. 7(10).
- Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D, Schiemann WP. 2013. TGF- $\beta$  upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. *J Clin Invest*. 123(1):150-63.
- Thakur S, Grover RK, Gupta S, Yadav AK, Das BC. 2016. Identification of Specific miRNA Signature in Paired Sera and Tissue Samples of Indian Women with Triple Negative Breast Cancer. *PLoS One*. 11(7)
- Tofigh A, Suderman M, Paquet ER, Livingstone J, Bertos N, Saleh SM, Hallett M. 2014. The prognostic ease and difficulty of invasive breast carcinoma. *Cell reports*. 9(1), 129-142.
- Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkle B. 2013. Circulating miRNAs: cell-cell communication function?. *Frontiers in genetics*. 4
- Wang F, Zheng Z, Guo J, Ding X. 2010. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol Oncol*. 119(3):586-93.

- Wang F, Hou J, Jin W, Li J, Yue Y, Jin H, Wang X. 2014. Increased Circulating MicroRNA-155 as a Potential Biomarker for Breast Cancer Screening: A Meta-Analysis. *Molecules*. 19
- Wu H, Zhu S, Mo YY. 2009. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res*. (4):439-48.
- Wu Q, Wang C, Lu Z, Guo L, Ge Q. 2012. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clin Chim Acta*. 413(13-14):1058-65.
- Wu X, Zeng R, Wu S, Zhong J, Yang L, Xu J. 2015. Comprehensive expression analysis of miRNA in breast cancer at the miRNA and isomiR levels. *Gene*. 557: 195–200
- Ye P, Shi Y, An N, Zhou Q, Guo J, Long X. 2018. miR-145 overexpression triggers alteration of the whole transcriptome and inhibits breast cancer development. *Biomed Pharmacother*. 100:72-82.
- Zaleska K. 2015. miRNA–Therapeutic tool in breast cancer? Where are we now?. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 20(2): 79-86.
- Zearo S, Kim E, Zhu Y, Zhao JT, Sidhu SB, Robinson BG, Soon PSh. 2014. MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers. *BMC Cancer*. 14:200.
- Zeng H, Fang C, Nam S, Cai S, Long X. 2014. The Clinicopathological Significance of MicroRNA-155 in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *BioMed Research International*.
- Zhang H, Fan Q. 2015. MicroRNA-205 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer by regulating AMOT expression. *Oncol Rep* . 34: 2163-2170
- Zhang H, Li B, Zhao H, Chang J. 2015. The expression and clinical significance of serum miR-205 for breast cancer and its role in detection of human cancers. *Int J Clin Exp Med*. 8 (2): 3034-3043

- Zheng M, Sun X, Li Y, Zuo W. 2016. MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. *Tumour Biol.* 37(6):8189-96.
- Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER. 2009. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Research Notes.* 2:89
- Zhu J, Zheng Z, Wang J, Sun J, Wang P, Cheng X, Li Z. 2015. Different miRNA expression profiles between human breast cancer tumors and serum. *Frontiers in genetics.* 5.

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Consentimiento Informado para Casos

#### Cuantificación de miRNAs en mujeres con cáncer de mama y su relación con características clínico-patológicas

##### CONSENTIMIENTO INFORMADO

El presente documento está dirigido a mujeres con diagnóstico de cáncer de mama como invitación a participar en el proyecto de investigación titulado “Cuantificación de miRNAs en mujeres con cáncer de mama y su relación con características clínico-patológicas”, realizado por investigadores de la Universidad de Sonora.

Le pedimos tomarse su tiempo para leer cuidadosamente este documento, expresar cualquier duda que usted tenga, puede comentarlo con su médico, familiar o con quien se sienta más cómoda. Solamente deberá acceder a participar en este estudio cuando haya comprendido la información de manera que pueda tomar una decisión informada respecto a su participación.

##### **¿Por qué y para qué se realiza este estudio?**

El objetivo de este estudio es cuantificar un nuevo biomarcador conocido como “microRNAs”, el cual puede ser detectado en muestras de sangre, tejido y saliva, y que en ciertos niveles podría indicar la presencia de cáncer de mama, dicho estudio podría complementar los métodos actuales de detección y diagnóstico de esta enfermedad. Es importante observar que este estudio no implica el uso de medicamentos en fase de investigación. El tratamiento que recomienda su médico para usted no estará basado en nuestra investigación, usted recibirá el tratamiento estándar para cáncer de mama indicado por su institución de salud.

##### **¿Quiénes pueden participar en el estudio?**

Mujeres con diagnóstico de cáncer de mama que aún no hayan sido sometidas a ningún tratamiento para la enfermedad.

##### **¿Qué pasará si participo en este estudio de investigación?**

En caso de que usted decida participar, se le solicitarán las siguientes muestras:

- Se le tomará la muestra de sangre (alrededor de 3 a 4 cucharaditas de té) posterior a la confirmación de su diagnóstico, pero previo a su cirugía o cualquier tratamiento de cáncer de mama. Se le tomará otra muestra de sangre posterior a su cirugía.
- Del tejido obtenido en su cirugía, se solicitará muestra de su tumor y tejido normal adyacente en bloque de parafina y de congelado en fresco (alrededor de 500 a 1000 mg), dentro del laboratorio de patología del hospital en el cual se atiende, dicha muestra no afectará el diagnóstico de su cáncer.
- Se le solicitará una muestra de saliva (2-5 ml en un tubo estéril), la cual se colectará por la mañana, en ayuno y antes de que reciba cualquier tipo de tratamiento para cáncer de mama.

Se le solicitará responder a un cuestionario de factores de riesgo de cáncer de mama que incluye preguntas acerca de su historial reproductivo, antecedentes de cáncer en su familia y factores de riesgo relacionados a padecer cáncer de mama. Adicionalmente, se obtendrá información de su expediente clínico dentro de su Hospital para conocer más

acerca de las características de su enfermedad. Esta información mejorará nuestra comprensión de las características clínicas y epidemiológicas del cáncer de mama en las mujeres mexicanas.

**¿Cuál será el uso de mis muestras para investigación?**

El material genético obtenido de sus muestras, será codificado, almacenado y estudiado en el Laboratorio de Investigación en Cáncer de la Universidad de Sonora. Como parte del proyecto, una cantidad específica del material genético será utilizada para realizar la investigación. Si usted está de acuerdo, las muestras sobrantes de sangre, tejido, saliva y material genético podrían ser almacenadas y utilizadas en futuras investigaciones relacionadas con cáncer de mama. Ninguna persona ajena al proyecto recibirá información relacionada con usted ni con sus muestras. Si es su deseo, usted podrá retirar sus muestras en cualquier momento del estudio, haciendo la solicitud por escrito a los investigadores responsables.

**¿Puedo dejar de participar en el estudio?**

Sí. Usted puede decidir retirar su consentimiento en cualquier momento. Su participación en este estudio es completamente voluntaria, lo que usted decida no afectará de manera alguna la atención médica que usted recibe en su institución de salud.

**¿Cuáles son los efectos secundarios o riesgos que puedo esperar de participar en el estudio?**

Para la toma de muestra de sangre es posible presentar efectos secundarios como aparición de pequeños hematomas en la zona de punción, sin embargo, estos desaparecerán transcurridos 1 o 2 días (son los mismos que ocurrirían en análisis de rutina).

**¿Existen beneficios por participar en el estudio?**

La investigación que se llevará a cabo con sus muestras no ofrece beneficios inmediatos para usted. Sin embargo, al conocer el comportamiento de estos biomarcadores podría ayudar a personas que padezcan de cáncer y otras enfermedades en el futuro. Los beneficios de la investigación que emplea sangre y tejido, incluyen aprender más acerca del cáncer, cómo diagnosticarlo y cómo tratarlo. Los informes acerca de la investigación llevada a cabo con sus muestras no se agregarán a su historial médico, no se entregarán a usted o a su médico. Usted puede tener acceso a los resultados si lo solicita a los investigadores del estudio, sin embargo, la información obtenida no tendrá efecto alguno en los cuidados y atención que usted reciba. Es muy importante mencionar que los resultados obtenidos serán publicados en revistas científicas.

**¿Se mantendrá la privacidad de mi información médica?**

Nos aseguraremos que su información personal se mantenga confidencial. En este estudio, la información obtenida de sus muestras, cuestionario y expediente clínico será registrada en una base de datos electrónica donde se eliminará su información personal y sólo se le identificará mediante un número de estudio. Solo los investigadores responsables del estudio podrán tener acceso a la información obtenida. Si la información de este estudio se publica o se presenta en una reunión científica, congreso o publicación, no se utilizará su nombre u otros datos personales que permitan conocer su identidad. La información genética que obtengamos de su participación en este estudio, no se compartirá con compañías de seguros médicos, ni empleadores, en conformidad con el artículo 16 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

**¿Cuáles son los costos de participar en el estudio?**

No habrá cargo alguno para usted o su institución de salud por los estudios de investigación que se realizarán con sus muestras.

**¿Me pagarán por participar en este estudio?**

Usted no recibirá pago alguno por participar en el estudio. Sus muestras se utilizarán sólo para fines de investigación y no se venderán.

**¿Quién puede responder mis preguntas respecto al estudio?**

Si usted tiene alguna otra pregunta acerca del estudio, puede llamar a la Biol. Alejandra López Vázquez al cel. 044-66-21-95-37-60. En otro caso, puede llamar a los investigadores responsables del estudio, Dr. Humberto Francisco Astiazarán García, al 2-89-24-00, ext. 287 y Dr. Iván Anduro Corona, al 044-66-21-94-44-82 de lunes a viernes en horario de 9:00 am a 5:00 pm (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., CIAD A.C.). Si desea hacer preguntas acerca del estudio o sus derechos como participante en una investigación a alguien que no sea el médico o el coordinador del estudio, o si desea expresar cualquier problema o inquietud que pudiera tener acerca del estudio, le pedimos que llame al Dr. Gerardo Álvarez Hernández al teléfono 2-59-21-21, ext. 17 (presidente de la Comisión de Bioética e Investigación de la Universidad de Sonora), en horario de 2:00 pm a 8:00 pm, de lunes a viernes.

**Al firmar el siguiente formato de consentimiento, usted está de acuerdo en que sus muestras de sangre, tejido y saliva obtenidas en este estudio serán utilizadas para fines de investigación y está de acuerdo en contestar el cuestionario de factores de riesgo de cáncer de mama.**

---

**Consentimiento**

Además, se le pedirá que firme el siguiente formato para autorizar el acceso a su información de salud. Usted recibirá copias de este formato de consentimiento.

LA PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN ES VOLUNTARIA. Usted tiene derecho a negarse a participar o a retirarse en cualquier momento en este estudio sin poner en peligro su atención y cuidados médicos. Su médico puede decidir retirarla de este estudio con o sin su consentimiento si es lo más conveniente para usted en términos médicos.

**Firma**

He leído todo lo anterior, he hecho preguntas y recibido respuestas sobre lo que no comprendía. Tuve la oportunidad de llevarme este formato a casa para su revisión o comentarios. Si usted desea participar en este estudio, sírvase firmar al calce.

Nombre de la participante: \_\_\_\_\_

Firma de la participante: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Relación con la participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Relación con la participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Nombre de persona que obtiene el consentimiento: \_\_\_\_\_

Firma de persona que obtiene el consentimiento: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

## **Apéndice 2. Consentimiento Informado para Controles**

### **Cuantificación de miRNAs en mujeres con cáncer de mama y su relación con características clínico-patológicas**

#### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El presente documento está dirigido a mujeres que recientemente (dentro de 6 meses) han tenido un diagnóstico negativo a cáncer de mama u otra anomalía mediante mamografía y no han padecido algún tipo de cáncer; para invitarlas a participar como grupo control en el proyecto de investigación titulado “Cuantificación de miRNAs en mujeres con cáncer de mama y su relación con características clínico-patológicas”, el cual se realiza por investigadores de la Universidad de Sonora.

Le pedimos tomarse su tiempo para leer cuidadosamente este documento, expresar cualquier duda que usted tenga, puede comentarlo con su médico, familiar o con quien se sienta más cómoda. Solamente deberá acceder a participar en este estudio cuando haya comprendido la información de manera que pueda tomar una decisión informada respecto a su participación.

#### **¿Por qué y para qué se realiza este estudio?**

El objetivo de este estudio es cuantificar un nuevo biomarcador conocido como “microRNAs”, el cual puede ser detectado en muestras de sangre, tejido y saliva, y que en ciertos niveles podría indicar la presencia de cáncer de mama, dicho estudio podría complementar los métodos actuales de detección y diagnóstico de esta enfermedad. Para realizar este estudio es necesario obtener muestras tanto de mujeres con cáncer de mama como de mujeres sanas, para poder comparar la presencia de dicha molécula.

#### **¿Qué pasará si participo en este estudio de investigación?**

En caso de que usted decida participar, se le tomará una muestra de sangre (alrededor de 2 a 3 cucharaditas de té) posterior a que se haya realizado una mamografía (dentro de 6 meses) y se confirme por dicho estudio que no presenta cáncer de mama o anomalías en sus senos.

Además de las muestras de sangre, se le solicitará responder a un cuestionario de factores de riesgo de cáncer de mama, que incluye preguntas acerca de su historial reproductivo, antecedentes de cáncer en su familia y otras condiciones de salud. Esta información mejorará nuestra comprensión de las características epidemiológicas de las mujeres mexicanas.

#### **¿Cómo usarán mis muestras en la investigación?**

El material genético obtenido de su muestra, será codificado, almacenado y estudiado en el Laboratorio de Investigación en Cáncer de la Universidad de Sonora. Como parte del proyecto, una cantidad específica del material genético será utilizada para realizar la investigación. Si usted está de acuerdo, las muestras sobrantes de sangre y material genético podrían ser almacenadas y utilizadas en futuras investigaciones relacionadas con cáncer de mama. Ninguna persona ajena al proyecto recibirá información relacionada con usted ni con sus muestras. Si es su deseo, usted podrá retirar sus muestras en cualquier momento del estudio, haciendo la solicitud por escrito a los investigadores responsables.

#### **¿Puedo dejar de participar en el estudio?**

Sí. Usted puede decidir retirar su consentimiento en cualquier momento. Su participación en este estudio es completamente voluntaria, lo que usted decida no afectará de manera

alguna los cuidados y atención que usted recibe en su institución de salud.

**¿Cuáles son los efectos secundarios o riesgos que puedo esperar de participar en el estudio?**

Para la toma de muestra de sangre es posible presentar efectos secundarios como aparición de pequeños hematomas en la zona de punción, sin embargo, estos desaparecerán transcurridos 1 o 2 días (son los mismos que ocurrirían en análisis de rutina).

**¿Existen beneficios por participar en el estudio?**

La investigación que se llevará a cabo con su muestra no ofrece beneficios inmediatos para usted. Sin embargo, al conocer el comportamiento de estos biomarcadores podría ayudar a personas que padezcan de cáncer y otras enfermedades en el futuro. Los beneficios de la investigación incluyen aprender más acerca del cáncer, cómo diagnosticarlo y cómo tratarlo. Si la información de este estudio se publica o se presenta en una reunión científica, congreso o publicación, no se utilizará su nombre u otros datos personales que permitan conocer su identidad.

Los informes acerca de la investigación llevada a cabo con su muestra no se entregarán a usted o a su médico. Estos informes no se agregarán a su historial médico. La investigación no tendrá efecto alguno en los cuidados y atención que usted reciba. Sin embargo, en caso de detectar características anormales en su muestra que pudieran sugerir la presencia de cáncer de mama, esto se le será informado a usted y a su médico, siendo su médico quien determine el plan de monitoreo más apropiado para usted.

**¿Se mantendrá la privacidad de mi información médica?**

Nos aseguraremos que su información personal se mantenga confidencial. En este estudio, la información obtenida de sus muestras, cuestionario y expediente clínico será registrada en una base de datos electrónica donde se eliminará su información personal y sólo se le identificará mediante un número de estudio. Solo los investigadores responsables del estudio podrán tener acceso a la información obtenida. Si la información de este estudio se publica o se presenta en una reunión científica, congreso o publicación, no se utilizará su nombre u otros datos personales que permitan conocer su identidad. La información genética que obtengamos de su participación en este estudio, no se compartirá con compañías de seguros médicos, ni empleadores, en conformidad con la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, artículo 16 de México.

**¿Cuáles son los costos de participar en el estudio?**

No habrá cargo alguno para usted o su institución de salud por los estudios de investigación que se realizarán con su muestra de sangre.

**¿Me pagarán por participar en este estudio?**

Usted no recibirá pago alguno por participar en el estudio. Su muestra de sangre se utilizará sólo para fines de investigación y no se venderá.

**¿Quién puede responder mis preguntas respecto al estudio?**

Si usted tiene alguna otra pregunta acerca del estudio, puede llamar a la Biol. Alejandra López Vázquez al cel. 044-66-21-95-37-60. En otro caso, puede llamar a los investigadores responsables del estudio, Dr. Humberto Francisco Astiazarán García, al 2-89-24-00, ext. 287 y Dr. Iván Anduro Corona, al 044-66-21-94-44-82 de lunes a viernes en horario de 9:00 am a 5:00 pm (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., CIAD A.C.). Si desea hacer preguntas acerca del estudio o sus derechos como participante en una investigación a alguien que no sea el médico o el coordinador del estudio, o si desea expresar cualquier problema o inquietud que pudiera tener acerca

del estudio, le pedimos que llame al Dr. Gerardo Álvarez Hernández al teléfono 2-59-21-21, ext. 17 (presidente de la Comisión de Bioética e Investigación de la Universidad de Sonora), en horario de 2:00 pm a 8:00 pm, de lunes a viernes.

**Al firmar el siguiente formato de consentimiento, usted está de acuerdo en que su muestra de sangre obtenida en este estudio sea utilizada para fines de investigación y está de acuerdo en contestar el cuestionario de factores de riesgo de cáncer de mama.**

---

### **Consentimiento**

Además, se le pedirá que firme el siguiente formato para autorizar el acceso a su información de salud. Usted recibirá copias de este formato de consentimiento.

LA PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN ES VOLUNTARIA. Usted tiene derecho a negarse a participar o a retirarse en cualquier momento en este estudio sin poner en peligro su atención y cuidados médicos. Su médico puede decidir retirarla de este estudio con o sin su consentimiento si es lo más conveniente para usted en términos médicos.

### **Firma**

He leído todo lo anterior, he hecho preguntas y recibido respuestas sobre lo que no comprendía. Tuve la oportunidad de llevarme este formato a casa para su revisión o comentarios.

Si usted desea participar en este estudio, sírvase firmar al calce.

Nombre de la participante: \_\_\_\_\_

Firma de la participante: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Relación con la participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Relación con la participante: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Nombre de persona que obtiene el consentimiento: \_\_\_\_\_

Firma de persona que obtiene el consentimiento: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_



## SECCIÓN B. ESTATUS SOCIOECONÓMICO

1. ¿Cuál es el grado más alto (o año) de la escuela que ha completado? (marque uno)  
Primaria: 01 02 03 04 05 06  
Secundaria: 07 08 09  
Preparatoria: 10 11 12  
Universidad: 13 14 15 16 17+
  
2. ¿Cuál es el grado más alto que usted obtuvo?  
Constancia de primaria  
Constancia de secundaria  
Constancia de preparatoria  
Diploma de Licenciatura  
Diploma de Maestría  
Diploma de Doctorado  
Ninguno de los anteriores, por favor especificar otro: \_\_\_\_\_
  
3. ¿Cuál ha sido la ocupación que ha realizado (o realiza) por más tiempo? ¿Por cuantos años? Ocupación: \_\_\_\_\_ |\_\_|\_\_| años de ocupación
  
4. ¿Cuántas personas viven en su casa, incluida usted? |\_\_|\_\_|  
a) De estas personas, ¿Cuántos son niños de  $\leq 18$  años de edad? |\_\_|\_\_|
  
5. ¿Cuál de las siguientes categorías describe mejor su ingreso familiar total de su hogar durante los últimos 12 meses? esto debe incluir los ingresos de todas las fuentes, salarios, rentas, seguridad social, pensiones, ayuda de familiares (incluyendo pagos de pensión alimenticia).  
 < \$2000  
 \$2000 - < \$4000  
 \$4000 - < \$6000  
 \$6000 - < \$8000  
 \$10,000 - < \$12,000  
  $\geq$  \$12,000  
 No sabe/No está segura  
 Rechazo responder
  
6. ¿Cuántas personas en su casa dependen de dicho ingreso total?  
|\_\_|\_\_| Número de personas

### SECCION C. HISTORIAL PERSONAL Y FAMILIAR DE CÁNCER

#### a) Historial personal de cáncer

1. Hasta hace un año antes de su diagnóstico actual, ¿Alguna vez le han realizado una cirugía de mama, biopsia por aspiración o con aguja, remoción de un bulto, alargamiento o reducción mamaria?  
 Si  
 No (Pase a la siguiente sección, b)
2. ¿Cuál de los siguientes procedimientos le han sido realizados en sus mamas?  
 Biopsia por aspiración o con aguja  
 Remoción parcial de la mama  
 Remoción total de la mama  
 Reducción de mamas  
 Aumento de mamas  
 Otro (especifique) \_\_\_\_\_
3. ¿En qué seno le realizaron el(los) procedimiento(s)?  
 Mama derecha  
 Mama izquierda  
 Ambas
4. ¿Cuántos años tenía cuando le realizaron el(los) procedimiento(s)?  
|\_\_|\_\_| Edad
5. Hasta hace un año antes de su diagnóstico actual, ¿Cuál de los siguientes diagnósticos fue de?  
Diagnóstico:  
 Quiste  
 Enfermedad fibroquística  
 Fibroadenoma  
 Hiperplasia  
 Hiperplasia atípica  
 Carcinoma lobular in situ  
 Carcinoma ductal in situ  
 Otro (especificar tipo): \_\_\_\_\_  
 No anormal  
 No sabe
6. Antes de su diagnóstico actual de cáncer, ¿Alguna vez un médico le diagnosticó cáncer?  
 Si  
 No (Pase a la pregunta 4)
7. ¿Qué tipo de cáncer diagnosticó su médico? ¿En qué parte de su cuerpo inició?

---

Tipo	Lugar donde inició
------	--------------------

8. ¿En qué año le fue diagnosticado?

|\_|\_|\_|\_| Año

9. ¿Ha recibido alguna vez quimioterapia para cáncer de mama?

Si

No

10. ¿Ha recibido radioterapia?

Si

No

11. ¿Ha recibido cualquier otro tipo de terapia para cáncer de mama?

Si

No

**b) Historial familiar de cáncer**

Las siguientes preguntas son acerca de su historial familiar de cáncer, le pedimos que por favor realice un esfuerzo en recordar si alguno de sus familiares presentó cualquier tipo de cáncer o tumor, respondiendo a las siguientes preguntas.

1. ¿Su padre y/o madre ha sido diagnosticado con cáncer o tumor?

Si (ingresar información en tabla)

No

No sabe

Padres	¿Vivo?	¿Edad actual o al fallecer?	¿Diagnóstico de cáncer o tumor?	Tipo de cáncer o sitio del tumor (Excluya metástasis)	Edad del diagnóstico
Padre	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
Madre	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe

2. ¿Cuántos hermanos y hermanas tiene o tuvo en total?

|\_|\_| Hermanas

|\_|\_| Hermanos

3. Entre sus hermanos o hermanas ¿Alguno ha sido diagnosticado con cáncer o tumor?

Si (ingresar información en tabla)

No

No sabe

**Tabla de hermanas y hermanos**

No.	Sexo	¿Vivo?	¿Edad actual o al fallecer?	¿Diagnóstico de cáncer o tumor?	Tipo de cáncer o sitio del tumor (Excluya metástasis)	Edad del diagnóstico
1	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
2	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
3	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
4	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
5	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe

4. ¿Cuántas hijas e hijos tiene o tuvo en total?

|\_|\_| Hijas

|\_|\_| Hijos

5. ¿Alguno ha sido diagnosticado con cáncer o tumor?

Si (ingresar información en tabla)

No

No sabe

**Tabla de hijas e hijos**

No.	Sexo	¿Vivo?	¿Edad actual o al fallecer?	¿Diagnóstico de cáncer o tumor?	Tipo de cáncer o sitio del tumor (Excluya metástasis)	Edad del diagnóstico
1	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe
2	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe
3	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe
4	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe
5	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe

**c) Historial familiar de cáncer, familia materna**

Las siguientes preguntas corresponden al historial familiar de cáncer por parte de su madre (abuelo, abuela, tías y tíos).

- ¿Su abuelo y/o abuela materna han sido diagnosticados con cáncer o tumor?
  - Si (ingresar información en tabla)
  - No
  - No sabe

Abuelos maternos	¿Vivo?	¿Edad actual o al fallecer?	¿Diagnóstico de cáncer o tumor?	Tipo de cáncer o sitio del tumor (Excluya metástasis)	Edad del diagnóstico
Abuela materna	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe
Abuelo materno	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_____ Edad <input type="checkbox"/> No sabe

6. ¿Cuántas tías y tíos maternos tiene o tuvo en total?

|\_|\_| Tías maternas

|\_|\_| Tíos maternos

7. ¿Alguno ha sido diagnosticado con cáncer o tumor?

Si (ingresar información en tabla)

No

No sabe

No.	Sexo	Parentesco	¿Vivo?	¿Edad actual o al fallecer?	Tipo de cáncer o sitio del tumor (Excluya metástasis)	Edad del diagnóstico
1	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
2	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
3	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
4	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
5	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
6	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
7	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe

### Tabla de tías y tíos maternos

#### d) Historial familiar de cáncer, familia paterna

Las siguientes preguntas corresponden al historial familiar de cáncer por parte de su padre (abuelo, abuela, tías y tíos).

2. ¿Su abuelo y/o abuela paternos han sido diagnosticados con cáncer o tumor?

Si (ingresar información en tabla)

No

No sabe

Abuelos paternos	¿Vivo?	¿Edad actual o al fallecer?	¿Diagnóstico de cáncer o tumor?	Tipo de cáncer o sitio del tumor (Excluya metástasis)	Edad del diagnóstico
Abuela paterna	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
Abuelo paterno	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe

8. ¿Cuántas tías y tíos paternos tiene o tuvo en total?

|\_|\_| Tías paternas

|\_|\_| Tíos paternos

9. ¿Alguno ha sido diagnosticado con cáncer o tumor?

Si (ingresar información en tabla)

No

No sabe

#### Tabla de tías y tíos paternos

No.	Sexo	Parentesco	¿Vivo?	¿Edad actual o al fallecer?	Tipo de cáncer o sitio del tumor (Excluya metástasis)	Edad del diagnóstico
1	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
2	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
3	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
4	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
5	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
6	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe
7	<input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Masculino	_____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	_____	_ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe

## SECCIÓN D. FACTORES HORMONALES Y REPRODUCTIVOS

---

### a) Menstruación

1. ¿A qué edad inició su menstruación?  
|\_|\_| Edad  
 No sabe
  
2. ¿Ha menstruado en los últimos 12 meses?  
 Si, todavía tengo ciclos menstruales (pase a la pregunta 5)  
 Si, pero mis ciclos menstruales se detuvieron dentro del último año  
 No, mi ciclo menstrual se detuvo hace más de un año  
 No sabe
  
3. ¿Cuándo fue su última menstruación?  
|\_|\_|/|\_|\_||\_|\_| o |\_|\_|  
Mes Año edad  
 No sabe
  
4. ¿Cuál de los siguientes describe mejor porque su ciclo menstrual se detuvo?  
 Embarazo reciente  
 Lactancia materna  
 Anticonceptivos o medicamentos  
 La menopausia natural  
 Cirugía para extirpar el útero o los ovarios  
 Otra (especificar) \_\_\_\_\_  
 No sabe

---

### b) Embarazos y lactancia

5. ¿Alguna vez ha estado embarazada?  
 Si  
 No (Pase a la pregunta 14)
  
6. ¿Qué edad tenía la primera vez que quedó embarazada?  
|\_|\_| Años  
 No sabe
  
7. ¿Cuántas veces ha estado embarazada? Por favor incluya mortinatos, abortos involuntarios, abortos, embarazos ectópicos y nacidos vivos.  
|\_|\_| Número de embarazos en total
8. ¿Cuántos de sus embarazos resultaron en nacidos vivos?  
|\_|\_| Número de embarazos nacidos vivos

9. ¿Cuál era su edad en el nacimiento de su primer hijo nacido vivo?  
|\_|\_| Edad  
 No sabe
10. ¿Cuál era su edad en el nacimiento de su último hijo nacido vivo?  
|\_|\_| Edad  
 No sabe
11. ¿Alguna vez tomo medicamento u hormona como ayuda para quedar embarazada o mantener un embarazo?  
 Si  
 No (Pase a la pregunta 13)
12. ¿Recuerda el nombre del medicamento que tomó, o si este estaba compuesto de hormonas? Especificar: \_\_\_\_\_
13. ¿Amamantó a alguno de sus hijos?  
 Si  
 No (Pase a la pregunta 16)
14. ¿Cuál era su edad cuando amamanto por primera vez?  
|\_|\_| Edad
15. Pensando en todos sus hijos(as) ¿Por cuánto tiempo, semanas o meses, en total los amamanto?  
|\_|\_| Semanas  
O  
|\_|\_| Meses

---

**c) Historial de cirugía ginecológica**

16. ¿Alguna vez ha tenido histerectomía, es decir, han sido removidos su útero o matriz?  
 Si  
 No (Pase a la pregunta 16)  
 No sabe (Pase a la pregunta 16)
17. ¿Cuál era su edad cuando le removieron su útero o matriz?  
|\_|\_| Edad
18. ¿Cuántos de sus ovarios han sido removidos?  
 Ninguno (Pase a la pregunta 15)  
 Eliminación parcial de uno o ambos ovarios  
 Un ovario  
 Ambos ovarios  
 Otro (Por favor especifique \_\_\_\_\_)  
 No sabe

19. ¿A qué edad fue su más reciente remoción de uno o ambos ovarios?

|\_|\_| Edad

20. ¿Ha tenido ligadura de trompas, es decir, han atado sus trompas de Falopio?

Si

No

No sabe

---

**d) Uso de anticonceptivos**

21. ¿Alguna vez ha tomado pastillas anticonceptivas por cualquier motivo (método anticonceptivo, regular los periodos menstruales, acné, etc.)?

Si

No (Pase a la pregunta 26)

No sabe (Pase a la pregunta 26)

22. ¿Qué edad tenía cuando empezó a tomar pastillas anticonceptivas?

|\_|\_| Edad

23. ¿Por cuantos meses o años en total ha usado pastillas anticonceptivos?

|\_|\_| Meses

|\_|\_| Años

24. ¿Qué edad tenía cuando dejó de usar pastillas anticonceptivas?

|\_|\_| Edad

Todavía tomo pastillas anticonceptivas

25. ¿Usa o usó alguno de los siguientes anticonceptivos?

Tipo de anticonceptivo	Si	No	No sabe	Edad en la que inicio su uso	Edad en la que dejo de usarlo	¿Por cuantos años?	
Inyecciones	[ ]	[ ]	[ ]	_ _	_ _	_ _	No sabe
Parche hormonal	[ ]	[ ]	[ ]	_ _	_ _	_ _	No sabe
Anillo vaginal	[ ]	[ ]	[ ]	_ _	_ _	_ _	No sabe
Dispositivo intrauterino (DIU)	[ ]	[ ]	[ ]	_ _	_ _	_ _	No sabe
Otro (especifique)_____	[ ]	[ ]	[ ]	_ _	_ _	_ _	No sabe

---

**e) Hormonas post-menopausia**

A veces las mujeres toman hormonas femeninas, como el estrógeno o progesterona durante o después de la menopausia para controlar sus síntomas como los bochornos. Las siguientes preguntas son acerca del uso de dichas hormonas, a menudo llamadas terapia de reemplazo hormonal o terapia hormonal para la menopausia.

26. ¿Alguna vez ha usado terapia de reemplazo hormonal?
- Si
  - No (Fin de preguntas hormonales)
  - No sabe (Fin de preguntas hormonales)
27. ¿Aproximadamente a qué edad comenzó a tomar la terapia de reemplazo hormonal?
- |\_|\_| Edad
28. ¿Aproximadamente a qué edad dejó de tomar la terapia de reemplazo hormonal?
- |\_|\_| Edad
- Aun tomo terapia de reemplazo hormonal
29. ¿Por cuantos meses o años en total ha usado la terapia de reemplazo hormonal?
- |\_|\_| Meses
- O
- |\_|\_| Años
30. ¿Qué tipo de terapia de reemplazo hormonal ha tomado durante el mayor período de tiempo?
- Pastillas de estrógeno
  - Pastillas de progesterona/ progestina
  - Pastillas de estrógeno y progesterona/progestina en la misma píldora o en diferentes píldoras
  - Cremas de estrógeno, inyecciones o parches
  - Cremas de progesterona/progestina, inyecciones o parches
  - Cremas de estrógeno y progesterona/progestina, inyecciones o parches
  - No sabe

**SECCIÓN E. CONSUMO DE CIGARROS**

**a) ACTIVO**

1. En toda su vida, ¿ha fumado 100 cigarrillos o más?
- Si
  - No (Pase a la siguiente sección)
2. Actualmente ¿fuma cigarrillos? (Seleccione la opción "Si" incluso si sólo fuma algunos días)
- Si**

- a. En promedio, ¿Cuántos cigarrillos al día fuma usted? (Si es menos de 1 cigarrillo al día, marcar 00)  
 |\_|\_| Cigarrillos
- b. ¿A qué edad empezó usted a fumar regularmente?  
 |\_|\_| Años de edad
- c. ¿Por cuántos años ha fumado, sin contar los períodos de tiempo en los que dejo de fumar?  
 |\_|\_| Años  
 **No**
- a. ¿Qué edad tenía la última vez que usted dejo de fumar cigarrillos?  
 |\_|\_| Años de edad
- b. ¿Ha dejado de fumar debido a que tenía un problema de salud grave que fue causado o agravado por fumar?  
 Si  No
- c. En promedio, cuando fumaba, ¿Cuántos cigarrillos al día fumaba? (Si es menos de 1 cigarrillo al día, marcar 00).  
 |\_|\_| Cigarrillos
- d. ¿Cuántos años fumó, sin contar los períodos en los que dejo de fumar? (Si es menos de 1 marcar 00).  
 |\_|\_| Años

**b) PASIVO**

1. Estamos interesados en su exposición al humo de los cigarrillos de otras personas y de los productos de tabaco. Completar la siguiente tabla:

¿Fue expuesto al humo de cigarro de otras personas o productos de tabaco durante:	Si	No	¿Por cuántos años?		
Niñez en casa	[ ]	[ ]	_ _	[ ]	No sabe
Edad adulta en casa	[ ]	[ ]	_ _	[ ]	No sabe
Edad adulta en el trabajo	[ ]	[ ]	_ _	[ ]	No sabe
En entornos sociales tales como bares, restaurantes, casas de amigos	[ ]	[ ]	_ _	[ ]	No sabe
Actualmente, ¿está expuesto al humo de cigarrillos de otros? Si [ ] No [ ]					

## SECCIÓN F. CONSUMO DE ALCOHOL

Para responder a las preguntas de esta sección, una bebida alcohólica es igual a lo siguiente:

Cerveza = una botella de 355 ml o lata

Vino = un vaso de 118 ml

Licores = 30 ml (1 shot) o bebida preparada con 30 ml de licor

Si usted bebe más de un tipo de bebida alcohólica, añadir el número de bebidas para cada tipo para obtener el número total de bebidas

1. En toda su vida, ¿ha bebido al menos 1 bebida de cualquier tipo de alcohol, sin contar los pequeños sorbos?  
Si ..... <sub>1</sub>  
No ..... <sub>2</sub> (Pase a la siguiente sección)  
No sabe/Rechazo responder..... <sub>99</sub> (Pase a la siguiente sección)
2. ¿Cuántos años tenías cuando empezaste a beber, sin contar los pequeños sorbos?  
|\_|\_| Edad  
No sabe/Rechazo responder ..... <sub>99</sub>

### a) Evaluación de la exposición reciente

3. En los últimos 12 meses, ¿con qué frecuencia usted bebió por lo menos una bebida alcohólica?  
Nunca ..... <sub>1</sub> (PASE A LA PREGUNTA 5)  
< 4 veces en un mes ..... <sub>2</sub>  
Una vez a la semana..... <sub>3</sub>  
2-3 veces por semana..... <sub>4</sub>  
4-7 veces por semana..... <sub>5</sub>
4. En los últimos 12 meses, en los días que bebió alcohol, ¿cuántas bebidas por día bebió en promedio?  
|\_|\_| Número  
No recuerda ..... <sub>9</sub>

### b) Evaluación de la exposición de por vida acumulada

5. ¿Ha consumido alguna vez bebidas alcohólicas, como cerveza, vino o licor al menos una vez a la semana durante 6 meses o más?  
Si ..... <sub>1</sub>  
No ..... <sub>2</sub> (Pase a la siguiente sección)  
No sabe/Rechazo responder..... <sub>99</sub> (Pase a la siguiente sección)

6. ¿A qué edad empezó a consumir bebidas alcohólicas, como cerveza, vino o licor al menos una vez a la semana durante 6 meses o más?

Cuando tenía:	En promedio, ¿Con que frecuencia bebía por lo menos una bebida alcohólica?					En los días que bebió alcohol a esa edad, ¿cuántas bebidas en promedio bebió?	
	Nunca	<4 veces al mes	Una vez por semana	2-3 días por semana	4-7 días por semana		
7a. menor de 20 años de edad	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	_ _ _  7b. Número	No sabe/Rechazo responder <input type="checkbox"/> <sub>99</sub>
8a. 20-29 años de edad	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	_ _ _  8b. Número	No sabe/Rechazo responder <input type="checkbox"/> <sub>99</sub>
9a. 30-39 años de edad	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	_ _ _  9b. Número	No sabe/Rechazo responder <input type="checkbox"/> <sub>99</sub>
10a. 40-49 años de edad	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	_ _ _  10b. Número	No sabe/Rechazo responder <input type="checkbox"/> <sub>99</sub>
11a. 50-59 años de edad	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	_ _ _  11b. Número	No sabe/Rechazo responder <input type="checkbox"/> <sub>99</sub>
12a. 60 años de edad	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>4</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>5</sub>	_ _ _  12b. Número	No sabe/Rechazo responder <input type="checkbox"/> <sub>99</sub>

## SECCIÓN G. OTRAS CONDICIONES DE SALUD

Ahora le haré preguntas sobre algunas condiciones de salud (enfermedades).

¿Alguna vez un médico le indico que tuvo o tiene la	Marque la respuesta	¿Qué edad tenía?	¿Qué tipo de tratamiento se le indico?
Presión alta, no durante el embarazo	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Hospitalización <input type="checkbox"/> Cirugía <input type="checkbox"/> Medicamento <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores
Colesterol alto	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Hospitalización <input type="checkbox"/> Cirugía <input type="checkbox"/> Medicamento <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores
Enfermedad de tiroides	<input type="checkbox"/> Si, especificar tipo: _____ <input type="checkbox"/> No	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Hospitalización <input type="checkbox"/> Cirugía <input type="checkbox"/> Medicamento <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores
Diabetes, no durante el embarazo	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Hospitalización <input type="checkbox"/> Cirugía <input type="checkbox"/> Medicamento <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores
Pólipos en el colon o recto	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Hospitalización <input type="checkbox"/> Cirugía <input type="checkbox"/> Medicamento <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores
Cálculos en la vesícula	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Hospitalización <input type="checkbox"/> Cirugía <input type="checkbox"/> Medicamento <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores
Otro: _____	<input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No sabe	_ _ _ _  Edad <input type="checkbox"/> No sabe	<input type="checkbox"/> Hospitalización <input type="checkbox"/> Cirugía <input type="checkbox"/> Medicamento <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores

## SECCIÓN H. ANTROPOMETRÍA Y ACTIVIDAD FÍSICA

1. Actualmente, ¿Cuánto pesa?

|\_|\_|\_|·|\_|\_| kg

No sabe <sub>99</sub>

2. Actualmente, ¿Cuánto mide?

|\_|\_|\_| cm

No sabe <sub>99</sub>

3. Excluyendo los tiempos en los cuales estuvo embarazada, ¿Cuál era su peso usual cuando tenía...

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
20 años de edad?	30 años de edad?	40 años de edad?	50 años de edad?	60 años de edad?
_____ kg				

4. ¿Cuál ha sido el peso máximo que ha llegado a tener y qué edad tenía? (excluya el peso de embarazos)

|\_|\_|\_|·|\_|\_| kg

|\_|\_|\_| Edad

Ahora le haré unas preguntas sobre su actividad física.

Actividades que realizaba cuando tenía	¿Qué tan seguido participaba en <u>actividades físicas vigorosas</u> tales como nadar en piscina olímpica, bailar, correr, gimnasia, baloncesto, montar en bicicleta rápido, aerobics?	¿Qué tan seguido participó en <u>actividades físicas moderadas</u> tales como caminar a paso ligero, voleibol, tenis recreativo, softbol, ciclismo pausado?
de 12 a 13 años de edad	<input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> 4-6 veces por semana <input type="checkbox"/> 2-3 veces por semana <input type="checkbox"/> 1 vez por semana <input type="checkbox"/> 1-3 veces por mes <input type="checkbox"/> Menos de una vez al mes o nunca	<input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> 4-6 veces por semana <input type="checkbox"/> 2-3 veces por semana <input type="checkbox"/> 1 vez por semana <input type="checkbox"/> 1-3 veces por mes <input type="checkbox"/> Menos de una vez al mes o nunca
20 años de edad	<input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> 4-6 veces por semana <input type="checkbox"/> 2-3 veces por semana <input type="checkbox"/> 1 vez por semana <input type="checkbox"/> 1-3 veces por mes <input type="checkbox"/> Menos de una vez al mes o nunca	<input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> 4-6 veces por semana <input type="checkbox"/> 2-3 veces por semana <input type="checkbox"/> 1 vez por semana <input type="checkbox"/> 1-3 veces por mes <input type="checkbox"/> Menos de una vez al mes o nunca
Durante los últimos doce meses (ignorando cualquier cambio reciente)	<input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> 4-6 veces por semana <input type="checkbox"/> 2-3 veces por semana <input type="checkbox"/> 1 vez por semana <input type="checkbox"/> 1-3 veces por mes <input type="checkbox"/> Menos de una vez al mes o nunca	<input type="checkbox"/> Diariamente <input type="checkbox"/> 4-6 veces por semana <input type="checkbox"/> 2-3 veces por semana <input type="checkbox"/> 1 vez por semana <input type="checkbox"/> 1-3 veces por mes <input type="checkbox"/> Menos de una vez al mes o nunca

## ANOTACIONES DEL ENTREVISTADOR

1. La cooperación del entrevistado fue:

- MUY BUENA..... 1
- BUENA..... 2
- JUSTA..... 3
- POBRE..... 4

2. La calidad de la entrevista fue (complete para cada sección)

	No satisfactoria	Cuestionable	Generalmente confiable	De alta calidad
Sección A. Información general				
Sección B. Estatus socioeconómico				
Sección C. Historial familiar de cáncer				
Sección D. Factores hormonales y reproductivos				
Sección E. Consumo de cigarros				
Sección F. Consumo de alcohol				
Sección G. Antropometría y actividad física				

3. La calidad global de la entrevista fue:

- No satisfactoria 1
- Cuestionable 2
- Generalmente confiable 3 (Comentarios)
- De alta calidad 4 (Comentarios)

4. La(s) razón(es) por la cual la información fue no satisfactoria o la calidad de la información cuestionable fue debido a que el entrevistado: (encierre en un círculo las opciones que aplican)

- No sabía información suficiente acerca del tema..... 1
- No quiso ser más específica .....2
- Estaba aburrida o desinteresada.....3
- Estaba molesta, deprimida o enojada .....4
- Tenía problemas para hablar o escuchar .....5
- Estaba confundida o distraída por interrupciones frecuentes .....6
- Era inhibida por otros a su alrededor.....7
- Estaba avergonzada por el tema abordado .....8
- Estaba emocionalmente inestable.....9
- Estaba físicamente débil/enferma ..... 10

Otro (Especificar) \_\_\_\_\_

Comentarios: \_\_\_\_\_