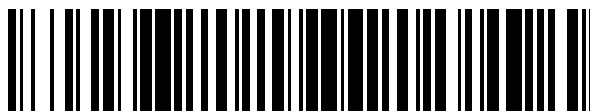


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 992**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010** **E 10776712 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 2499258**

54 Título: **Signatura para el diagnóstico de la agresividad y la inestabilidad genética del cáncer de mama**

30 Prioridad:

**13.11.2009 EP 09306096**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.11.2014**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)  
3, rue Michel-Ange  
75016 Paris , FR;  
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III  
(33.3%) y  
INSTITUT CLAUDIUS REGAUD (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CAZAUX, CHRISTOPHE;  
HOFFMANN, JEAN-SÉBASTIEN;  
BOURDON, JEAN-CHRISTOPHE;  
MACHADO DA SILVA, ALICE y  
ROCHE, HENRI**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 522 992 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Signatura para el diagnóstico de la agresividad y la inestabilidad genética del cáncer de mama

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del tratamiento del cáncer de mama, incluyendo el diagnóstico de la agresividad e inestabilidad genética de dicho cáncer de mama, y la selección de un tratamiento apropiado. La invención se basa en el hallazgo de que la sobreexpresión de POLQ está muy relacionada con la agresividad de un tumor de mama, y de este modo con la supervivencia del paciente. La misma sobreexpresión también está correlacionada con la inestabilidad genética, que entonces se puede usar para exterminar células tumorales. La radioterapia, por ejemplo, es más eficaz en ADN que ya está dañado. Igualmente, los inhibidores de la reparación del ADN pueden prevenir la reparación de rupturas del ADN, conduciendo así a la muerte de la célula tumoral.

15 **Antecedentes de la técnica**

El cáncer de mama es la neoplasia más habitual entre mujeres, y presenta una de las tasas de mortalidad más elevadas de todos los cánceres que afectan a las mujeres. La mayoría de los cánceres aparecen como una masa indolora que crece lentamente. Existe un número de signos físicos que pueden sugerir la presencia de cáncer de mama, y éstos se pueden descubrir a través del examen de la mama. El cáncer de mama se metastatiza por extensión directa, y vía el sistema linfático y el torrente sanguíneo.

Existe un número de métodos actualmente usados para tratar cáncer de mama, incluyendo cirugía, radioterapia, terapia hormonal, y quimioterapia. La terapia del cáncer exitosa está dirigida al tumor primario y a cualesquiera metástasis, ya sea clínicamente manifiestas o microscópicas. Debido a que los tumores de mama se pueden curar con terapia de modalidad combinada, cada uno de los métodos anteriores se puede usar solo o en combinación con una o más terapias adicionales.

La selección de un tratamiento apropiado es crucial para el paciente. Es esencial conocer cuándo usar inmediatamente un protocolo de tratamiento molesto y agresivo a fin de prevenir la extensión de un cáncer de mama agresivo. De otro modo, la supervivencia del paciente se puede ver muy comprometida: aunque existen muchas técnicas para detectar, diagnosticar, y tratar cáncer de mama, la enfermedad sigue siendo el cáncer más habitual en mujeres, y uno de los más mortales (Jemal et al., Cancer Statistics 59: 225-249, 2009). Por el contrario, la realización de un tratamiento molesto y agresivo cuando no es necesario por el tumor portado por el paciente es también desventajosa para el paciente. De hecho, los tratamientos molestos y agresivos siempre conducen a toxicidades adversas que pueden afectar significativamente a la calidad de vida del paciente. Además, tales tratamientos molestos y agresivos son habitualmente muy costosos, y de este modo se deberían de realizar solamente cuando sea necesario.

Actualmente, la selección del tratamiento se basa en el proceso de determinación de la extensión del tumor, que se realiza habitualmente usando el ensayo de Tumor/Nodo/Metástasis (TNM) de la American Joint Committee on Cancer (AJCC). El sistema TNM asigna un número basado en tres categorías. "T" representa el tamaño tumoral, "N" el grado de implicación del ganglio linfático, y "M" el grado de metástasis. La etapa más extensa de un cáncer se da habitualmente como un número I, II, III, IV derivado del valor de TNM agrupado por pronóstico. Un número más elevado indica un cáncer más avanzado, y probablemente un resultado peor:

- La etapa 0 describe cáncer de mama no invasivo. No se ha extendido en la mama o a otras partes del cuerpo.
- La etapa I es una etapa temprana de cáncer de mama invasivo, en la que el tumor mide no más de 2 centímetros (cm) de diámetro, y no están implicados los ganglios linfáticos. En esta etapa, el cáncer no se ha extendido fuera de la mama.
- La etapa II, subdividida en IIA y IIB, describe cánceres de mama invasivos en los que uno de los siguientes es verdad:
  - El tumor mide menos de 2 cm pero se ha extendido a los ganglios linfáticos bajo el brazo
  - No se encuentra ningún tumor en la mama, pero se encuentra cáncer en los ganglios linfáticos de las axilas
  - El tumor tiene entre 2 cm y 5 cm (alrededor de 1 y 2 pulgadas), y se puede haber extendido a los ganglios linfáticos bajo el brazo
  - El tumor es mayor que 5 cm, pero no se ha extendido a ninguno de los ganglios linfáticos

- Los cánceres de mama de la etapa III se subdividen en tres categorías – IIIA, IIIB y III – basándose en un número de diferentes criterios. Por definición, los cánceres de la etapa III no se han extendido (metastatizado) a sitios distantes.
- 5 - Un tumor de la etapa IIIA, por ejemplo, es mayor que 5 cm y se ha extendido a uno a tres ganglios linfáticos bajo el brazo. Otros tumores de la etapa IIIA pueden tener cualquier tamaño y se pueden haber extendido a múltiples ganglios linfáticos. Los ganglios linfáticos se agrupan juntos y se unen entre sí o al tejido circundante.
- 10 - En el cáncer de mama de la etapa IIIB, un tumor de cualquier tamaño se ha extendido a tejidos cerca de la mama – la piel y músculos del pecho – y se puede haber extendido a ganglios linfáticos en la mama o bajo el brazo. La etapa IIIB también incluye cáncer de mama inflamatorio, un tipo inusual pero agresivo de cáncer de mama.
- 15 - El cáncer de etapa IIIC es un tumor de cualquier tamaño que se ha extendido:
  - A 10 o más ganglios linfáticos bajo el brazo
  - A ganglios linfáticos por encima o por debajo de la clavícula y cerca del cuello
  - 20 - A ganglios linfáticos en la propia mama y a ganglios linfáticos bajo el brazo
- El cáncer de mama de etapa IV se ha extendido a otras partes distantes del cuerpo, tales como los pulmones, hígado, huesos o cerebro.

25 Aunque este ensayo y el sistema de determinación del grado de extensión proporcionan cierta información valiosa con respecto a la etapa en la que el cáncer de mama se ha diagnosticado en el paciente, no pueden identificar las etapas más tempranas de la progresión del tumor. Se ha mostrado que la inestabilidad genética es uno de los primeros sucesos de la tumorigénesis (Bartkova et al., Nature, 434: 864-870, 2005; Gorgoulis et al., Nature, 434: 907-913, 2005). Sin embargo, esto no se puede detectar con el ensayo de TNM, sino sólo mediante ensayos que son difíciles de usar en una base habitual en el consultorio. Además, el ensayo de TNM no da información sobre la agresividad del tumor, y de este modo la utilidad para el pronóstico es limitada. De hecho, a fin de realizar un pronóstico fiable, es importante ser capaces de distinguir en las etapas más tempranas entre tumores agresivos y no agresivos. Aunque está claro que los pacientes en la etapa IV tienen un mal pronóstico, el hecho de que un cáncer de mama se diagnostique en una etapa temprana no excluye la posibilidad de que el tumor, aunque en su etapa más temprana, pueda desarrollarse después muy rápidamente. Por el contrario, cuando los ganglios linfáticos son invadidos por células tumorales, el ensayo de TNM da un mal pronóstico, y el paciente se somete habitualmente a una cirugía molesta seguido de quimioterapia intensiva. Sin embargo, si algunos de estos pacientes sufriesen actualmente un cáncer de mama no agresivo, se podría evitar la quimioterapia, que es un tratamiento agresivo y mutagénico, sin disminuir el pronóstico de supervivencia del paciente.

45 Existe de este modo una necesidad real de mejores ensayos de pronóstico del cáncer de mama, no sólo para mejorar la supervivencia global del paciente, sino también para mejorar su calidad de vida y mantener quimioterapias agresivas y costosas para pacientes que se beneficiarán realmente de ellas. El hallazgo de ensayos de pronóstico nuevos y más fiables es de este modo un campo de investigación muy activo.

50 En la proliferación celular normal, la replicación del ADN se lleva a cabo por 3 ADN polimerasas, conocidas como polimerasas replicantes (POLA, POLD y POLE). Sin embargo, se han identificado en células humanas otras 10 ADN polimerasas, que se sabe que son polimerasas especializadas y cuyas funciones todavía son desconocidas en gran medida. Parece que estas polimerasas especializadas se han mantenido a lo largo de la evolución debido a su capacidad para procesar a pesar del daño del ADN. También parece que estas polimerasas son muy mutagénicas, y que su actividad está fuertemente controlada.

55 La POLQ (también conocida como POL theta o POLθ) es una de estas ADN polimerasas especializadas, y contienen dominio de helicasa en su porción N-terminal y un dominio de polimerasa en su término C. Aunque la función de esta ADN polimerasa especializada particular es todavía desconocida en gran medida, parece que está implicada en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la reparación del ADN. (Seki et al., EMBO J, 23: 4484-4494, 2004; Masuda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 13986-13991, 2005; Yoshimura et al., Mol. Cell, 24: 115-125, 2006).

60 Kawamura et al (Kawamura et al., Int J Cancer, 109: 9-16, 2004) han comparado el nivel de expresión de POLQ en varios tejidos no tumorales, incluyendo la glándula mamaria, y en tejido de cáncer de pulmón (27 pacientes), de colon (26 pacientes) y de estómago (28 pacientes). Encontraron que POLQ sólo es apenas detectable en tejido no tumoral, pero que es sobreexpresada en una proporción significativa de tejidos de pulmón, estómago y cáncer. Los autores también indican que la sobreexpresión de POLQ en tejido tumoral está correlacionada con un pronóstico

malo de supervivencia. Sin embargo, no ensayaron el nivel de expresión de POLQ en estirpes celulares de tumor de mama o en tumores de mama.

Se ha analizado la variación de expresión del gen POLQ en tejidos tumorales frente a tejidos de mama normales adyacentes, y se han comparado estos datos con progresión de la enfermedad y características clínicas. Se ha mostrado que POLQ estaba significativamente sobreexpresada en tejidos de tumores de mama. Además, se demostró que la expresión desregulada de POLQ contribuyó activamente a la progresión tumoral. De hecho, la sobreexpresión de POLQ conduce a inestabilidad genética y principalmente rupturas del ADN.

## Descripción de la invención

La presente invención proporciona así un método para diagnosticar la agresividad de un cáncer de mama en un paciente. Según el método de la invención, niveles de expresión elevados del gen POLQ indican agresividad de dicho cáncer de mama.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar la agresividad de un cáncer de mama en un paciente a partir de una muestra de cáncer de mama de dicho paciente, que comprende:

- a) medir in vitro el nivel de expresión del gen POLQ y el nivel de expresión de un gen de control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente,
- b) calcular para dicho gen POLQ una relación de nivel de expresión del nivel de expresión de POLQ a la expresión de dicho gen de control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente,
- c) comparar la mencionada relación del nivel de expresión de POLQ con un valor umbral correspondiente, y
- d) diagnosticar la agresividad del cáncer de mama si la mencionada relación del nivel de expresión de POLQ es superior a su valor umbral correspondiente.

En particular, en una forma de realización, el método de la invención se puede usar para pronosticar la supervivencia de un paciente con un número elevado de ganglios linfáticos metastásicos. En esta forma de realización, un nivel elevado de expresión de POLQ en un paciente con un número elevado de ganglios linfáticos metastásicos indica agresividad del tumor, y da como resultado un pronóstico malo de supervivencia, mientras que un nivel bajo de expresión de POLQ en un paciente con un número elevado de ganglios linfáticos invadidos está asociado con un diagnóstico mucho mejor. Un número bajo de ganglios linfáticos metastásicos se puede definir, por ejemplo, como un recuento de ganglios linfáticos invadidos igual a 1 o menos, mientras que un número elevado de ganglios linfáticos metastásicos se puede definir como un recuento de ganglios linfáticos invadidos igual a 2 o más.

En otra forma de realización, el método de la invención se puede usar para pronosticar la supervivencia de un paciente que tiene un tumor que expresa un ADNc de p53<sup>wt</sup> (la secuencia no contiene ninguna mutación con referencia a la secuencia NC 000017-9 de GenBank). En esta forma de realización, un nivel elevado de expresión de POLQ en un paciente con un tumor que expresa un ADNc de p53<sup>wt</sup> indica agresividad del tumor, y da como resultado un pronóstico malo de supervivencia, mientras que un nivel bajo de expresión de POLQ en un paciente con un tumor que expresa un ADNc de p53<sup>wt</sup> está asociado con un diagnóstico mucho mejor. De hecho, se ha mostrado que un nivel bajo de expresión de POLQ en un paciente con un tumor que expresa un ADNc de p53<sup>wt</sup> está asociado con una probabilidad de supervivencia de 98%.

En otro aspecto, el método de la invención permite la detección de células cancerosas que presentan inestabilidad genética. La expresión desregulada de POLQ conduce a mayor daño del ADN y a inestabilidad cromosómica, disparando así la activación constitutiva del punto de control del daño al ADN  $\gamma$ H2AX-ATL-CHK2.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar inestabilidad genética en un cáncer de mama en un paciente a partir de una muestra de cáncer de mama de dicho paciente, que comprende:

- a) medir in vitro el nivel de expresión del gen POLQ y el nivel de expresión de un gen del control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente,
- b) calcular para dicho gen POLQ una relación de nivel de expresión del nivel de expresión de POLQ a la expresión de dicho gen de control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente,
- c) comparar la mencionada relación del nivel de expresión de POLQ con un valor umbral correspondiente, y
- d) diagnosticar inestabilidad genética del cáncer de mama si la mencionada relación del nivel de expresión de POLQ es superior a su valor umbral correspondiente.

Se entiende que ambos métodos se pueden combinar. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para diagnosticar la agresividad de un cáncer de mama en un paciente, y para la detección de células cancerosas que presentan inestabilidad genética. El método de la invención presenta así la ventaja de permitir la detección de un suceso genético asociado con un pronóstico malo de supervivencia e inestabilidad genética.

Como se usa en la presente memoria, el término "POLQ" se refiere a un gen humano que codifica la ADN polimerasa theta (número ID de Entrez Gene: 10721; referencia de la secuencia de ARNm: NM\_199420.3; referencia de la secuencia proteica: NP\_955452.3). Además, la invención comprende todas las isoformas del mencionado gen POLQ. Isoforma, como se usa en la presente memoria, se refiere a todas las formas diferentes del gen POLQ, y se puede producir por mutaciones, o puede surgir del mismo gen mediante ajuste alternativo. Un gran número de isoformas están provocadas por polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs, pequeñas diferencias genéticas entre alelos del mismo gen. Esto ocurre en posiciones nucleotídicas individuales específicas en un gen. También está incluida en esta definición la situación en la que se crean diferentes versiones de ARN mensajero a partir del mismo gen utilizando diferentes promotores, lo que provoca transcripción para omitir ciertos exones. De este modo, debe apreciarse que los métodos de la invención no están restringidos a POLQ per se, sino también comprenden una o varias isoformas de POLQ. Según métodos de la invención, se mide el nivel de expresión del gen POLQ y/o una o varias de sus isoformas, y se calculan las relaciones de expresión.

Según la presente invención, "agresividad" de un cáncer de mama pretende referirse a la propensión de dicho cáncer de mama para invadir la pared intestinal, ganglios linfáticos, y generar metástasis, y la rapidez con la que pueden aparecer dichas invasiones. La agresividad del cáncer de mama está obviamente correlacionada con la supervivencia, y el método anterior se puede usar para pronosticar la supervivencia del paciente, en cuyo caso el diagnóstico de la agresividad da como resultado un pronóstico malo de supervivencia, y el diagnóstico de la ausencia de agresividad da como resultado un pronóstico bueno de supervivencia.

Como se usa en la presente memoria, "inestabilidad genética" de un cáncer de mama pretende significar la propensión de células tumorales de dicho cáncer de mama para sufrir daño al ADN. La inestabilidad genética es el signo distintivo de cáncer de mama en el que el daño al ADN es más frecuente. Por "daño al ADN" se quiere decir lesión al ADN que afecta a la función normal del ADN al provocar modificación covalente del ADN o haciendo que se desvíe de su conformación normal de doble hélice. El daño al ADN incluye distorsiones estructurales que interfieren con la replicación y transcripción, así como mutaciones de punto que pueden interrumpir pares de bases y pueden cambiar la secuencia del ADN. En general, cuando una célula incurre en daño al ADN, el ciclo celular se detiene en uno de tres puntos de control (G1/S, intra-S o G2/M). La detención del ciclo celular puede conducir a la activación de procesos de reparación del ADN (en este caso de daño al ADN relativamente poco importante) o dar como resultado la inducción de apoptosis (en el caso de daño catastrófico al ADN).

El daño al ADN puede estar provocado espontáneamente por procesos endógenos tales como oxidación de bases y generación de interrupciones de la hebra de ADN por oxígeno reactivo y radicales libres producidos a partir del metabolismo normal, metilación de bases, despurinación, despirimidinación, desemparejamiento de bases por ADN polimerasas durante la replicación del ADN, etc. El daño al ADN también puede estar provocado por ataques medioambientales tales como radiación (por ejemplo, radiación ultravioleta, rayos X, rayos gamma, radiación ionizante), toxinas naturales (por ejemplo, toxinas vegetales), toxinas sintéticas, fármacos (por ejemplo, quimioterapia contra el cáncer, terapia de radiación, agentes alquilantes, etc.). El daño al ADN puede conducir a o resultar de una variedad de trastornos, incluyendo trastornos genéticos hereditarios y trastornos como resultado de exposición a ataques medioambientales. El daño al ADN también se puede producir como resultado de tabaquismo, que conduce a, por ejemplo, cardiopatía, o como resultado de terapias para otras enfermedades, tales como cánceres.

Los métodos anteriores se llevaron a cabo usando una muestra de cáncer de mama del paciente que se va a someter a ensayo. En algunos casos, los métodos según la invención pueden comprender además una etapa preliminar de tomar una muestra de cáncer de mama del paciente. Por "muestra de cáncer de mama" se hace referencia a una muestra de tejido de mama tumoral. Incluso en un paciente canceroso, el tejido de mama todavía comprende tejido sano no tumoral. La "muestra de cáncer de mama" debería estar así limitada a tejido de mama tumoral tomado del paciente. Dicha "muestra de cáncer de mama" puede ser una muestra de biopsia o una muestra tomada de terapia de resección quirúrgica de mama.

Además, los métodos según la invención pueden comprender otra etapa preliminar, entre la toma de la muestra del paciente y las etapas a) como se definen anteriormente, que corresponde a la transformación de la muestra de cáncer de mama (y opcionalmente de la muestra de tejido sano de mama) en una muestra de ARNm (o ADNc correspondiente) o en una muestra proteica, que entonces está lista para uso para medir in vitro los niveles de expresión génica en la etapa a). La preparación o extracción de ARN (así como también la retrotranscripción en ADNc) o proteínas a partir de una muestra tisular es solamente un procedimiento habitual bien conocido por los expertos en la técnica.

Una vez que la muestra de ARNm (o ADNc correspondiente) o proteica lista para uso de cáncer de mama está disponible, se puede realizar la medición de los niveles de expresión del gen POLQ, dependiendo del tipo de

transformación y de la muestra lista para uso disponible, ya sea a nivel de ARNm (es decir, basado en el contenido de ARNm de la muestra) o a nivel proteico (es decir, basado en el contenido proteico de la muestra). En algunas formas de realización, los niveles de expresión de algunos de los genes se pueden medir a nivel del ARNm, mientras que los niveles de expresión de otros genes se miden a nivel proteico. En este caso, parte de la muestra de

Cuando los niveles de expresión se miden a nivel de ARNm, se puede llevar a cabo principalmente usando tecnologías bien conocidas tales como tecnologías de PCR cuantitativa o de micromatrices de ácidos nucleicos (incluyendo micromatrices de ADNc y oligonucleotídicas). Estas tecnologías se usan ahora de forma habitual por los expertos en la materia, y de este modo no es necesario detallarlas en la presente memoria. En la sección experimental se describen formas de realización ejemplificativas que usan PCR cuantitativa. Alternativamente, se puede usar cualquier tecnología conocida o futura que permita evaluar los niveles de expresión génica basándose en los contenidos de ARNm. Por ejemplo, se pueden usar micromatrices de tejidos acopladas a hibridación fluorescente *in situ*. Las micromatrices de tejidos (también conocidas como TMAs) consisten en bloques de parafina en los que se ensamblan en forma de matriz hasta 1000 núcleos de tejidos distintos, para permitir análisis histológico múltiple. En la tecnología de micromatrices de tejidos, se usa una aguja hueca para eliminar núcleos de tejidos tan pequeños como 0,6 mm de diámetro de regiones de interés en tejidos embebidos en parafina tales como biopsias clínicas o muestras tumorales. Estos núcleos de tejidos se insertan entonces en un bloque de parafina receptor, en un patrón de matriz espaciado de forma precisa. Secciones de este bloque se cortan usando un microtomo, se montan en un portaobjetos de microscopio, y después se analizan mediante cualquier método de análisis histológico estándar. Cada bloque de micromatriz se puede cortar en 100-500 secciones, que se pueden someter a ensayos independientes. Los ensayos empleados habitualmente en micromatriz de tejidos incluyen inmunohistoquímica, e hibridación fluorescente *in situ*. Para análisis a nivel de ARNm, la tecnología de micromatriz de tejidos se puede acoplar a hibridación fluorescente *in situ*.

Cuando los niveles de expresión se miden a nivel proteico, se puede llevar a cabo principalmente usando anticuerpos específicos, en particular usando tecnologías bien conocidas tales como transferencia western, ELISA o ELISPOT, micromatrices de anticuerpos, o micromatrices de tejidos acopladas a inmunohistoquímica.

La comparación de los niveles de expresión de los genes medidos en dicha muestra de cáncer de mama del paciente se realiza calculando una relación de nivel de expresión del nivel de expresión del gen POLQ al nivel de expresión de un gen de control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente, y comparando la relación de nivel de expresión obtenida con un valor umbral correspondiente. Dicho gen de control, según la presente invención, es un gen que es expresado en todos los tipos celulares. Más específicamente, el gen de control según la invención es un gen que se expresa en todas las células que constituyen la mama. En otro aspecto, el nivel de expresión del gen de control no se ve afectado por el estado de la célula, es decir, el gen de control se expresa al mismo nivel en una célula sana y en una célula tumoral. En una realización específica, el gen de control es un gen constitutivo ("housekeeping gene"). Un gen constitutivo es un gen expresado en todos los tipos celulares, que proporciona una función básica necesaria para el sostenimiento de todos los tipos celulares. En Eisenberg et al. (Trends in Genetics 19: 362-365, 2003) se puede encontrar una lista de genes constitutivos humanos. Un gen constitutivo preferido según la invención es un gen seleccionado del grupo que consiste en B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS. Un gen constitutivo preferido adicional según la invención es IPO8 o HMBS. Según la presente invención, un "valor umbral" pretende hacer referencia a un valor que permite discriminar muestras en las que la relación de nivel de expresión del gen de interés corresponde a un nivel de expresión de dicho gen de interés en la muestra de cáncer de mama del paciente que es bajo o alto. En particular, si la relación del nivel de expresión génica es inferior o igual al valor umbral, entonces el nivel de expresión de este gen en la muestra de cáncer de mama del paciente se considera bajo, mientras que si una relación del nivel de expresión génica es superior al valor umbral, entonces el nivel de expresión de este gen en la muestra de cáncer de mama del paciente se considera elevado. Para cada gen, y dependiendo del método usado para medir el nivel de expresión de los genes, el valor umbral óptimo puede variar. Sin embargo, se puede determinar fácilmente por un experto basándose en el análisis de varias muestras de cáncer de mama de control en las que el nivel de expresión (bajo o alto) es conocido para este gen particular, y en la comparación del mismo con la expresión de un gen de control, por ejemplo un gen constitutivo. En particular, se determinó que es particularmente útil un valor umbral único de 15,8. Se ha mostrado que la supervivencia del paciente disminuye significativamente para relaciones de nivel de expresión por encima de este valor. Este valor umbral único de 15,8 es específicamente útil cuando el nivel de expresión de todos los genes se mide a nivel de ARNm usando PCR cuantitativa.

La presente invención se refiere además a una micromatriz dedicada a la implementación de los métodos según la invención, que comprende a lo sumo 500, preferentemente a lo sumo 300, a lo sumo 200, más preferentemente a lo sumo 150, a lo sumo 100, todavía más preferentemente a lo sumo 75, a lo sumo 50, a lo sumo 40, a lo sumo 30, a lo sumo 20, a lo sumo 10 sondas distintas, al menos 1 de las cuales se une específicamente a ARNm (o ADNc correspondiente) o proteína POLQ.

En una forma de realización preferida, dicha micromatriz es una micromatriz de ácido nucleico que comprende a lo sumo 500, preferentemente a lo sumo 300, a lo sumo 200, más preferentemente a lo sumo 150, a lo sumo 100, incluso más preferentemente a lo sumo 75, a lo sumo 50, a lo sumo 40, a lo sumo 30, a lo sumo 20, a lo sumo 10 sondas distintas (excluyendo así, por ejemplo, micromatrices pangenómicas), al menos 1 de las cuales se hibrida específicamente a ARNm (o ADNc correspondiente) POLQ. Dicha micromatriz puede contener también al menos una sonda que se hibrida específicamente a un gen constitutivo, además de que la sonda se hibride específicamente a POLQ. En una forma de realización, dicho gen constitutivo se selecciona del grupo que consiste en B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS. Más preferentemente, el gen constitutivo es el gen IPO8 o el gen HMBS. Según la invención, una "micromatriz de ácido nucleico" consiste en diferentes sondas de ácido nucleico que se unen a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio, o una perla con tamaño de microesfera. Un microchip puede estar realizado en polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales a base de sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, o nitrocelulosa. Las sondas pueden ser ácidos nucleicos tales como los ADNc ("micromatriz de ADNc") u oligonucleótidos ("micromatriz oligonucleotídica", presentando los oligonucleótidos de aproximadamente 25 a aproximadamente 60 pares de bases o menos de longitud).

Alternativamente, en otra forma de realización, dicha micromatriz puede ser una micromatriz de anticuerpos, que comprende a lo sumo 500, preferentemente a lo sumo 300, a lo sumo 200, más preferentemente a lo sumo 150, a lo sumo 100, incluso más preferentemente a lo sumo 75, a lo sumo 50, a lo sumo 40, a lo sumo 30, a lo sumo 20, a lo sumo 10 anticuerpos distintos, al menos 1 de los cuales se une específicamente a proteína POLQ. Dicha micromatriz también puede contener al menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína constitutiva, además de que el anticuerpo se una específicamente a la proteína POLQ. En una forma de realización, dicha proteína constitutiva se selecciona del grupo que consiste en proteínas B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS. En una forma de realización, dicha proteína constitutiva es la proteína IPO8 o HMBS.

Alternativamente a la tecnología de micromatrices de ácidos nucleicos o de anticuerpos, se puede usar PCR cuantitativa, y los cebadores de amplificación específicos para los genes a ensayar son de este modo también muy útiles para llevar a cabo los métodos según la invención. La presente invención se refiere así además a un kit para diagnosticar la agresividad en estabilidad genética de un cáncer de mama en un paciente a partir de una muestra de cáncer de mama de dicho paciente, que comprende una micromatriz dedicada como se describe anteriormente o cebadores de amplificación específicos para POLQ. También en la presente memoria, cuando el kit comprende cebadores de amplificación, a la vez que dicho kit puede comprender cebadores de amplificación específicos para otros genes, dicho kit comprende preferentemente a lo sumo 100, a lo sumo 75, 50, a lo sumo 40, a lo sumo 30, preferentemente a lo sumo 25, a lo sumo 20, a lo sumo 15, más preferentemente a lo sumo 10, a lo sumo 8, a lo sumo 6, incluso más preferentemente a lo sumo 5, a lo sumo 4, a lo sumo 3 o incluso 2 o uno o incluso cero parejas de cebadores de amplificación específicos para otros genes distintos de POLQ. Por ejemplo, dicho kit puede comprender al menos una pareja de cebadores de amplificación para al menos un gen constitutivo, además de los cebadores para POLQ. En una forma de realización, dicho gen constitutivo se selecciona de entre el grupo que consiste en B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS. En una forma de realización preferida, dicho gen constitutivo es el gen IPO8 o HMBS.

Como se menciona anteriormente, la capacidad para pronosticar la evolución del cáncer de mama, que está relacionada con su agresividad, es muy importante para seleccionar un tratamiento adecuado, puesto que los tratamientos molestos y costosos con efectos adversos potencialmente graves se deberían usar, además del tratamiento quirúrgico tradicional, cada vez que sean necesarios, pero sólo cuando sean necesarios. La presente invención se refiere también así a un método para seleccionar un tratamiento adecuado del cáncer de mama en un paciente, que comprende:

a) diagnosticar o no la agresividad de dicho cáncer de mama en dicho paciente usando el método según la invención como se describe anteriormente, y

b) añadir radioterapia o quimioterapia adyuvante al tratamiento quirúrgico si dicho cáncer de mama se diagnostica como agresivo en la etapa a).

Además de su valor de pronóstico con respecto a la agresividad del cáncer de mama, también se encontró que el mismo ensayo basado en el análisis de los niveles de expresión de POLQ también permite diagnosticar la presencia o ausencia de inestabilidad genética, dando así como resultado el método descrito anteriormente para diagnosticar inestabilidad genética. En particular, se ha mostrado que la expresión desregulada de POLQ está asociada con una mayor frecuencia de rupturas del ADN. En una forma de realización preferida, el método de la invención se usa así para diagnosticar rupturas del ADN. Tal inestabilidad genética, y principalmente la mayor frecuencia de rupturas del ADN, pueden tener consecuencias con respecto a la selección de una terapia adyuvante. En particular, mientras que la inestabilidad genética puede favorecer mutaciones de células tumorales, y de este modo la desregulación de la proliferación y adhesión, la presencia de rupturas del ADN también se podría usar contra las células tumorales. De hecho, para la proliferación continuada, esas rupturas del ADN se han de reparar, y las células con un número elevado de rupturas del ADN tienen tendencia habitualmente a la muerte celular. Como resultado, mientras que la

radioterapia puede no ser eficiente en todas las circunstancias, se puede mejorar su eficiencia sobre células tumorales que ya presentan una mayor frecuencia de rupturas del ADN. Por ejemplo, la radioterapia puede ser muy eficiente frente a células de tumor de mama que sobreexpresan POLQ identificadas mediante el método de la invención, debido a que estas células contienen niveles elevados de ruptura del ADN e inestabilidad cromosómica. De la misma manera, el uso de inhibidores de la reparación del ADN puede permitir congelar rupturas del ADN, y puede conducir a la muerte de células tumorales.

Más generalmente, se ha mostrado que la inhibición del punto de control del daño al ADN (DDC) o del metabolismo del ADN conduce a una menor viabilidad de células que sobreexpresan POLQ. Por ejemplo, las células afectadas en la actividad de Chk2 cinasa son incapaces de detectar lesiones del ADN inducidas por sobreexpresión de POLQ, y/o son incapaces de detener el ciclo celular en respuesta a las mencionadas lesiones. Igualmente, las células que sobreexpresan POLQ muestran mayor sensibilidad a la inhibición de DDC o del metabolismo nucleotídico.

De este modo, la presente invención también se refiere a un método para pronosticar la eficiencia de radioterapia o de inhibidores de la reparación del ADN, de la señalización del daño al ADN, o del metabolismo nucleotídico en el tratamiento de cáncer de mama en un paciente, que comprende:

a) diagnosticar o no inestabilidad genética en dicho cáncer de mama en dicho paciente usando el método según la invención como se describe anteriormente, y

b) pronosticar la eficiencia de la radioterapia o de inhibidores de la reparación del ADN, de la señalización del daño al ADN o del metabolismo nucleotídico si la inestabilidad genética ha sido diagnosticada en la etapa a).

Según la invención, un "inhibidor de la reparación del ADN" pretende significar una molécula que es capaz de inhibir la reparación de rupturas del ADN, en particular rupturas del ADN bicatenario. Aunque esta expresión no se debería de entender como limitativa, los ejemplos de inhibidores de la reparación del ADN incluyen inhibidores de la proteína de reparación del ADN PARP (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2004080976, WO 2005/053662, WO 2009/046205), inhibidores de histona desacetilasa, tales como los descritos en la solicitud PCT WO 2008/082856, e inhibidores de ADN polimerasas  $\beta$  (véase el documento WO 2007001684). Un "inhibidor de DDC" es una molécula que es capaz de bloquear la actividad de cualquiera de las proteínas implicadas en el punto de control del daño al ADN. Los ejemplos de tales proteínas incluyen ATM/ATR, Chk2 y Chk1. "Inhibidores del metabolismo nucleotídico", como se usa en la presente memoria, incluyen todos los compuestos que dan como resultado un desequilibrio de los conjuntos nucleotídicos, debido a que dichos inhibidores del metabolismo nucleotídico son, por ejemplo, análogos nucleotídicos (ex: 6TG), o debido a que inhiben enzimas de la biosíntesis de nucleótidos (ex: HU).

En otra forma de realización, la presente invención comprende también así un método para aislar nuevos compuestos capaces de inhibir la reparación del ADN, la señalización del daño al ADN, o el metabolismo nucleotídico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) poner en contacto un compuesto con una célula que sobreexpresa POLQ o con una célula que no sobreexpresa POLQ, y

b) evaluar si el compuesto afecta a la viabilidad de la célula que sobreexpresa POLQ más que la viabilidad de la célula que no sobreexpresa POLQ.

La célula que sobreexpresa POLQ puede ser cualquier tipo de célula en la que la expresión de POLQ está desregulada, mientras que la célula que no sobreexpresa POLQ es una célula en la que se mantiene la regulación de la expresión de POLQ. Por ejemplo, la mencionada célula que sobreexpresa POLQ se puede obtener mediante transfección de una célula hospedante con un vector de segmento principal que posee el gen o ADNc de POLQ bajo el control de un promotor ubicuo fuerte. En este caso, dicha célula es ventajosamente dicha célula hospedante transfectada con el mismo vector de segmento principal, en la que dicho vector no contiene el inserto de POLQ.

En todavía otro aspecto, la invención también se refiere al uso de uno o más inhibidores de la reparación del ADN, de la señalización del daño al ADN, o del metabolismo nucleotídico para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cáncer de mama en pacientes cuyo tumor de mama sobreexpresa POLQ. Según la presente invención, un gen se considera "sobreexpresado" en una muestra de cáncer de mama si la relación del nivel de expresión de dicho gen al nivel de expresión de un gen de control en dicha muestra de cáncer de mama es superior a un valor umbral como se define anteriormente. En una forma de realización particular, dicho valor umbral puede ser 15,8.

La presente invención también se refiere a un método para tratar a un paciente que sufre un cáncer de mama que sobreexpresa POLQ, que comprende someter a dicho paciente a radioterapia, y/o administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de uno o más inhibidores de la reparación del ADN.

## Leyendas de las figuras

Figura 1. Expresión relativa de genes de ADN polimerasa en tumores de mama del conjunto 1 (Francia, n = 105). Se calcularon las relaciones de las expresiones de ARNm para muestras de mama tumorales (T) y normales (N) (T/N) (los niveles de expresión se normalizaron previamente con relación a genes de control). T/N > 1 y < 1 indican mayores y menores niveles de expresión en tumores en comparación con tejidos normales reunidos, respectivamente. Los valores p del ensayo binomial exacto bilateral se dan sin corregir; el nivel de significancia se evalúa usando el procedimiento de Benjamini 2001 para una FDR global de 0,05. Las muestras de pacientes indicadas en el eje X se clasifican en el mismo orden para cada panel. + y – representa una mayor y una menor expresión en tejidos tumorales (T) en comparación con los normales (N), respectivamente. Para la representación gráfica, los valores de T/N menores que 1 se transformaron en los valores inversos de N/T.

Figura 2. Expresión relativa de genes de ADN polimerasa en tumores de mama del conjunto 2 (Francia, n = 101). Se calcularon las relaciones de las expresiones de ARNm para muestras de mama tumorales (T) y normales (N) (T/N) (los niveles de expresión se normalizaron previamente con relación a genes de control). T/N > 1 y < 1 indican mayores y menores niveles de expresión en tumores en comparación con tejidos normales reunidos, respectivamente. Los valores p del ensayo binomial exacto bilateral se dan sin corregir; el nivel de significancia se evalúa usando el procedimiento de Benjamini 2001 para una FDR global de 0,05. Las muestras de pacientes indicadas en el eje X se clasifican en el mismo orden para cada panel. + y – representa una mayor y una menor expresión en tejidos tumorales (T) en comparación con los normales (N), respectivamente. Para la representación gráfica, los valores de T/N menores que 1 se transformaron en los valores inversos de N/T.

Figura 3. Comparación de gen a gen de la expresión génica relativa en tumores. Presentación gráfica de todas las correlaciones por pares entre la expresión de las ADN polimerasas en tumores de mama franceses (correlación de Spearman no paramétrica; (A) conjunto 1 (n = 105); (B) conjunto 2 (n = 101)). Cuanto más próximo esté a 1 el coeficiente rho de Spearman (ilustrado por una zona roja o amarilla en la intersección del eje horizontal y vertical), mayor es la asociación entre la expresión de los dos genes considerados. Contrariamente, valores de rho menores que 1 (ilustrado mediante una zona verde) indican que las expresiones bajo comparación son independientes entre sí.

Figura 4. Efecto del nivel de expresión del gen *POLQ* en la supervivencia de pacientes específica del cáncer. (A) Supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer de mama, según el nivel de expresión de ADN de *POLQ* en el tumor primario. Pacientes procedentes de la cohorte francesa (n = 203 en lugar de 206, descartándose 3 muestras sin determinación de *POLQ*). Se indican los valores de p tomados a partir de cada ensayo del rangos logarítmico. (B) Supervivencia de Kaplan-Meier de la comparación por parejas entre la expresión del gen *POLQ* en el tumor de mama primario y el número de ganglios linfáticos positivos. Pacientes procedentes de la cohorte francesa (n = 203)). Se dan los valores de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y de p del rango logarítmico. Pq representa *POLQ*, y Ln representa ganglio linfático positivo.

Figura 5. Homeostasis celular de clones que sobreexpresan *POLQ*. (A) Validación de clones que sobreexpresan de forma estable *POLQ*. Extractos celulares (100 µg) procedentes de células de control transfectadas de forma estable con un vector vacío (CTL2), así como de clones transfectados de forma estable con ADNc de *POLQ* (Q1, Q2 y Q3), se separaron en 5% de SDS-PAGE, se electrotransfirieron a membranas de PVDF, y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos purificados mediante afinidad anti-*POLQ* (15) y antivinculina como un control interno de carga. *POLQ* purificada (50 ng) se usa como un control del tamaño; (B) consecuencias en el ciclo celular. Se determinó el número de células en cada fase del ciclo celular mediante citometría de flujo tras la tinción de ADN mediante yoduro de propidio. Se analizaron al menos 3 experimentos independientes. Se determinó la media y el error estándar, y los valores p se calcularon mediante la prueba de la t de Student.

Figura 6. Punto de control del daño al ADN ATM-CHK2 en clones que sobreexpresan *POLQ*. Cuantificación del número promedio de células positivas a la tinción con  $\gamma$ -H2AX (A) y PT68-CHK2 (B). Como controles positivos, se usaron clones de control (CTL) tratados con UV (10 J.m<sup>-2</sup>). Para la cuantificación, se analizó un mínimo de 100 células en al menos 3 experimentos independientes. Se determinó la media y el error estándar, y los valores p se calcularon mediante la prueba de la t de Student; (C) imágenes de microscopía confocal representativas de células que sobreexpresan *POLQ* (Q1, Q2, Q3).

Figura 7. Detección de  $\gamma$ -H2AX. Se cosecharon 250.000 células subconfluentes, y después se sometieron a ultrasonidos. El extracto de proteínas totales se resolvió mediante electroforesis en gel de poliácridamida con SDS al 15%. El gel se transfirió a una membrana Hybond-P (Amersham, Arlington Heights, IL), que se sondó con anticuerpo monoclonal anti-H2AX (Upstate, Lake Placid, NY) toda la noche a 4°C. Como anticuerpo secundario, se usó anticuerpo de cabra antirratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma, St. Louis, MO). La membrana se incubó entonces con reactivo de quimioluminiscencia potenciada (Amersham).

Cantidades equivalentes de extractos cargados se evaluaron inmunotransfiriendo la membrana con un anticuerpo antiactina.

Figura 8. Rupturas del ADN y anomalías cromosómicas en clones que sobreexpresan POLQ. (A) Cuantificación de metafases aberrantes en clones de control (CTL2 y CTL9) y en clones que sobreexpresan POLQ (Q1, Q2 y Q3). Las células se recogieron 3 horas después del tratamiento con colcemid, y se prepararon frotis de metafase. Para la cuantificación, se analizó un mínimo de 100 metafases en 3 experimentos independientes. Se determinó la media y el error estándar, y los valores *p* se calcularon mediante la prueba de la *t* de Student; (B) imágenes de microscopía representativas de frotis de metafase procedentes de clones CTL9 y Q3. Las flechas indican anomalías cromosómicas.

Figura 9. Sensibilidad a agentes alquilantes. La sensibilidad a fármacos se determinó mediante ensayo clonogénico. Sensibilidad de células que sobreexpresan POLQ (Q1, Q2, Q3) y células de control isogénicas (CTL2, CTL5) a metanosulfonato de metilo (MMS) y a N-metil-N-nitrosourea (MNU). La supervivencia se expresa como la eficiencia relativa del cultivo en placa de células tratadas a los controles. Las dosis de MMS y MNU se presentan en el eje X en una escala lineal, mientras que las fracciones de colonias que sobreviven están en el eje Y en una escala logarítmica. Los resultados son la media  $\pm$  SD de al menos tres experimentos distintos realizados por duplicado.

Figura 10. Velocidad de la horquilla de replicación del ADN en células que sobreexpresan POLQ. (A) Imagen representativa de una fibra de ADN peinada e inmunoteñida en células de control o células que sobreexpresan POLQ; (B) histogramas que muestran la distribución de velocidades de la horquilla de replicación en un clon de control (CTL2) y en dos clones que sobreexpresan POLQ (Q2 y Q3); (C) la longitud total es la suma, en Mb, de todas las fibras de ADN que se estudiaron para cada clon; "n" es el número de pistas de IdU y CldU realizadas en cada clon. El valor de la mediana de la población se da en kb/min. La incertidumbre de la velocidad de la horquilla de replicación de la mediana se da en unidades de desviación absoluta de la mediana. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar conjuntos de datos de Q2 y Q3 con el control del experimento, CTL2.

Figura 11. Efecto del nivel de expresión del gen *POLQ* sobre la supervivencia de pacientes específica de p53. (A) Supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer de mama (*n* = 150), según el estado del gen p53 (secuencia de ADNc de tipo salvaje frente a mutada). Para comparar estas curvas de supervivencia, se usó la prueba del rango logarítmico. Esta prueba calcula un valor *p* evaluando la hipótesis nula de que las curvas de supervivencia son idénticas en las dos poblaciones. Se indica el valor *p* tomado de la prueba del rango logarítmico. (B) Supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes con cáncer de mama con tumores p53<sup>wt</sup> (*n* = 84) según el nivel de expresión de *POLQ*. Para comparar estas curvas de supervivencia, se usó la prueba del rango logarítmico. Esta prueba calcula un valor *p* evaluando la hipótesis nula de que las curvas de supervivencia son idénticas en las dos poblaciones. Se da el valor *p*.

Figura 12. Efecto del nivel de expresión del gen *POLQ* sobre la sensibilidad a un inhibidor de Chk2. (A) Las células MCF7 muestran una mayor sensibilidad a Chk2 inhibidor II Hydrate (Sigma RefC3742) que las células MDA-MB231. La supervivencia se determina en un ensayo clonogénico. MCF7: cuadrados; MDA-MB231: diamantes. (B) La expresión de *POLQ* es mayor en MCF7 que en MDA-MB231. Los niveles de expresión génica se ensayan mediante RT-PCR. C51 es una estirpe celular de mama normal.

## Ejemplos

### 1. Material y métodos

#### 1.1. Diseño del estudio, pacientes y muestras tumorales, expresión génica diferencial

Los pacientes incluidos consistieron en un subconjunto de pacientes procedentes de un ensayo clínico de fase III multicéntrico adyuvante (ensayo PACS01). Los resultados de este ensayo clínico se han publicado en otra parte (Roché et al. J Clin Oncol 24: 5664-5671, 2006). Las muestras tumorales procedentes de esta cohorte (*n* = 206) se dividieron en dos conjuntos para el genotipado (*n* = 101 y *n* = 105). Se obtuvieron tejidos normales de mama en el Claudius Regaud Institute (Tolosa, Francia) y se tomaron de la muestra quirúrgica, a más de 3 cm del cáncer de mama. En la Tabla 1 se describen las características de pacientes y tumores de la cohorte.

Tabla 1: Características básicas de pacientes y tumores

|                        | Cohorte francesa             |       |                              |       |
|------------------------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|
|                        | Conjunto 1 ( <i>n</i> = 101) |       | Conjunto 2 ( <i>n</i> = 105) |       |
| Características        | nº de pacientes              | %     | nº de pacientes              | %     |
| Edad (años)            |                              |       |                              |       |
| Mediana                | 49                           |       | 50,8                         |       |
| Intervalo              | 29-64                        |       | 31-64                        |       |
| Cirugía premenopáusica | 70                           | 69,31 | 58                           | 55,24 |

|                                  |      |       |        |       |
|----------------------------------|------|-------|--------|-------|
| Escisión local                   | 60   | 59,41 | 54     | 51,43 |
| Mastectomía                      | 41   | 40,59 | 51     | 48,57 |
| Tamaño del tumor patológico (mm) |      |       |        |       |
| Mediana                          | 23   |       | 25     |       |
| Intervalo                        | 6-70 |       | 10-150 |       |
| Tipo histológico                 |      |       |        |       |
| Carcinoma ductal                 | 82   | 81,19 | 80     | 76,19 |
| Carcinoma lobulillar             | 12   | 11,88 | 11     | 10,48 |
| Otro                             | 7    | 6,96  | 14     | 13,33 |
| Grado                            |      |       |        |       |
| I                                | 22   | 21,78 | 9      | 8,57  |
| II                               | 34   | 33,66 | 39     | 37,14 |
| III                              | 42   | 41,58 | 54     | 51,43 |
| Ningún grado                     | 2    | 1,98  | 2      | 1,9   |
| Ausente                          | 1    | 0,99  | 1      | 0,95  |
| Número de ganglios positivos     |      |       |        |       |
| ≤1                               | 43   | 42,57 | 30     | 28,57 |
| >1                               | 58   | 57,42 | 75     | 71,42 |
| Receptores de estrógeno          |      |       |        |       |
| Positivo                         | 68   | 67,33 | 74     |       |
| Negativo                         | 30   | 29,7  | 29     |       |
| Ausente                          | 3    | 2,97  | 2      |       |
| Receptores de progesterona       |      |       |        |       |
| Positivo                         | 42   | 41,58 | 41     | 39,05 |
| Negativo                         | 56   | 55,45 | 62     | 59,05 |
| Ausente                          | 3    | 2,97  | 2      | 1,9   |
| HER2                             |      |       |        |       |
| Positivo                         | 16   | 15,84 | 13     | 12,38 |
| Negativo                         | 66   | 65,35 | 87     | 82,86 |
| Ausente                          | 19   | 18,81 | 5      | 4,76  |
| Tratamiento                      |      |       |        |       |
| FEC (solamente)                  | 49   | 48,51 | 57     | 54,29 |
| FEC + TXT (solamente)            | 52   | 51,49 | 48     | 45,71 |
| Otro                             | 0    | 0     | 0      | 0     |
| Tamoxifeno                       | 57   | 56,43 | 67     | 63,8  |

Todas las muestras de tejido tumoral se recogieron quirúrgicamente y se congelaron instantáneamente de forma inmediata en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta la extracción del ARN. El ARN del tumor francés se preparó en la misma plataforma (IPSOGEN, Marsella, Francia) mediante la técnica de almohadilla de CsCl como se describe (Chirgwin J. et al: Biochemistry 18:5294-5299, 1979). Durante el proceso de extracción, todas las muestras tumorales se controlaron para suficiente celularidad tumoral (es decir, >50% de células tumorales) llevando a cabo una tinción con hematoxilina y eosina. La extracción del ARN procedente de 7 tejidos de mama normales se llevó a cabo en 30 secciones de 10 µm de grosor del tejido congelado. Este método permitió el control morfológico del tejido procesado para la extracción del ARN. Los portaobjetos para cada muestra se tiñeron con portaobjetos de hematoxilina-eosina y se analizaron mediante un patólogo. Cada muestra de mama normal se revisó a fin de (i) averiguar la ausencia de cualquier lesión neoplásica; (ii) cuantificar el porcentaje de componentes epiteliales, fibrosos y adiposos normales. La calidad y la cantidad de todas las muestras de ARN francesas se evaluaron usando el Agilent BioAnalyzer 2100, y solamente se seleccionó para el análisis el ARN que presenta una relación adecuada 28S/18S ( $\geq 1,5$ ).

Para la cohorte francesa, el ARN total se transcribió de forma inversa usando el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). El nivel de transcritos se midió por triplicado usando la TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems). Todos los genes estudiados se amplificaron por triplicado a partir de muestras de tumor y normales usando el TaqMan Universal PCR Master Mix y la tecnología de TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems). Las amplificaciones mediante PCR se realizaron con la tecnología TaqMan Low Density Array y el sistema de PCR en tiempo real rápido 7900HT (Tolosa, lote 1). Para la cohorte francesa, se normalizó la expresión génica entre muestras usando dos controles (*HMBS*, *IPO8*), que se amplificaron a partir de cada ADNc. Estos dos genes de control se seleccionaron usando el programa Genorm como los más estables entre 16 ensayados (*B2M*, *TFRC*, *YWHAZ*, *RPL0*, *18S*, *GUSB*, *UBC*, *TBP*, *GAPDH*, *PPIA*, *POLR2A*, *ACTB*, *PGK1*, *HPRT1*, *IPO8*, *HMBS*) en el TaqMan Low Density Human Endogenous Control Array (Applied Biosystems). Se dan las secuencias de contexto de ADN del cebador, así como las referencias de Applied Biosystems usadas para el análisis de cada uno de los genes de ADN polimerasa y de control (Tabla 2). Para analizar la variación de expresión, se calcularon relaciones T/N entre valores normalizados, en las que T y N corresponden respectivamente a valor tumoral y a la mediana de valores normales. De otro modo, para análisis con respecto a la expresión de *POLQ* y a la supervivencia de los pacientes, se escogió *IPO8* como un normalizador, ya que fue el gen más estable de los tres genes de control escogidos. De hecho, las varianzas calculadas relacionadas con el conjunto 1/n = 101 y el conjunto 2/n = 105 fueron

las mismas (0,0033 para el conjunto 1 y 0,0031 para el conjunto 2, siendo el valor p de la prueba de T de 0,6510, dato no mostrado).

Tabla 2: Secuencias de contexto de ADN y referencias de AB

| SEC ID Nº | ID del ensayo  | Secuencia de contexto         | Símbolo del gen | RefSeq      | Localización |
|-----------|----------------|-------------------------------|-----------------|-------------|--------------|
| 1         | Hs00183533_m 1 | AGGGGAATTGATCAG<br>TGCATTCCAC | IPO8            | NM_006390.2 | exón 20-21   |
| 2         | Hs00609297_m 1 | GCGGCTGCAACGGCG<br>GAAGAAAACA | HMBS            | NM_000190.3 | exón 1-2     |
| 3         | Hs00213524_m 1 | TACAACCAACCAGGTG<br>TGGTATTTC | POLA            | NM_016937.1 | exón 30-31   |
| 4         | Hs00172491_m 1 | CTGTTTGAAGCGGGAT<br>GGATGGCAA | POLD1           | NM_002691.1 | exón 1-2     |
| 5         | Hs00173030_m   | CTTTGAAGAGGTGTGT<br>GATGAGATT | POLE            | NM_006231.2 | exón 16-17   |
| 6         | Hs00249411_m   | GGGAAACATGGGGTG<br>GGTATATGGC | REV1L           | NM_016316.1 | exón 2-3     |
| 7         | Hs00197814_m 1 | TCACACAATAAGGTCC<br>TGGCAAAAC | POLH            | NM_006502.1 | exón 5-6     |
| 8         | Hs00958495_m 1 | GCAGAAAGCGGGGCT<br>CCAGCACCAC | POLM            | NM_013284.1 | exón 6-7     |
| 9         | Hs00211963_m 1 | GCCACGAAGGGGTCC<br>AGATTTTATG | POLK            | NM_016218.1 | exón 2-3     |
| 10        | Hs00161301_m 1 | AAAAGCCCAGGGAGA<br>TTGGTGGACG | REV3L           | NM_002912.1 | exón 13-14   |
| 11        | Hs00203191_m   | GATTGAGCAGACAGT<br>CCAGAAAGCA | POLL            | NM_013274.2 | exón 7-8     |
| 12        | Hs00160263_m   | GAGTTAGTGGCATTGG<br>TCCATCTGC | POLB            | NM_002690.1 | exón 5-6     |
| 13        | Hs00394916_m 1 | TGGAGCAGGAAGGA<br>GCGGCTGGCT  | POLN            | NM_181808.1 | exón 18-19   |
| 14        | Hs00200488_m 1 | CCAGCTCGCAGGGAG<br>TTCATGATCA | POLI            | NM_007195.1 | exón 1-2     |
| 15        | Hs00198196_m 1 | GCCTTTCCCAGGTGGT<br>TCAATACTG | POLQ.           | NM_006596.3 | exón 26-27   |

### 1.2. Análisis estadístico

En la cohorte francesa, los parámetros principales de análisis cuando se comparan las expresiones en tejidos cancerosos fueron las relaciones T/N individuales normalizadas a la expresión de los controles *HMBS* e *IPO8*. De otro modo, en los análisis de expresión de *POLQ* en relación con la supervivencia, las relaciones T/N para *POLQ* se normalizaron a *IPO8* solamente. Las correlaciones entre genes se evaluaron con una correlación de Spearman no paramétrica (rho de Spearman). Además de estos análisis, los datos de expresión se transformaron en datos binomiales (mayores o menores que 1): de este modo se pudieron usar pruebas exactas binomiales para evaluar la significancia de la sobre- y subexpresión génica definidas como grupos no balanceados alrededor de 1. Las cantidades relativas de niveles de ARNm de *POLQ* se transformaron en datos binomiales. En la cohorte francesa, todos los tumores con niveles de expresión por debajo o iguales a 0,063 se definieron como expresión baja. Este corte se definió en relación con la supervivencia a fin de identificar dos poblaciones estadísticamente diferentes de pacientes. Dicho corte corresponde a una relación de niveles de ARNm de *POLQ* de 15,8. Un número bajo de ganglios linfáticos metastásicos se definió como recuentos de ganglios linfáticos iguales a 1 o menos, distinto de pacientes con 2 o más ganglios axilares metastásicos. La supervivencia específica del cáncer se definió como el intervalo entre la fecha de cirugía de la mama y la fecha de noticias de fallecimiento o del último seguimiento (datos censurados). Los pacientes que fallecieron por otra causa son considerados como una observación censurada. Las tasas de supervivencia se estimaron según el método de Kaplan-Meier, y se usó la prueba de rangos logarítmicos para evaluar las diferencias entre los grupos. Para investigar el impacto de los factores de pronóstico sobre la supervivencia específica del cáncer, se usó el modelo de regresión de los riesgos proporcionales de Cox, que usa un procedimiento de selección hacia atrás y la prueba de relación de probabilidad. Todas las variables asociadas con  $p < 0,05$  en el análisis univariado se incluyeron en el modelo inicial. Todos los valores p fueron de dos lados. Para todos los ensayos estadísticos, las diferencias se consideran significativas al nivel de 5%.

### 1.3. Subclonación de *POLQ*

El ADNc de *POLQ* humano se transfirió al vector pcDNA 3.1 (Invitrogen) en dos etapas. En primer lugar, pFast Bac HTC *POLQ* que contiene ADNc de *POLQ* (Seki et al. Nucleic Acid Res. 31:6117-6126, 2003) se digirió con *RsrII* y *XhoI* para dar la parte N-terminal de ADNc de *POLQ* (1,2 kb). Este producto se insertó subsiguientemente en pcDNA 3.1 (Invitrogen), previamente digerido con *EcoRV* y *XhoI*. La parte C-terminal de ADNc de *POLQ* (6,7 kb) se aisló

entonces mediante digestión del pFast Bac HTC POLQ con *XhoI* y *SacII* y se insertó en el vector pcDNA 3.1 que ya contiene la parte N-terminal de ADNc de *POLQ* tras la digestión de este vector con *XhoI*. Entonces se confirmó toda la secuencia del ADNc de *POLQ*.

#### 1.4. Manipulación celular mediante ingeniería

Unas células MRC5-SV (ATCC) se hicieron crecer y se transfectaron como se describió (Pillaire et al. Cell Cycle 6: 471-7, 2007). La sobreexpresión de *POLQ* se detectó inmunológicamente como se publicó (Seki et al. Nucleic Acids Res 31: 6117-6126, 2003), usando como un control de tamaño proteína purificada.

Los estudios de análisis del ciclo celular se realizaron como también se ha publicado (Bergoglio et al. J Cell Science 115: 4413-4418, 2002). Los estudios de análisis del ciclo celular y de citotoxicidad se realizaron como se publicó previamente (Bergoglio et al. J Cell Science 115: 4413-4418, 2002). El tratamiento se realizó durante 1 h a 37°C para metanosulfonato de metilo (MMS), y de forma continua para N-metil-N-nitrosourea (MNU). La inmunodetección de  $\gamma$ -H2AX y PT68-CHK2 se llevó a cabo según Rao et al. (Rao et al. Mol Cancer Res 5:713-24, 2007). Para cada clon, se analizó un mínimo de 100 metafases en 3 experimentos independientes (Bergoglio et al. Cancer Res 62: 3511-3514, 2002).

#### 1.5. Peinado del ADN y análisis estadístico

Los experimentos se realizaron como se describió anteriormente (Pillaire et al. Cell Cycle 6: 471-477, 2007). Básicamente, el ADN replicado se marcó en primer lugar con dos pulsos consecutivos de nucleósidos halogenados, yododesoxiuridina (IdU) y clorodesoxiuridina (CldU) durante 20 min. cada uno, y entonces se aisló y se alargó como se describió recientemente (Pillaire et al. Cell Cycle 6: 471-477, 2007). Las regiones recientemente replicadas ("pistas de replicación") en las moléculas de ADN alargadas se pueden visualizar entonces y se pueden medir mediante inmunotinción con anticuerpos que son específicos para CldU o IdU. En el presente caso, las células se marcaron sucesivamente durante 20 minutos con 100  $\mu$ M de IdU y CldU (Sigma-Aldrich).

#### 1.6. Secuenciación de p53 y análisis de mutaciones

Los exones 4 a 9 de p53 se amplificaron en una reacción de PCR semianidada llevada a cabo según las recomendaciones del fabricante: se añadieron 2  $\mu$ l de ADNc a una mezcla que contiene 45  $\mu$ l de PCR supermix (Invitrogen) y cebadores Gil (5'TGA TGC TGT CCC CGG ACG ATA TTG AAC3') y Rev10 (5'CTT CCC AGC CTG GGC ATC CTT G3'). Entonces se añadió 1  $\mu$ l de este producto de PCR a una segunda reacción de PCR con los cebadores Gil y Rev9 (5'CTT CTT TGG CTG GGG AGA GGA3'). La reacción de amplificación consistió en un ciclo de 94°C durante 3 min., seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 45 s, y 72°C durante 1 min. 30 s, y una etapa final de 72°C durante 8 min.

Los productos amplificados se purificaron en geles de agarosa al 1% con QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), y se sometieron a secuenciación en la instalación de análisis de ADN del hospital de Ninewells (Abi 3730 Genetic Analyser) usando los cebadores Gil y MP9ER (5'CTC CCA GGA CAG GCA CAA ACA CG3'). Las secuencias obtenidas se alinearon a la secuencia de p53 NC 000017-9 de GenBank usando el programa Multalin (alineamiento de múltiples secuencias con agrupamiento jerárquico) (Corpet F; Nucleic Acids Res 16(22): 10881-90, 1988). Las mutaciones se confirmaron volviendo a amplificar la muestra y volviendo a secuenciar. Sólo se analizaron los exones 4 a 8 (de nucleótido 11407 a 14067 en la secuencia NC 000017-9). Las mutaciones se validaron posteriormente usando las herramientas de validación de mutaciones de la base de datos de IARC de p53 (<http://www-p53.iarc.fr/MutationValidationCriteria.asp>) (Petitjean et al. Hum Mutat. 28(6):622-9, 2007). Las secuencias se clasificaron entonces según el tipo de mutación que contenían: WT o Silenciosa (0), Sentido equivocado (1) y Sin sentido (2).

### 2. Resultados

#### 2.1. *POLQ* es el gen de ADN polimerasa más aumentado en tumores de mama.

Se realizó la PCR en tiempo real para generar perfiles de expresión génica a partir de una serie de carcinomas de mama (n = 101, Tabla 1). En la figura 1 se muestran los niveles de expresión relativa de ADN polimerasas para cada tumor, normalizados al nivel de expresión de la mediana de 7 tejidos de mama no tumorales. Los datos indican claramente que el gen *POLQ* está muy altamente expresado en tejidos tumorales de casi todos los pacientes en comparación con tejidos normales, probablemente debido a que la expresión en tejidos no tumorales es excepcionalmente baja (Tabla 3). Entre todos los genes de polimerasa analizados, para las enzimas replicativas (*POLA*, *POLD* y *POLE*) o especializadas (*POLH*, *POLL*, *POLM*, *POLN*, *POLK*, *POLB*, *POLI*, *POLZ/REV3L* y *REV1*), *POLQ* mostró el nivel más alto de expresión T/N relativa. La expresión de *POLQ* estaba aumentada en 3 a 26 veces en muestras tumorales en comparación con tejidos normales. En 70 de 101 tumores (69,3%), la expresión de *POLQ* estaba aumentada en 5 veces o más.

Tabla 3: Valores de Ct en tejidos tumorales y normales para cada gen de ADN polimerasa, según derivan a partir del análisis de Q-PCR

| CONJUNTO 1        | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>    |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01-BEG-BR001  | 26,89 | 26,95 | 26,50 | 26,96 | 26,83 | 27,76 | 25,42 | 26,55 | 27,88 | 27,33 | 30,85 | 28,36 | 28,89 | 25,44 | 27,30 |
| PACS01-AVA-BR-003 | 26,94 | 27,93 | 26,56 | 26,79 | 27,47 | 27,32 | 25,93 | 26,94 | 27,60 | 26,42 | 29,79 | 27,85 | 30,82 | 25,94 | 27,53 |
| PACS01-AVA-BR004  | 27,09 | 27,93 | 26,95 | 26,43 | 26,90 | 27,93 | 25,67 | 26,77 | 27,85 | 27,89 | 29,81 | 28,01 | 31,75 | 25,66 | 27,94 |
| PACS01-AVA-BR-005 | 27,87 | 27,96 | 26,93 | 27,30 | 27,82 | 27,73 | 25,99 | 27,41 | 27,87 | 25,93 | 31,59 | 28,74 | 29,21 | 25,90 | 26,95 |
| PACTS01-AVA-BR006 | 27,29 | 27,91 | 27,46 | 26,96 | 27,82 | 28,06 | 26,10 | 26,93 | 27,91 | 27,93 | 30,99 | 28,79 | 30,82 | 26,33 | 28,61 |
| PACS01-AVA-BR009  | 27,22 | 27,07 | 26,90 | 27,82 | 27,89 | 27,91 | 26,81 | 26,63 | 28,49 | 27,93 | 30,84 | 28,99 | 29,85 | 26,71 | 28,34 |
| PACS01-BEG-BR002  | 27,64 | 27,63 | 26,93 | 26,90 | 26,88 | 27,94 | 25,74 | 26,83 | 27,75 | 27,78 | 28,87 | 27,97 | 32,64 | 25,92 | 27,88 |
| PACS01-CJP-BR108  | 27,30 | 26,59 | 26,72 | 27,58 | 27,88 | 28,03 | 26,06 | 26,94 | 28,09 | 27,00 | 30,66 | 27,92 | 29,62 | 25,81 | 28,50 |
| PACS01-CJP-BR109  | 26,92 | 26,92 | 26,93 | 26,98 | 27,58 | 28,25 | 25,82 | 27,32 | 28,37 | 27,83 | 31,87 | 28,87 | 29,01 | 26,11 | 28,94 |
| PACS01-CJP-BER110 | 26,62 | 26,95 | 26,41 | 26,89 | 26,96 | 27,97 | 25,83 | 27,88 | 27,15 | 27,33 | 29,71 | 27,12 | 30,68 | 25,88 | 28,69 |
| PACS01-CJP-BR111  | 26,98 | 26,55 | 26,92 | 27,22 | 26,05 | 28,71 | 26,96 | 26,69 | 28,78 | 27,89 | 30,95 | 28,91 | 30,96 | 26,15 | 26,88 |
| PACS01-CJP-BR112  | 27,92 | 27,85 | 27,47 | 27,07 | 27,59 | 27,97 | 25,86 | 26,81 | 27,95 | 27,34 | 29,87 | 27,91 | 32,17 | 26,30 | 28,40 |
| PACS01-CJP-BR114  | 27,63 | 27,68 | 26,90 | 26,80 | 26,91 | 26,83 | 25,20 | 26,66 | 27,54 | 27,11 | 29,79 | 27,90 | 31,63 | 26,05 | 27,94 |
| PACS01-CJP-BR115  | 26,89 | 26,97 | 26,42 | 26,88 | 26,89 | 26,94 | 25,68 | 27,01 | 27,94 | 26,93 | 28,97 | 28,02 | 30,45 | 25,78 | 28,01 |
| PACS01-CJP-BR116  | 27,50 | 27,75 | 26,89 | 26,73 | 27,61 | 28,31 | 25,89 | 26,58 | 27,52 | 27,57 | 30,63 | 28,02 | 31,77 | 25,92 | 27,90 |
| PACS01-CJP-BR117  | 26,91 | 27,12 | 26,20 | 26,91 | 27,90 | 26,89 | 25,18 | 26,18 | 27,52 | 27,88 | 30,96 | 26,92 | 31,95 | 25,93 | 29,15 |
| PACS01-FBA-BR092  | 27,65 | 27,12 | 26,88 | 26,89 | 25,92 | 27,97 | 26,60 | 26,75 | 28,49 | 27,79 | 29,15 | 27,00 | 30,94 | 26,82 | 28,88 |
| PACS01-FBA-BR094  | 26,95 | 26,96 | 26,67 | 26,79 | 26,89 | 26,92 | 25,44 | 25,85 | 27,95 | 29,30 | 29,12 | 27,72 | 30,76 | 25,58 | 27,91 |
| PACS01-FBA-BR097  | 27,23 | 27,72 | 26,92 | 26,91 | 26,86 | 27,33 | 25,86 | 26,78 | 27,82 | 28,79 | 29,96 | 27,94 | 30,83 | 25,86 | 27,83 |
| PACS01-FBA-BR101  | 26,83 | 26,93 | 26,59 | 26,89 | 26,85 | 27,86 | 26,62 | 26,92 | 27,83 | 27,49 | 29,32 | 28,25 | 29,47 | 25,83 | 26,88 |

| CONJUNTO 1        | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1   | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|-------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>    |       |       |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01-FBA-BR103  | 27,40 | 27,84 | 26,93 | 27,27  | 27,83 | 27,67 | 26,93 | 27,14 | 27,84 | 28,77 | 30,20 | 27,90 | 30,86 | 26,28 | 27,86 |
| PACS01-FBA-BR105  | 26,67 | 25,60 | 26,29 | 26,70  | 26,91 | 27,06 | 24,79 | 26,23 | 27,35 | 27,80 | 29,03 | 27,84 | 29,44 | 25,16 | 27,85 |
| PACS01-FBA-BR106  | 27,90 | 27,95 | 27,91 | 26,84  | 26,93 | 27,43 | 25,80 | 26,82 | 27,97 | 29,80 | 26,59 | 27,80 | 31,05 | 25,87 | 27,90 |
| PACS01-HCL-BR119  | 27,93 | 27,87 | 26,91 | 26,81  | 27,76 | 27,48 | 25,87 | 26,87 | 27,94 | 26,93 | 28,78 | 27,73 | 33,69 | 26,43 | 28,84 |
| PACS01-HCL-BR122  | 26,94 | 25,16 | 25,78 | 27,88  | 27,94 | 28,70 | 26,51 | 26,65 | 27,97 | 26,81 | 30,03 | 29,59 | 28,84 | 25,83 | 27,42 |
| PACS01-HCL-BR123  | 26,68 | 27,02 | 25,30 | 26,2,7 | 26,89 | 27,32 | 25,90 | 25,79 | 27,56 | 25,89 | 28,88 | 27,91 | 29,51 | 25,37 | 28,04 |
| PACS01-HCL-BR126  | 26,94 | 26,88 | 25,90 | 26,91  | 27,83 | 27,93 | 25,89 | 26,87 | 27,39 | 27,03 | 31,26 | 28,76 | 28,79 | 25,95 | 27,78 |
| PACS01-HCL-BR127  | 27,63 | 27,75 | 26,89 | 26,64  | 27,36 | 27,86 | 26,15 | 26,88 | 27,95 | 28,84 | 29,86 | 28,94 | 31,50 | 26,83 | 28,87 |
| PACS01-HTE-BR154  | 27,01 | 26,92 | 25,90 | 26,74  | 27,56 | 26,89 | 25,80 | 26,58 | 27,87 | 26,92 | 29,39 | 27,89 | 31,30 | 25,73 | 28,32 |
| PACS01-IGR-BR132  | 27,21 | 26,97 | 26,85 | 26,78  | 26,92 | 27,81 | 25,65 | 26,86 | 27,52 | 27,56 | 29,01 | 27,93 | 30,69 | 25,90 | 28,50 |
| PACTS01-IGR-BR133 | 26,92 | 27,18 | 26,57 | 26,81  | 27,18 | 27,98 | 25,87 | 27,83 | 27,91 | 28,80 | 29,89 | 28,94 | 29,80 | 25,94 | 27,89 |
| PACS01-IGR-BR135  | 25,75 | 26,36 | 25,49 | 26,71  | 26,88 | 26,95 | 24,85 | 25,59 | 26,91 | 25,94 | 26,86 | 25,98 | 29,18 | 24,96 | 27,00 |
| PACS01-IGR-BR138  | 25,94 | 25,96 | 24,91 | 26,86  | 26,47 | 26,87 | 25,47 | 26,88 | 27,57 | 27,55 | 28,41 | 26,95 | 27,96 | 25,65 | 26,93 |
| PACS01-IGR-BR139  | 27,83 | 27,83 | 26,92 | 26,90  | 27,88 | 27,64 | 25,91 | 27,78 | 27,73 | 26,89 | 29,13 | 27,63 | 31,06 | 25,87 | 26,91 |
| PACS01-IGR-BR141  | 27,92 | 27,40 | 26,90 | 26,55  | 27,80 | 27,94 | 26,56 | 26,55 | 28,86 | 28,26 | 30,93 | 29,80 | 29,85 | 25,94 | 28,57 |
| PACS01-IGR-BR142  | 27,84 | 27,96 | 26,94 | 27,68  | 27,47 | 28,02 | 26,93 | 26,94 | 27,92 | 27,98 | 29,47 | 28,37 | 33,91 | 26,81 | 28,84 |
| PACS01-IGR-BR143  | 26,81 | 27,44 | 26,31 | 26,77  | 26,88 | 27,46 | 25,88 | 25,87 | 27,42 | 27,06 | 28,89 | 27,89 | 30,71 | 25,93 | 27,68 |
| PACS01-IGR-BR144  | 27,19 | 27,25 | 26,96 | 26,93  | 27,90 | 27,85 | 26,34 | 26,58 | 27,92 | 27,61 | 30,84 | 28,93 | 31,94 | 26,23 | 28,88 |
| PACS01-IGR-BR145  | 26,97 | 26,99 | 26,86 | 26,84  | 26,84 | 27,76 | 25,82 | 26,88 | 27,42 | 27,89 | 28,73 | 28,01 | 29,92 | 25,90 | 27,68 |
| PACTS01-IGR-BR146 | 26,97 | 26,88 | 26,59 | 26,85  | 26,89 | 27,86 | 26,07 | 26,91 | 27,90 | 26,90 | 30,83 | 28,80 | 29,60 | 26,27 | 27,93 |
| PACS01-IGR-BR147  | 28,26 | 27,59 | 27,95 | 27,89  | 28,65 | 29,84 | 27,42 | 28,18 | 29,66 | 27,69 | 32,85 | 30,56 | 28,89 | 27,01 | 27,65 |

| CONJUNTO 1         | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH   | POLM  | POLK  | REV3L | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>     |       |       |       |       |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01-IGR-BR148   | 27,66 | 28,60 | 26,96 | 27,89 | 27,86  | 28,06 | 26,69 | 27,59 | 28,10 | 28,94 | 30,88 | 28,63 | 33,06 | 26,94 | 29,39 |
| PACS01-IGR-BR149   | 27,87 | 27,90 | 27,03 | 27,94 | 27,72  | 28,40 | 26,95 | 27,79 | 28,39 | 27,93 | 30,96 | 30,11 | 30,12 | 26,62 | 27,94 |
| PACS01-IGR-BR150   | 27,91 | 27,90 | 26,63 | 26,93 | 27,87  | 27,81 | 25,92 | 26,90 | 27,89 | 27,95 | 29,80 | 28,50 | 31,21 | 26,08 | 27,77 |
| PACS01-IGR-BR151   | 27,88 | 27,74 | 26,92 | 26,85 | 27,85  | 27,91 | 26,16 | 27,42 | 27,80 | 27,22 | 30,73 | 27,82 | 31,85 | 25,91 | 27,93 |
| PACS01-IGR-BR152   | 25,41 | 26,86 | 25,95 | 25,94 | 25,92  | 26,70 | 24,64 | 25,87 | 26,83 | 25,83 | 26,87 | 27,31 | 29,86 | 24,69 | 27,45 |
| PACS01-IGR-BR153   | 26,90 | 27,43 | 26,20 | 27,41 | 27,23  | 27,90 | 26,84 | 27,84 | 28,56 | 27,66 | 29,84 | 28,89 | 29,96 | 25,94 | 27,96 |
| PACS01-JGO-BR011   | 27,95 | 27,88 | 27,84 | 27,92 | 27,83  | 27,94 | 26,81 | 27,86 | 28,01 | 27,83 | 30,78 | 28,61 | 31,13 | 26,89 | 28,89 |
| PACS01-JGO-BR015   | 26,95 | 26,62 | 26,39 | 27,26 | 28,37  | 28,85 | 26,91 | 26,81 | 28,94 | 27,89 | 28,97 | 28,78 | 30,10 | 26,92 | 27,56 |
| PACS01 T-FBE-BR259 | 26,84 | 27,43 | 26,18 | 26,83 | 27,61  | 27,93 | 25,88 | 27,78 | 27,94 | 27,94 | 29,75 | 28,83 | 29,99 | 25,87 | 28,09 |
| PACS01 T-HCL-BR307 | 27,80 | 27,61 | 26,74 | 26,87 | 26,8-8 | 27,84 | 26,67 | 26,95 | 28,18 | 28,26 | 29,46 | 27,84 | 31,12 | 25,81 | 28,31 |
| PACS01 T-HCL-BR306 | 27,44 | 28,08 | 26,81 | 27,36 | 27,01  | 28,06 | 26,91 | 27,69 | 28,53 | 27,98 | 29,93 | 28,91 | 30,86 | 26,78 | 28,80 |
| PACS01 T-HCL-BR309 | 28,74 | 27,92 | 26,80 | 27,51 | 27,09  | 27,86 | 27,95 | 27,87 | 28,70 | 28,74 | 30,00 | 28,55 | 32,52 | 26,74 | 28,91 |
| PACS01 T-HCL-BR310 | 27,84 | 27,93 | 26,94 | 26,79 | 27,25  | 27,06 | 25,81 | 26,41 | 27,86 | 27,90 | 29,94 | 27,76 | 30,75 | 25,77 | 28,60 |
| PACS01 T-HCL-BR313 | 27,97 | 28,35 | 27,52 | 27,86 | 27,85  | 28,08 | 26,80 | 27,85 | 28,87 | 28,01 | 30,18 | 28,88 | 31,95 | 26,93 | 29,00 |
| PACS01 T-HCL-BR314 | 26,91 | 27,79 | 26,79 | 26,94 | 26,83  | 27,31 | 25,20 | 26,10 | 27,78 | 26,96 | 28,93 | 27,75 | 31,7  | 25,96 | 27,67 |
| PACS01 T-HCL-BR317 | 27,55 | 28,76 | 26,60 | 27,32 | 27,40  | 27,89 | 25,80 | 26,88 | 27,97 | 28,70 | 29,80 | 27,94 | 32,96 | 26,56 | 28,88 |
| PACS01 T-HCL-BR318 | 26,92 | 26,89 | 26,85 | 26,92 | 26,91  | 27,92 | 25,91 | 26,65 | 28,51 | 29,70 | 29,34 | 27,93 | 29,96 | 25,91 | 28,86 |
| PACS01 T-HCL-BR319 | 27,56 | 27,61 | 27,44 | 27,09 | 26,66  | 27,86 | 25,55 | 26,88 | 28,88 | 28,77 | 29,25 | 27,68 | 30,73 | 25,92 | 27,95 |
| PACS01 T-HTE-BR256 | 26,12 | 26,86 | 25,35 | 26,85 | 26,72  | 27,43 | 25,85 | 27,82 | 27,83 | 26,61 | 28,08 | 27,69 | 28,93 | 25,41 | 27,85 |
| PACS01 T-IGR-BR260 | 27,35 | 28,10 | 27,00 | 27,17 | 27,93  | 27,48 | 26,78 | 27,80 | 28,41 | 28,51 | 30,87 | 28,76 | 33,78 | 26,24 | 28,93 |
| PACS01 T-IGR-BR261 | 26,73 | 27,35 | 25,84 | 27,86 | 27,29  | 27,87 | 26,80 | 26,58 | 28,76 | 25,74 | 31,81 | 27,60 | 29,70 | 26,97 | 27,90 |

| CONJUNTO 1             | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>         |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01 T-<br>IGR-BR262 | 26,93 | 26,86 | 26,57 | 27,89 | 26,92 | 28,19 | 27,82 | 27,87 | 27,96 | 27,87 | 31,02 | 27,87 | 30,00 | 26,19 | 26,92 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR265 | 27,60 | 27,97 | 26,88 | 27,21 | 27,32 | 27,87 | 26,31 | 26,85 | 27,93 | 27,93 | 29,89 | 27,82 | 32,28 | 25,92 | 27,97 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR266 | 26,92 | 27,39 | 26,63 | 26,92 | 27,91 | 27,56 | 26,81 | 27,26 | 27,73 | 27,81 | 30,76 | 28,75 | 28,85 | 26,64 | 27,79 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR267 | 27,64 | 27,84 | 27,65 | 27,90 | 27,76 | 27,93 | 26,07 | 26,71 | 28,48 | 26,91 | 30,28 | 27,39 | 31,57 | 26,48 | 28,42 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR268 | 26,95 | 27,00 | 26,94 | 27,97 | 27,86 | 27,88 | 26,24 | 27,53 | 27,92 | 26,90 | 30,90 | 27,02 | 29,90 | 25,96 | 27,87 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR270 | 26,90 | 27,65 | 26,86 | 27,64 | 26,69 | 27,92 | 26,55 | 26,74 | 28,70 | 26,00 | 28,66 | 27,88 | 31,89 | 25,86 | 27,84 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR272 | 27,54 | 27,89 | 26,82 | 27,85 | 26,94 | 27,74 | 26,96 | 26,88 | 28,94 | 27,61 | 29,8  | 29,78 |       | 26,45 | 28,85 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR273 | 26,72 | 27,31 | 26,04 | 27,87 | 26,91 | 27,41 | 26,22 | 27,39 | 27,89 | 27,91 | 29,53 | 27,63 | 29,86 | 25,91 | 27,89 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR274 | 27,96 | 27,82 | 26,81 | 27,49 | 27,25 | 27,98 | 26,68 | 26,82 | 28,18 | 28,57 | 30,83 | 28,97 | 31,87 | 26,22 | 28,85 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR275 | 26,95 | 26,90 | 25,90 | 27,84 | 26,91 | 28,08 | 26,71 | 27,91 | 29,84 | 27,85 | 31,87 | 29,24 | 28,92 | 26,84 | 27,17 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR277 | 27,11 | 27,43 | 26,65 | 27,60 | 27,17 | 26,60 | 26,84 | 27,79 | 28,60 | 27,81 | 30,83 | 27,97 | 30,82 | 25,90 | 27,91 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR278 | 27,87 | 27,82 | 27,76 | 27,92 | 27,66 | 28,63 | 27,07 | 28,68 | 27,91 | 27,90 | 31,87 | 28,86 | 30,74 | 26,58 | 27,83 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR280 | 27,27 | 28,94 | 27,05 | 27,17 | 26,92 | 27,87 | 25,79 | 26,85 | 27,85 | 27,78 | 29,02 | 28,84 | 30,92 | 25,94 | 27,94 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR282 | 27,81 | 27,66 | 26,99 | 26,90 | 27,86 | 27,86 | 26,37 | 26,62 | 28,58 | 27,94 | 29,81 | 28,44 | 29,84 | 25,87 | 27,72 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR283 | 28,94 | 27,98 | 27,59 | 28,26 | 27,94 | 28,72 | 27,85 | 28,85 | 28,90 | 29,65 | 31,04 | 28,92 | 31,84 | 26,85 | 28,94 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR284 | 27,93 | 27,92 | 27,03 | 27,80 | 27,86 | 27,86 | 25,74 | 28,46 | 28,93 | 28,56 | 30,94 | 28,71 | 30,60 | 26,93 | 26,99 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR286 | 27,54 | 28,82 | 27,89 | 26,69 | 27,19 | 28,76 | 26,81 | 27,77 | 28,67 | 28,94 | 26,87 | 28,89 | 31,93 | 26,60 | 28,88 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR288 | 26,81 | 27,05 | 26,56 | 27,95 | 26,96 | 26,91 | 25,90 | 27,90 | 27,92 | 29,95 | 31,97 | 27,94 | 30,09 | 25,90 | 27,95 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR289 | 26,91 | 27,41 | 26,93 | 27,48 | 26,80 | 27,06 | 25,80 | 26,66 | 28,50 | 29,43 | 29,08 | 28,79 | 30,67 | 25,94 | 27,94 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR290 | 27,49 | 27,83 | 26,86 | 27,87 | 27,83 | 27,74 | 27,46 | 26,94 | 28,86 | 29,02 | 30,97 | 28,63 | 29,78 | 25,89 | 28,54 |
| PACS01 T-<br>IGR-BR291 | 26,96 | 26,71 | 26,86 | 28,02 | 26,89 | 28,40 | 26,88 | 26,89 | 29,74 | 27,06 | 33,02 | 28,95 | 30,54 | 25,88 | 26,89 |

| CONJUNTO 1                  | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01 T-<br>BEG-BR294      | 27,46 | 27,50 | 26,34 | 27,95 | 27,62 | 27,81 | 26,43 | 27,87 | 28,48 | 27,90 | 30,73 | 28,89 | 31,39 | 26,91 | 28,63 |
| PACS01 T-<br>IPC-BR-298     | 27,96 | 28,16 | 26,93 | 27,82 | 27,93 | 27,58 | 26,83 | 27,86 | 28,92 | 27,92 | 31,90 | 28,63 | 32,88 | 26,83 | 28,86 |
| PACS01 T-<br>IPC-BR299      | 26,80 | 26,50 | 26,22 | 27,90 | 27,91 | 27,88 | 26,68 | 26,81 | 28,16 | 29,90 | 30,72 | 28,88 | 29,88 | 26,63 | 27,04 |
| PACS01 T-<br>IPC-BR300      | 27,28 | 27,83 | 26,91 | 27,74 | 27,47 | 27,94 | 26,87 | 26,86 | 27,88 | 28,39 | 29,89 | 26,96 | 32,52 | 25,92 | 27,82 |
| PACS01 T-<br>IPC-BR301      | 27,67 | 27,44 | 27,21 | 27,81 | 27,74 | 27,87 | 26,20 | 26,73 | 28,77 | 27,90 | 31,04 | 29,24 | 30,62 | 25,85 | 27,34 |
| PACS01 T-<br>IPC-BR303      | 26,50 | 25,99 | 25,28 | 26,95 | 26,59 | 27,75 | 25,68 | 26,25 | 28,89 | 26,94 | 29,55 | 28,83 | 27,95 | 25,26 | 26,71 |
| PACS01 T-<br>IPC-BR304      | 27,89 | 28,29 | 26,88 | 27,42 | 26,93 | 28,13 | 26,41 | 26,87 | 28,61 | 27,45 | 29,90 | 27,84 | 31,90 | 25,95 | 27,86 |
| PACS01 T-<br>IPC-BR305      | 26,88 | 27,12 | 25,85 | 26,89 | 26,91 | 27,85 | 25,59 | 26,43 | 27,90 | 28,27 | 28,37 | 27,60 | 31,53 | 25,93 | 28,93 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR237      | 26,09 | 26,57 | 25,82 | 26,95 | 26,88 | 27,89 | 25,85 | 26,85 | 27,89 | 26,84 | 28,95 | 28,59 | 28,99 | 25,65 | 27,94 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR241      | 27,11 | 27,27 | 25,85 | 26,87 | 27,78 | 27,94 | 25,89 | 26,42 | 27,91 | 27,95 | 29,88 | 28,43 | 30,06 | 26,89 | 27,86 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR243      | 26,02 | 26,95 | 25,36 | 26,26 | 26,92 | 26,53 | 25,42 | 25,98 | 27,87 | 26,67 | 28,36 | 27,96 | 30,00 | 25,88 | 28,75 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR244      | 27,91 | 26,06 | 26,88 | 26,89 | 26,89 | 29,18 | 26,44 | 27,03 | 28,99 | 27,36 | 30,99 | 29,84 | 28,49 | 26,23 | 27,91 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR246      | 27,81 | 27,09 | 26,44 | 27,14 | 27,90 | 27,93 | 25,92 | 27,22 | 27,87 | 27,91 | 29,98 | 28,43 | 29,89 | 25,93 | 28,80 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR249      | 26,92 | 26,30 | 25,41 | 26,89 | 26,79 | 26,99 | 25,65 | 26,77 | 27,25 | 25,92 | 29,61 | 27,48 | 28,43 | 25,45 | 27,82 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR250      | 27,71 | 28,06 | 26,92 | 27,27 | 27,95 | 27,99 | 26,80 | 26,92 | 27,94 | 28,27 | 28,93 | 28,02 | 31,83 | 25,94 | 28,86 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR251      | 26,23 | 26,90 | 25,86 | 27,51 | 26,83 | 27,89 | 25,97 | 26,95 | 27,53 | 28,86 | 31,89 | 28,32 | 27,47 | 24,80 | 27,78 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR253      | 26,90 | 27,59 | 26,85 | 26,74 | 26,96 | 27,71 | 25,62 | 26,79 | 27,92 | 27,95 | 29,83 | 27,93 | 31,77 | 25,21 | 28,92 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR254      | 25,97 | 26,89 | 25,84 | 26,78 | 25,89 | 27,92 | 25,92 | 26,85 | 27,87 | 26,91 | 29,62 | 27,94 | 28,12 | 25,96 | 27,95 |
| <i>Tejidos<br/>normales</i> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| C51                         | 26,87 | 26,56 | 25,23 | 27,36 | 26,61 | 27,07 | 25,70 | 26,98 | 27,74 | 27,93 | 29,93 | 27,80 | 29,45 | 25,32 | 27,21 |
| PORL1                       | 29,11 | 29,88 | 29,73 | 28,88 | 29,48 | 30,40 | 26,91 | 28,56 | 29,88 | 28,53 | 32,88 | 29,88 | 33,97 | 27,57 | 29,79 |
| GARL2                       | 29,64 | 30,86 | 29,76 | 28,85 | 29,67 | 30,38 | 27,72 | 28,75 | 30,01 | 28,90 | 33,60 | 29,35 | 35,02 | 27,93 | 30,37 |

| CONJUNTO 1     | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| MISL3          | 28,94 | 29,75 | 28,89 | 27,93 | 28,88 | 30,00 | 26,83 | 27,69 | 28,93 | 27,81 | 32,89 | 28,89 | 32,87 | 26,84 | 28,89 |
| TROL4          | 28,82 | 29,76 | 28,59 | 28,03 | 28,91 | 29,63 | 26,82 | 27,90 | 29,84 | 27,89 | 31,67 | 28,57 | 33,81 | 27,02 | 29,32 |
| GEL5           | 28,85 | 29,94 | 28,94 | 27,96 | 28,73 | 29,74 | 27,21 | 27,69 | 29,58 | 28,67 | 31,88 | 28,86 | 33,63 | 26,99 | 29,11 |

| CONJUNTO 2       | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L /POLZ | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>   |       |       |       |       |       |       |       |             |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01-AVA-BR007 | 27,81 | 27,89 | 26,89 | 27,88 | 27,90 | 27,68 | 26,53 | 27,88       | 28,51 | 27,82 | 28,70 | 28,66 | 30,93 | 26,75 | 28,93 |
| PACS01-AVA-BR008 | 26,82 | 27,77 | 26,93 | 27,35 | 27,75 | 28,01 | 26,93 | 28,81       | 28,17 | 27,45 | 30,61 | 28,95 | 29,72 | 26,24 | 28,72 |
| PACS01-FBA-BR085 | 26,60 | 26,89 | 25,93 | 27,02 | 26,97 | 27,44 | 25,88 | 26,63       | 27,92 | 26,89 | 29,75 | 28,79 | 28,75 | 25,88 | 28,54 |
| PACS01-FBA-BR087 | 27,87 | 27,58 | 26,51 | 26,90 | 27,33 | 27,77 | 25,74 | 26,91       | 27,48 | 28,30 | 29,85 | 28,83 | 33,07 | 26,08 | 27,88 |
| PACS01-FBA-BR089 | 27,92 | 28,85 | 27,50 | 26,78 | 27,50 | 26,87 | 26,84 | 26,9,6      | 27,88 | 27,46 | 29,04 | 27,91 | 33,24 | 26,51 | 29,30 |
| PACS01-FBA-BR091 | 27,96 | 27,90 | 26,88 | 26,91 | 27,77 | 27,24 | 26,53 | 27,37       | 28,13 | 25,91 | 30,93 | 28,47 | 29,93 | 25,87 | 27,89 |
| PACS01-FLE-BR024 | 27,26 | 27,19 | 26,07 | 26,91 | 27,54 | 26,98 | 25,86 | 26,58       | 27,87 | 26,86 | 28,90 | 28,34 | 31,95 | 26,82 | 28,87 |
| PACS01-FLE-BR025 | 26,93 | 27,00 | 25,97 | 26,51 | 26,88 | 26,82 | 25,07 | 25,83       | 27,93 | 27,03 | 28,60 | 27,94 | 30,86 | 25,75 | 27,36 |
| PACS01-FLE-BR027 | 26,93 | 26,94 | 26,53 | 25,47 | 26,81 | 26,90 | 25,37 | 25,90       | 27,88 | 26,52 | 29,79 | 27,81 | 29,35 | 24,99 | 27,55 |
| PACS01-FLE-BR028 | 27,46 | 26,89 | 26,78 | 25,96 | 27,89 | 26,48 | 25,91 | 26,72       | 27,98 | 27,87 | 28,91 | 28,59 | 29,86 | 25,55 | 26,91 |
| PACS01-FLE-BR029 | 26,84 | 26,93 | 25,83 | 26,83 | 26,85 | 26,86 | 25,90 | 27,89       | 27,83 | 27,85 | 28,78 | 27,59 | 29,54 | 25,82 | 27,57 |
| PACS01-FLE-BR030 | 26,75 | 26,84 | 25,45 | 26,77 | 26,78 | 26,70 | 25,81 | 27,87       | 27,29 | 26,23 | 28,78 | 27,87 | 29,84 | 25,19 | 27,96 |
| PACS01-FLE-BR031 | 27,42 | 28,03 | 27,48 | 26,82 | 27,37 | 27,78 | 25,87 | 26,73       | 27,73 | 27,76 | 29,96 | 27,82 | 31,74 | 25,93 | 28,83 |
| PACS01-FLE-BR032 | 26,88 | 27,20 | 26,91 | 26,66 | 26,94 | 27,89 | 25,69 | 26,85       | 26,95 | 26,83 | 29,82 | 28,92 | 29,94 | 25,78 | 28,58 |
| PACS01-FLE-BR033 | 27,65 | 27,84 | 26,79 | 26,83 | 26,72 | 27,01 | 25,38 | 26,77       | 27,86 | 27,84 | 28,87 | 27,71 | 29,76 | 26,04 | 28,64 |
| PACS01-FLE-BR034 | 27,90 | 27,74 | 26,76 | 26,66 | 26,92 | 27,53 | 25,88 | 26,91       | 28,24 | 28,36 | 29,57 | 27,94 | 30,72 | 25,86 | 27,97 |
| PACS01-FLE-BR035 | 26,93 | 27,82 | 25,84 | 26,91 | 27,80 | 26,38 | 25,88 | 26,91       | 27,88 | 27,81 | 29,98 | 27,50 | 31,36 | 25,80 | 28,61 |

| CONJUNTO 2           | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L<br>/POLZ | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>       |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01-FLE-<br>BR036 | 26,95 | 26,94 | 26,13 | 26,72 | 26,70 | 26,90 | 25,80 | 26,64          | 27,85 | 26,88 | 29,71 | 27,94 | 30,21 | 25,36 | 28,86 |
| PACS01-FLE-<br>BR037 | 25,97 | 24,68 | 24,95 | 26,28 | 25,81 | 27,71 | 25,75 | 25,91          | 28,06 | 26,95 | 30,20 | 28,12 | 27,54 | 25,30 | 27,48 |
| PACS01-FLE-<br>BR038 | 26,96 | 26,92 | 25,38 | 26,95 | 26,78 | 27,05 | 25,79 | 27,80          | 27,57 | 27,68 | 29,92 | 27,94 | 29,95 | 25,80 | 27,89 |
| PACS01-<br>HBE-BR045 | 26,91 | 26,77 | 24,92 | 26,84 | 26,10 | 26,87 | 25,90 | 26,84          | 27,88 | 26,38 | 28,40 | 27,38 | 27,64 | 25,94 | 26,85 |
| PACS01-IPC-<br>BR018 | 27,68 | 27,82 | 26,89 | 26,70 | 26,79 | 27,85 | 25,84 | 26,86          | 27,86 | 28,86 | 28,91 | 27,79 |       | 25,93 | 28,82 |
| PACS01-IPC-<br>BR021 | 26,97 | 26,90 | 26,24 | 26,83 | 26,87 | 27,69 | 25,44 | 25,96          | 27,78 | 28,93 | 29,95 | 27,72 | 30,00 | 25,47 | 27,94 |
| PACS01-IPC-<br>BR022 | 27,19 | 27,96 | 26,89 | 26,85 | 27,55 | 27,92 | 25,95 | 26,47          | 27,83 | 27,84 | 30,85 | 27,81 | 33,40 | 25,95 | 28,33 |
| PACS01-<br>JGO-BR012 | 27,50 | 26,83 | 25,86 | 27,71 | 26,00 | 27,36 | 25,88 | 26,86          | 27,85 | 26,86 | 29,45 | 27,66 | 28,92 | 26,66 | 27,88 |
| PACS01-<br>JGO-BR014 | 27,92 | 27,10 | 26,82 | 27,97 | 25,91 | 27,88 | 25,93 | 26,99          | 28,92 | 27,69 | 30,70 | 28,92 | 29,83 | 25,86 | 27,80 |
| PACS01-<br>JGO-BR016 | 26,93 | 27,81 | 26,40 | 26,74 | 26,89 | 27,91 | 25,43 | 26,83          | 27,69 | 26,47 | 29,90 | 27,89 | 29,94 | 25,82 | 28,71 |
| PACS01-<br>OLA-BR041 | 25,95 | 26,68 | 25,83 | 26,91 | 25,99 | 26,90 | 24,37 | 26,71          | 27,43 | 25,43 | 28,87 | 27,50 | 28,52 | 25,19 | 26,91 |
| PACS01-<br>OLA-BR042 | 26,93 | 26,84 | 26,81 | 27,61 | 26,88 | 27,78 | 26,03 | 27,95          | 28,04 | 25,92 | 30,64 | 27,95 | 29,91 | 25,93 | 27,86 |
| PACS01-<br>OLA-BR043 | 26,97 | 27,03 | 26,40 | 26,98 | 26,84 | 27,30 | 25,79 | 26,77          | 26,86 | 27,47 | 29,25 | 27,49 | 30,92 | 25,84 | 27,89 |
| PACS01-<br>OLA-BR044 | 27,95 | 27,37 | 26,92 | 28,24 | 27,81 | 28,07 | 28,90 | 27,76          | 27,48 | 27,76 | 30,96 | 27,90 | 30,73 | 26,02 | 26,87 |
| PACS01-<br>PPA-BR047 | 27,10 | 25,88 | 25,93 | 27,51 | 27,93 | 28,97 | 26,89 | 26,04          | 28,83 | 26,83 | 31,75 | 27,64 | 29,04 | 25,79 | 27,30 |
| PACS01-<br>PPA-BR048 | 28,03 | 27,88 | 26,50 | 26,94 | 27,54 | 27,04 | 26,31 | 26,76          | 28,67 | 26,93 | 31,80 | 27,89 | 29,31 | 26,41 | 28,08 |
| PACS01-<br>PPA-BR049 | 27,33 | 27,91 | 27,71 | 26,89 | 27,30 | 27,91 | 25,93 | 26,24          | 27,16 | 27,82 | 29,10 | 27,49 | 32,49 | 25,86 | 27,69 |
| PACS01-<br>PPA-BR050 | 27,00 | 27,07 | 26,91 | 26,78 | 25,89 | 28,83 | 26,65 | 26,88          | 28,86 | 26,12 | 32,58 | 27,95 | 29,89 | 26,02 | 26,90 |
| PACS01-<br>PPA-BR053 | 26,90 | 27,72 | 26,57 | 26,79 | 26,79 | 27,59 | 26,84 | 26,56          | 27,90 | 27,94 | 30,85 | 26,95 | 29,86 | 26,92 | 27,46 |
| PACS01-<br>PPA-BR057 | 27,77 | 27,89 | 26,94 | 26,98 | 27,02 | 27,87 | 26,83 | 26,91          | 28,90 | 27,19 | 29,82 | 27,59 | 30,97 | 26,35 | 28,89 |
| PACS01-              | 26,95 | 26,92 | 26,72 | 26,80 | 27,00 | 26,67 | 26,29 | 26,38          | 27,90 | 26,81 | 29,88 | 27,82 | 31,02 | 25,77 | 27,99 |

| CONJUNTO 2             | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L<br>/POLZ | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>         |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| PPA-BR058              |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01-<br>RGA-BR061   | 26,73 | 26,90 | 25,95 | 25,89 | 26,39 | 26,86 | 24,93 | 25,88          | 26,87 | 26,90 | 28,74 | 26,92 | 30,96 | 24,74 | 26,95 |
| PACS01-<br>RGA-BR062   | 27,07 | 27,78 | 27,73 | 26,95 | 26,95 | 26,90 | 25,93 | 26,91          | 27,46 | 27,63 | 29,51 | 27,57 | 31,11 | 25,93 | 28,80 |
| PACS01-<br>RGA-BR063   | 26,96 | 27,87 | 26,90 | 26,76 | 27,10 | 27,04 | 26,36 | 26,46          | 27,84 | 25,95 | 30,92 | 27,94 | 28,89 | 26,17 | 28,90 |
| PACS01-<br>RGA-BR065   | 27,91 | 27,95 | 26,93 | 27,02 | 27,61 | 27,95 | 25,95 | 27,70          | 27,90 | 27,74 | 29,20 | 28,38 | 30,07 | 26,17 | 28,78 |
| PACS01-<br>RGA-BR066   | 27,89 | 27,69 | 26,76 | 26,32 | 27,84 | 27,82 | 25,72 | 26,96          | 27,81 | 27,82 | 28,93 | 27,93 | 31,77 | 25,88 | 27,88 |
| PACS01-<br>RGA-BR067   | 27,99 | 28,93 | 27,56 | 27,79 | 28,85 | 27,93 | 26,55 | 27,82          | 28,72 | 28,94 | 29,81 | 29,36 | 31,54 | 26,75 | 29,27 |
| PACS01-<br>RGA-BR069   | 27,41 | 28,89 | 26,90 | 26,44 | 27,73 | 26,75 | 25,91 | 26,84          | 27,90 | 27,58 | 29,91 | 28,87 | 33,89 | 25,90 | 28,89 |
| PACS01-<br>RGA-BR070   | 27,24 | 27,24 | 26,71 | 26,89 | 26,86 | 26,92 | 25,87 | 26,90          | 27,84 | 27,88 | 27,55 | 27,51 | 30,50 | 25,91 | 27,80 |
| PACS01-<br>RGA-BR071   | 26,22 | 26,35 | 25,81 | 26,64 | 25,92 | 26,92 | 24,53 | 25,75          | 26,78 | 26,07 | 28,30 | 26,22 | 29,95 | 24,90 | 26,50 |
| PACS01-<br>RGA-BR072   | 26,91 | 27,03 | 26,83 | 26,91 | 26,79 | 27,87 | 25,89 | 26,99          | 26,99 | 26,90 | 29,01 | 26,90 | 30,79 | 25,54 | 26,92 |
| PACS01-<br>RGA-BR073   | 28,96 | 28,71 | 28,54 | 27,70 | 28,53 | 28,80 | 28,59 | 29,95          | 28,44 | 28,93 | 31,69 | 29,81 |       | 27,94 | 29,86 |
| PACS01-<br>RGA-BR074   | 26,85 | 27,85 | 26,84 | 25,91 | 26,83 | 27,44 | 25,90 | 27,35          | 26,86 | 26,61 | 29,01 | 27,96 | 32,05 | 25,62 | 27,87 |
| PACS01-<br>RGA-BR075   | 26,66 | 26,93 | 25,61 | 25,74 | 26,40 | 26,26 | 24,93 | 25,93          | 26,96 | 26,96 | 28,44 | 27,64 | 28,85 | 25,66 | 27,53 |
| PACS01-<br>RGA-BR076   | 26,82 | 27,77 | 26,86 | 27,81 | 26,85 | 27,87 | 26,62 | 27,93          | 27,94 | 28,89 | 30,73 | 28,55 | 29,85 | 26,40 | 27,44 |
| PACS01-<br>RGA-BR077   | 26,95 | 27,93 | 26,22 | 26,85 | 27,01 | 27,83 | 25,91 | 26,67          | 27,20 | 27,54 | 29,30 | 26,98 | 32,50 | 25,96 | 28,06 |
| PACS01-<br>RGA-BR078   | 26,97 | 26,94 | 27,80 | 28,17 | 26,92 | 28,80 | 26,62 | 27,92          | 29,08 | 27,51 | 31,93 | 29,33 | 29,62 | 26,92 | 27,82 |
| PACS01-<br>RGA-BR079   | 27,56 | 27,80 | 26,89 | 27,07 | 27,66 | 27,95 | 26,07 | 27,47          | 27,56 | 26,95 | 29,67 | 27,91 | 31,19 | 26,77 | 28,64 |
| PACS01-<br>RGA-BR080   | 26,75 | 26,95 | 25,79 | 26,64 | 26,54 | 26,69 | 24,80 | 26,72          | 27,17 | 27,00 | 28,89 | 26,96 | 30,45 | 25,93 | 28,77 |
| PACS01-<br>RGA-BR081   | 26,90 | 26,32 | 25,63 | 26,94 | 25,87 | 26,92 | 25,02 | 26,89          | 27,88 | 27,78 | 29,53 | 28,73 | 29,06 | 25,82 | 27,91 |
| PACS01 T-<br>AVA-BR167 | 27,95 | 27,64 | 26,90 | 26,97 | 26,93 | 27,12 | 25,52 | 26,64          | 27,87 | 27,96 | 28,61 | 27,98 | 33,00 | 25,76 | 28,70 |

| CONJUNTO 2             | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L<br>/POLZ | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>         |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01 T-<br>AVA-BR168 | 27,57 | 27,04 | 26,97 | 27,26 | 27,02 | 27,60 | 25,93 | 27,92          | 28,64 | 26,91 | 30,84 | 27,93 | 30,96 | 25,92 | 27,82 |
| PACS01 T-<br>AVA-BR170 | 27,62 | 26,96 | 26,56 | 26,85 | 27,57 | 27,89 | 25,95 | 26,88          | 27,95 | 27,91 | 29,80 | 27,69 | 30,32 | 26,90 | 28,80 |
| PACS01 T-<br>AVA-BR172 | 29,90 | 28,39 | 28,80 | 28,24 | 28,84 | 28,87 | 27,41 | 28,78          | 28,64 | 28,82 | 32,89 | 28,85 | 33,08 | 27,90 | 28,89 |
| PACS01 T-<br>AVA-BR173 | 27,50 | 26,87 | 26,02 | 27,61 | 26,91 | 27,93 | 26,34 | 27,88          | 28,40 | 27,84 | 29,92 | 28,90 | 29,26 | 25,86 | 28,47 |
| PACS01 T-<br>CJP-BR156 | 27,61 | 27,96 | 26,31 | 26,69 | 26,87 | 27,58 | 26,36 | 26,82          | 27,76 | 27,88 | 27,93 | 27,90 | 30,78 | 26,46 | 29,04 |
| PACS01 T-<br>CJP-BR159 | 27,63 | 27,40 | 26,85 | 26,91 | 27,03 | 27,92 | 26,23 | 26,93          | 28,33 | 27,92 | 29,89 | 28,65 | 30,81 | 26,06 | 28,64 |
| PACS01 T-<br>CJP-BR160 | 27,91 | 27,84 | 26,78 | 26,80 | 26,78 | 27,73 | 25,92 | 26,44          | 27,82 | 27,72 | 29,80 | 27,95 | 32,67 | 25,90 | 28,90 |
| PACS01 T-<br>CJP-BR164 | 27,43 | 27,69 | 26,94 | 27,23 | 27,86 | 27,87 | 26,85 | 27,91          | 28,15 | 27,99 | 30,88 | 28,73 | 30,28 | 26,74 | 28,67 |
| PACS01 T-<br>CJP-BR166 | 27,99 | 27,91 | 26,46 | 26,99 | 27,57 | 27,18 | 26,80 | 27,87          | 27,95 | 27,75 | 28,78 | 27,97 | 32,97 | 25,95 | 27,90 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR187 | 26,92 | 27,38 | 25,92 | 26,85 | 26,64 | 27,29 | 25,79 | 26,76          | 27,30 | 25,75 | 28,55 | 26,99 | 29,92 | 25,77 | 28,23 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR188 | 27,81 | 27,95 | 26,79 | 27,49 | 27,81 | 27,89 | 26,73 | 27,94          | 27,89 | 27,90 | 29,75 | 28,15 | 33,85 | 26,94 | 28,96 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR189 | 27,98 | 27,63 | 26,76 | 26,97 | 27,75 | 27,26 | 26,80 | 27,83          | 28,86 | 27,94 | 30,99 | 28,66 | 30,71 | 25,98 | 27,11 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR190 | 28,60 | 27,80 | 27,88 | 27,42 | 27,84 | 27,96 | 26,82 | 27,85          | 28,88 | 27,53 | 30,74 | 27,96 | 32,88 | 26,43 | 27,99 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR192 | 27,34 | 27,55 | 25,88 | 26,88 | 26,93 | 27,29 | 25,64 | 27,92          | 27,51 | 28,92 | 29,45 | 27,30 | 31,19 | 25,94 | 28,73 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR193 | 26,91 | 26,95 | 25,90 | 26,34 | 26,40 | 27,05 | 25,85 | 26,88          | 26,91 | 26,57 | 28,91 | 27,93 | 28,88 | 25,54 | 26,91 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR194 | 27,42 | 27,60 | 26,85 | 27,38 | 26,96 | 26,87 | 25,87 | 28,6           | 27,37 | 28,78 | 31,09 | 26,09 | 31,23 | 25,94 | 26,91 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR195 | 24,94 | 26,90 | 25,74 | 24,92 | 25,59 | 25,84 | 24,39 | 25,93          | 26,01 | 26,83 | 29,17 | 27,01 | 29,71 | 23,91 | 27,22 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR197 | 27,88 | 27,75 | 26,90 | 26,85 | 27,13 | 28,04 | 26,59 | 26,90          | 28,66 | 27,76 | 29,98 | 28,88 | 32,03 | 26,84 | 28,91 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR198 | 27,52 | 26,91 | 26,72 | 27,25 | 26,77 | 27,40 | 26,92 | 27,14          | 27,60 | 27,70 | 30,28 | 26,92 | 30,85 | 25,95 | 26,29 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR199 | 26,89 | 27,10 | 26,81 | 27,08 | 27,51 | 27,35 | 25,88 | 26,92          | 28,62 | 25,05 | 28,80 | 27,66 | 31,76 | 26,55 | 28,40 |
| PACS01 T-              | 28,97 | 27,86 | 26,90 | 27,99 | 27,86 | 28,80 | 28,00 | 28,54          | 29,79 | 28,85 | 31,84 | 28,89 | 30,92 | 26,87 | 27,92 |

| CONJUNTO 2             | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L<br>/POLZ | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>         |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| FBA-BR200              |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01 T-<br>FBA-BR201 | 27,32 | 27,85 | 25,89 | 27,16 | 27,75 | 26,97 | 26,40 | 26,91          | 27,81 | 27,89 | 28,97 | 27,92 | 29,96 | 25,94 | 27,27 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR202 | 26,91 | 26,69 | 25,64 | 26,16 | 26,92 | 26,26 | 25,87 | 25,92          | 27,92 | 28,21 | 28,94 | 27,81 | 29,69 | 25,31 | 26,87 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR203 | 27,92 | 27,91 | 26,14 | 27,53 | 26,41 | 27,88 | 26,81 | 27,64          | 27,83 | 26,96 | 30,73 | 27,96 | 30,96 | 26,95 | 27,93 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR204 | 27,78 | 26,52 | 25,78 | 27,93 | 26,83 | 27,87 | 26,60 | 26,93          | 27,94 | 26,93 | 31,24 | 28,15 | 30,57 | 24,94 | 26,12 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR205 | 27,53 | 26,27 | 26,66 | 27,73 | 26,70 | 27,92 | 26,80 | 27,39          | 28,70 | 26,89 | 29,58 | 28,15 | 28,52 | 26,92 | 27,60 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR206 | 27,87 | 27,91 | 26,89 | 27,97 | 27,80 | 27,81 | 27,56 | 27,90          | 28,93 | 28,78 | 30,93 | 29,90 | 33,01 | 27,61 | 28,78 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR207 | 27,81 | 27,32 | 27,75 | 27,77 | 27,85 | 27,55 | 26,33 | 27,88          | 27,62 | 27,00 | 31,00 | 27,00 | 31,10 | 25,88 | 28,56 |
| PACS01 T-<br>FBA-BR208 | 26,93 | 26,88 | 26,66 | 26,88 | 26,62 | 26,92 | 25,80 | 26,85          | 27,92 | 25,88 | 30,83 | 27,97 | 29,87 | 25,55 | 27,87 |
| PACS01 T-<br>FLE-BR174 | 27,95 | 27,89 | 27,38 | 27,91 | 27,52 | 28,73 | 26,93 | 27,53          | 28,92 | 28,84 | 30,88 | 29,67 | 30,87 | 26,44 | 28,90 |
| PACS01 T-<br>FLE-BR179 | 27,89 | 27,6  | 27,80 | 27,81 | 27,92 | 27,75 | 26,96 | 26,84          | 28,76 | 27,39 | 30,28 | 28,19 | 31,45 | 26,63 | 28,74 |
| PACS01 T-<br>FLE-BR180 | 28,04 | 28,04 | 27,72 | 27,40 | 27,79 | 28,83 | 26,56 | 27,96          | 28,91 | 27,88 | 30,00 | 28,83 | 32,85 | 26,90 | 28,90 |
| PACS01 T-<br>FLE-BR181 | 27,21 | 27,77 | 26,99 | 26,89 | 26,90 | 27,59 | 25,94 | 27,54          | 27,86 | 27,89 | 30,31 | 27,43 | 30,50 | 26,86 | 28,54 |
| PACS01 T-<br>FLE-BR184 | 26,88 | 27,86 | 25,78 | 26,51 | 26,74 | 26,96 | 25,69 | 26,94          | 27,22 | 27,94 | 28,91 | 27,90 | 32,87 | 26,60 | 28,88 |
| PACS01 T-<br>FLE-BR185 | 26,64 | 26,64 | 26,89 | 26,93 | 27,91 | 24,95 | 26,89 | 27,00          | 27,93 | 26,88 | 28,74 | 26,97 | 30,02 | 25,86 | 29,15 |
| PACS01 T-<br>FLE-BR186 | 27,93 | 27,81 | 26,84 | 27,16 | 27,85 | 27,89 | 26,69 | 27,37          | 28,69 | 27,76 | 30,82 | 28,97 | 30,72 | 26,20 | 27,98 |
| PACS01 T-<br>JGO-BR231 | 26,56 | 26,89 | 26,42 | 26,94 | 26,38 | 26,95 | 25,80 | 26,90          | 27,90 | 27,57 | 28,39 | 27,57 | 29,85 | 25,89 | 27,15 |
| PACS01 T-<br>JGO-BR234 | 26,92 | 27,73 | 25,88 | 26,88 | 25,88 | 26,49 | 25,89 | 26,87          | 27,87 | 26,90 | 27,81 | 27,93 | 30,85 | 25,93 | 28,02 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR235 | 26,94 | 26,96 | 25,94 | 26,89 | 26,49 | 27,08 | 25,91 | 26,91          | 27,52 | 28,41 | 29,37 | 27,90 | 29,64 | 25,83 | 28,51 |
| PACS01 T-<br>PPA-BR236 | 26,66 | 26,82 | 25,28 | 26,86 | 26,81 | 27,85 | 26,84 | 27,42          | 27,96 | 26,92 | 30,86 | 28,44 | 28,86 | 25,94 | 27,91 |
| PACS01 T-<br>RGA-BR209 | 27,95 | 27,33 | 26,71 | 26,97 | 26,85 | 26,97 | 25,75 | 27,70          | 27,53 | 27,56 | 30,13 | 27,09 | 32,79 | 25,89 | 27,95 |

| CONJUNTO 2                  | POLA1 | POLD1 | POLE  | REV1  | POLH  | POLM  | POLK  | REV3L<br>/POLZ | POLL  | POLB  | POLN  | POLI  | POLQ  | IPO8  | HMBS  |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Tumores</i>              |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| PACS01 T-<br>RGA-BR211      | 28,84 | 27,98 | 27,89 | 27,72 | 27,79 | 28,23 | 26,94 | 27,85          | 28,96 | 29,86 | 29,82 | 28,91 | 31,96 | 26,72 | 28,85 |
| PACS01 T-<br>RGA-BR212      | 25,80 | 25,12 | 24,80 | 25,72 | 27,13 | 26,83 | 25,81 | 25,51          | 27,15 | 26,99 | 27,68 | 27,81 | 27,88 | 25,61 | 26,44 |
| PACS01 T-<br>RGA-BR214      | 27,93 | 26,93 | 26,60 | 26,64 | 26,88 | 27,05 | 25,92 | 26,94          | 27,89 | 27,47 | 30,90 | 27,86 | 32,63 | 25,93 | 27,91 |
| PACS01 T-<br>RGA-BR215      | 27,81 | 26,99 | 26,91 | 27,91 | 27,71 | 27,93 | 26,84 | 27,88          | 28,80 | 27,60 | 29,73 | 28,82 | 30,79 | 26,95 | 27,68 |
| PACS01 T-<br>RGA-BR219      | 27,65 | 27,76 | 26,85 | 27,47 | 27,27 | 27,90 | 26,84 | 27,25          | 28,76 | 27,94 | 29,86 | 28,85 | 30,97 | 26,52 | 28,26 |
| PACS01 T-<br>RGA-BR220      | 26,95 | 27,00 | 26,74 | 26,96 | 26,87 | 26,89 | 25,79 | 26,92          | 27,87 | 27,34 | 29,86 | 27,60 | 30,98 | 25,82 | 27,86 |
| <i>Tejidos<br/>normales</i> |       |       |       |       |       |       |       |                |       |       |       |       |       |       |       |
| C51                         | 26,89 | 27,65 | 26,92 | 25,80 | 27,93 | 27,96 | 24,74 | 25,91          | 27,25 | 27,76 | 29,04 | 27,92 | 32,83 | 25,92 | 27,78 |
| PORL1                       | 29,11 | 29,57 | 29,35 | 27,78 | 28,83 | 29,82 | 27,24 | 28,14          | 29,20 | 28,80 | 32,45 | 29,14 | 33,24 | 27,31 | 28,89 |
| GAR2                        | 29,75 | 30,87 | 29,94 | 28,37 | 29,63 | 30,28 | 27,78 | 28,69          | 29,75 | 29,91 | 32,84 | 29,78 | 33,87 | 28,08 | 30,77 |
| MISL3                       | 28,92 | 28,92 | 28,78 | 26,94 | 28,78 | 29,32 | 26,44 | 27,90          | 28,95 | 27,84 | 31,75 | 28,66 | 33,89 | 26,91 | 28,91 |
| FAV6                        | 29,88 | 30,89 | 29,82 | 28,87 | 29,48 | 30,59 | 27,94 | 29,00          | 29,93 | 28,89 | 32,55 | 29,81 | 35,94 | 27,92 | 29,86 |
| ROV3                        | 29,74 | 29,46 | 29,77 | 27,87 | 29,74 | 29,98 | 26,94 | 28,84          | 29,85 | 28,62 | 32,11 | 28,88 | 34,71 | 27,89 | 29,88 |
| ZIT5                        | 29,31 | 29,75 | 29,46 | 28,77 | 28,88 | 29,67 | 27,61 | 28,92          | 29,88 | 27,99 | 31,95 | 28,78 |       | 27,67 | 29,64 |

De forma interesante, la ADN polimerasa descubierta más recientemente *POLN*, que es la más estrechamente relacionada con *POLQ* (Marini et al. J Biol Chem 278: 32014-32019, 2003), también estaba significativamente sobreexpresada en tumores. También se observó una subexpresión significativa de transcritos tumorales para el gen de la ADN polimerasa especializada *POLB* (Fig. 1). Se encontraron datos muy similares cuando se realizó un análisis de genotipado independiente (es decir, usando un lote independiente de Low Density Arrays) en un segundo conjunto de tumores (n = 105, Tabla 1 y Fig. 2), excepto que, además de *POLB*, las relaciones T/N de *REV1* y *POLK* son mayoritariamente menores que 1 en esta serie. Usando una presentación gráfica de la correlación de Spearman no paramétrica, se encontró que en el primer conjunto de tumores (n = 101), los defectos de expresión de genes que codifican las polimerasas especializadas *POLN*, *POLM*, *POLK*, *POLL* y *POLI* estaban significativamente correlacionados (Fig. 3), todo Spearman > 0,5). Por el contrario, el perfil de expresión específica que se encontró para *POLQ* no estaba agrupado en este patrón, mostrando que el aumento del gen *POLQ* en tumores fue independiente de la regulación de otras polimerasas especializadas.

## 2.2. El aumento intratumoral de *POLQ* está asociado con un resultado clínico pobre

Para investigar si los niveles de expresión de ADN polimerasas en tumores podrían estar relacionados con la supervivencia del paciente, se llevó a cabo una prueba de rangos logarítmicos (figura 4). Para la cohorte francesa, la expresión elevada del gen *POLQ* se asoció significativamente con una mala supervivencia (p = 0,0001) (figura 4A), sugiriendo fuertemente que el aumento del gen *POLQ* está asociado con la peor supervivencia en pacientes con cáncer de mama.

La metástasis de los ganglios linfáticos está asociada con una mala supervivencia en cáncer de mama, como se confirma en nuestras dos cohortes (datos no representados). Los resultados de la cohorte francesa (Fig. 4B) indican que pacientes con número elevado de ganglios linfáticos positivos (2 o más ganglios implicados con cáncer de mama metastásico) pero baja expresión de *POLQ* tuvieron una tasa de supervivencia significativamente mejor que los pacientes con una expresión elevada de *POLQ* y un número elevado de ganglios linfáticos (comparación por parejas, cohorte francesa, p = 0,0001). Se debería destacar que los pacientes con un número elevado de ganglios linfáticos y un nivel bajo de expresión de *POLQ* tuvieron una tasa de supervivencia comparable a otros pacientes con número bajo de ganglios linfáticos y nivel elevado de expresión de *POLQ* (comparación por parejas, cohorte francesa, p = 0,793). Solamente el grupo de pacientes con un número elevado de ganglios linfáticos positivos y un nivel elevado de expresión de *POLQ* tuvieron una mala supervivencia.

Se mostró una asociación estadística significativa entre la expresión de *POLQ* y el número de ganglios linfáticos positivos (p = 0,0172), grado histológico III (p < 0,0001), tamaño tumoral (Spearman 0,1611, p = 0,0237), estado del receptor de estrógeno (ER) (p < 0,0001), estado del receptor de progesterona (PgR) (p = 0,0034), expresión de Ki67 (p < 0,0001) y estado de HER2 (p = 0,0032) (Tabla 4). De forma interesante, los pacientes que presentan tumores "triplemente negativos" (es decir, ER negativo, PgR negativo, HER2 negativo) mostraron mayores niveles de expresión de *POLQ* (p = 0,0422). Se realizó un análisis de multivarianza que incluye el número de ganglios linfáticos implicados, grado histológico, receptores hormonales, invasión vascular, y expresión de *POLQ* (Tabla 5). De forma muy interesante, los modelos finales contienen implicación de los ganglios linfáticos (HR = 2,78, CI95% = [1,29; 6,01]) y expresión de *POLQ* (HR = 3,33, CI95% = [1,56; 7,12]).

Tabla 4: Correlación entre la expresión de *POLQ* y el estado clínico

|                       | Pol Q Baja (N = 138) |        | Pol Q Alta (N = 65) |        | p                   |
|-----------------------|----------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|
|                       | n                    | %      | n                   | %      |                     |
| Edad (cl)             |                      |        |                     |        | p = 0,5589 (chi -2) |
| < 50                  | 64                   | (46,4) | 33                  | (50,8) |                     |
| ≥ 50                  | 74                   | (53,6) | 32                  | (49,2) |                     |
| Ganglios positivos    |                      |        |                     |        | p = 0,0172 (chi -2) |
| 1-3                   | 94                   | (68,1) | 33                  | (50,8) |                     |
| ≥ 3                   | 44                   | (31,9) | 32                  | (49,2) |                     |
| Tipo histológico      |                      |        |                     |        | p = 0,0003 (chi -2) |
| Carcinoma ductal      | 97                   | (70,3) | 62                  | (95,4) |                     |
| Carcinoma lobulillar  | 21                   | (15,2) | 2                   | (3,1)  |                     |
| Otro                  | 20                   | (14,5) | 1                   | (1,5)  |                     |
| Grado histológico     |                      |        |                     |        | p < 0,0001 (chi -2) |
| I-II                  | 89                   | (67,4) | 12                  | (18,5) |                     |
| III                   | 43                   | (32,6) | 53                  | (81,5) |                     |
| Ausente               | 6                    |        | 0                   |        |                     |
| Tamaño tumoral        |                      |        |                     |        | p = 0,0432 (chi -2) |
| < 2 cm                | 40                   | (29,6) | 10                  | (16,1) |                     |
| ≥ 2 cm                | 95                   | (70,4) | 52                  | (83,9) |                     |
| Ausente               | 3                    |        | 3                   |        |                     |
| Receptor de estrógeno |                      |        |                     |        | p < 0,0001 (chi -2) |

|                          |     |        |    |        |                     |
|--------------------------|-----|--------|----|--------|---------------------|
| Negativo                 | 28  | (20,9) | 31 | (48,4) |                     |
| Positivo                 | 106 | (79,1) | 33 | (51,6) |                     |
| Ausente                  | 4   |        | 1  |        |                     |
| Receptor de progesterona |     |        |    |        | p = 0,0034 (chi -2) |
| Negativo                 | 69  | (51,5) | 47 | (73,4) |                     |
| Positivo                 | 65  | (48,5) | 17 | (26,6) |                     |
| Ausente                  | 4   |        | 1  |        |                     |
| Ki 67                    |     |        |    |        | p < 0,0001 (chi -2) |
| <20 %                    | 72  | (66,1) | 19 | (33,9) |                     |
| >20 %                    | 37  | (33,9) | 37 | (66,1) |                     |
| Ausente                  | 29  |        | 9  |        |                     |
| Estado de HER2           |     |        |    |        | p = 0,0032 (chi -2) |
| Negativo                 | 109 | (89,3) | 41 | (71,9) |                     |
| Positivo                 | 13  | (10,7) | 16 | (28,1) |                     |
| Ausente                  | 16  |        | 8  |        |                     |
| Subtipo molecular        |     |        |    |        | p = 0,0422 (chi -2) |
| Negativo                 | 15  | (12,7) | 14 | (25,0) |                     |
| triple                   |     |        |    |        |                     |
| Otros                    | 103 | (87,3) | 42 | (75,0) |                     |
| Ausente                  | 20  |        | 9  |        |                     |

Tabla 5: Análisis de multivarianza – supervivencia específica del cáncer (n = 192)

|                                          | Modelo inicial <sup>a</sup> |              |          | Modelo final <sup>b</sup> |              |          |
|------------------------------------------|-----------------------------|--------------|----------|---------------------------|--------------|----------|
|                                          | HR                          | CI95%        | p (Wald) | HR                        | CI95%        | p (Wald) |
| Número de ganglios linfáticos implicados |                             |              |          |                           |              |          |
| 1-3                                      | 1                           |              |          | 1                         |              |          |
| > 3                                      | 2,80                        | [1,29; 6,07] | 0,009    | 2,78                      | [1,29; 6,01] | 0,009    |
| Grado histológico                        |                             |              |          |                           |              |          |
| I - II                                   | 1                           |              |          |                           |              |          |
| III                                      | 2,33                        | [0,91; 6,01] | 0,079    | NS <sup>c</sup>           |              |          |
| Receptores de hormonas                   |                             |              |          |                           |              |          |
| Negativa                                 | 1,54                        | [0,71; 3,36] | 0,274    | NS                        |              |          |
| Positiva                                 | 1                           |              |          |                           |              |          |
| Invasión vascular                        |                             |              |          |                           |              |          |
| Ausente                                  | 1                           |              |          |                           |              |          |
| Presente                                 | 1,71                        | [0,81; 3,63] | 0,161    | NS                        |              |          |
| Expresión de POLQ                        |                             |              |          |                           |              |          |
| Baja                                     | 1                           |              |          |                           |              |          |
| Alta                                     | 1,99                        | [0,86; 4,61] | 0,109    | 3,33                      | [1,56; 7,12] | 0,002    |

a. Modelo inicial: incluyendo todas las variables con p < 0,05 en el análisis univariante.

b. Modelo final: mismo modelo tras el algoritmo por etapas hacia atrás.

c. NS, no significativo después del algoritmo por etapas.

HR, relación de riesgos; CI intervalo de confianza.

### 2.3. La expresión ectópica de POLQ afecta al ciclo celular y a la proliferación

5

Los datos sugieren que *POLQ* es solamente un marcador de pronóstico espectador, o que podría contribuir activamente a la progresión tumoral. Para evaluar el impacto específico de la sobreexpresión de *POLQ* sobre la estabilidad genética y la proliferación celular, se generaron tres clones de *POLQ* recombinantes (Q1, Q2 y Q3) que sobreexpresan de forma estable cantidades crecientes de proteína *POLQ* en comparación con los niveles endógenos presentados por controles isogénicos (figura 5A). La sobreexpresión de transcritos de *POLQ* en estos clones (que oscila de 10 a 15 veces) fue comparable a la observada en tumores (datos no mostrados). El análisis de FACS cuantitativo tras la tinción del ADN (figura 5B) reveló que Q1, Q2, y en mayor grado Q3, se acumularon significativamente en la fase S en comparación con los controles. También se observó una acumulación significativa de células Q3, que expresaron la cantidad más elevada de *POLQ*, en la fase G2/M. Consistente con el retraso en la fase S y la transición G2/M, se encontró que las células Q3 proliferaron más lentamente en cultivo exponencial, con un mayor tiempo de duplicación (25,2 h) en comparación con células de control (22,5 h para CTL1 y 20,2 h para

10

15

CTL2) o con los otros clones que expresan POLQ (20,0 h para Q1 y 22,7 h para Q2) (datos no representados). Tomados juntos, estos resultados indican que el aumento de POLQ en células humanas afecta a la progresión del ciclo celular en ausencia de estrés externo.

#### 5 2.4. La expresión ectópica de POLQ induce señalización de daño mediado por ruptura del ADN

Para investigar el impacto de la sobreexpresión de POLQ sobre la estabilidad genómica, se realizaron a continuación ensayos de inmunofluorescencia para detectar  $\gamma$ -H2AX, la forma fosforilada de la histona H2AX que se acumula en DSB. Se observó que las células que sobreexpresan POLQ mostraron claramente un incremento significativo de 2 a 3 veces en la formación de foci de  $\gamma$ -H2AX en comparación con los controles isogénicos (Fig. 6A, Q1  $p < 0,002$ ; Q2,  $p < 0,001$ ; Q3  $p < 0,003$ ). El análisis de inmunotransferencia con anticuerpos  $\gamma$ -H2AX (Fig. 7) confirmó estos datos. Entonces se determinó el nivel de activación de dos cinasas transductoras centrales en la señalización del daño al ADN, CHK1 y CHK2. El nivel de CHK1 fosforilada permaneció sin cambio en presencia de nivel elevado de POLQ (dato no representado). Por el contrario, los experimentos de inmunodetección que analizan la formación de foci de la forma fosforilada de CHK2 revelaron una activación significativa de la CHK2 cinasa en las tres estirpes celulares (Q1  $p < 0,0018$ ; Q2,  $p < 0,002$ ; Q3  $p < 0,01$ ) en comparación con las células de control isogénicas (Fig. 6B). Este dato se confirmó mediante inmunotransferencia (dato no representado). De forma interesante, el análisis confocal indicó que la mayoría de los foci de PT68-CHK2 en todas las estirpes celulares que sobreexpresan POLQ se colocaron con los foci de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 6C), mostrando que la CHK2 cinasa activada se localizó en los sitios del daño al ADN. Esto sugiere que la sobreexpresión de POLQ induce la activación del punto de control del daño al ADN  $\gamma$ H2AX-ATM-CHK2.

#### 2.5. Las células que sobreexpresan POLQ presentaron anomalías cromosómicas espontáneas

Para investigar adicionalmente las consecuencias de la sobreexpresión de POLQ sobre la estabilidad cromosómica, se analizaron frotis de metafase procedentes de los clones Q1, Q2, Q3 y de los controles isogénicos. La sobreexpresión de POLQ dio como resultado un incremento significativo en la frecuencia de células que presentan cuadrirradiales, fusiones extremo a extremo, y rupturas de cromátidas (se detectó 25% de metafases aberrantes en células POLQ frente al 15% en los controles; figura 8). Estos datos indican que la inestabilidad cromosómica espontánea se produce en células que sobreexpresan POLQ, que puede ser la consecuencia de la ruptura incrementada del ADN observada.

#### 2.6. La dinámica de la replicación está perturbada en células que sobreexpresan POLQ

Un papel propuesto de POLQ en BER podría ser que POLQ sobreexpresada interfiere con la ruta de BER, y conduce a una acumulación de daño al ADN endógeno (incluyendo daño generado por especies oxigenadas reactivas). Para estudiar esta hipótesis, se midió la sensibilidad de las células que sobreexpresan POLQ a metanosulfonato de metilo (MMS) y a nitroso-N-metilurea (MNU) (figura 9), los cuales inducen daño al ADN reparado por BER. Se encontró que la sobreexpresión de POLQ no afectó significativamente a la supervivencia con los tratamientos de MMS y MNU, sugiriendo que la progresión defectuosa del ciclo celular, la inestabilidad genética así como la activación del punto de control del daño al ADN no resultan de una BER defectuosa del daño al ADN endógeno en las células que sobreexpresan POLQ.

Los resultados presentados anteriormente nos condujeron a examinar la dinámica de la replicación en células que sobreexpresan POLQ. Para evaluar si la sobreexpresión de POLQ afectó a la velocidad de progresión de la horquilla de replicación, se llevó a cabo el peinado molecular dinámico. Este método permitió determinar la polaridad de las horquillas de replicación *in vivo* a nivel de moléculas de ADN replicantes individuales, así como la distribución de las velocidades de la horquilla (figura 10). La velocidad de la mediana medida en células de control fue 1,699 kb/min. ( $n = 144$ ), mientras que las células Q2 y Q3 presentaron una menor velocidad de 1,403 kb/min. ( $n = 113$ ) y 1,402 kb/min. ( $n = 200$ ), respectivamente. En conclusión, las células que sobreexpresan POLQ presentaron una reducción sustancial en la velocidad de replicación global, demostrando que POLQ en exceso constituye un inductor potente del estrés replicativo en células humanas. Una sobreexpresión similar de POLB o POLQ es suficiente para impedir la progresión de la horquilla de replicación (Chirgwin et al. Biochemistry 18: 5294-5299, 1979).

#### 55 2.7. Las células que sobreexpresan POLQ son hipersensibles a un inhibidor de Chk2

Células de cáncer de mama MDA-MB231 y MCF7 (ATCC) se hicieron crecer en medio RPMI 1640+ glutamax. Se preparó una disolución madre 13,8 mM de Chk2 inhibitor II Hydrate (Sigma RefC3742) diluyendo el agente en DMSO (Sigma), y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta disolución se diluyó en medio de cultivo para dar como se indica la concentración de fármaco final. Las células se expusieron a concentraciones diferentes que oscilan desde 1  $\mu\text{M}$  hasta 150  $\mu\text{M}$  durante 16 horas. Las células se lavaron con tampón de PBS, se añadió medio reciente, y las células se incubaron durante siete días más. Las células se fijaron con NaCl 0,9% y se tiñeron con violeta de cristal (Sigma C3886). Se contaron los clones que contienen más de 20 células. Para el ensayo clonogénico, se sembraron 400 células en placas de seis pocillos y se incubaron toda la noche. La expresión de POLQ se midió mediante PCR en tiempo real como se describe anteriormente.

Las células que sobreexpresan POLQ acumulan daño al ADN. Dichos daños disparan el punto de control del daño al ADN dependiente de ATM mediante la activación de la proteína cinasa Chk2, conduciendo eventualmente a la detención del ciclo celular. Esto sugirió que las células que sobreexpresan POLQ serían hipersensibles a inhibidores de la señalización del daño al ADN. A fin de ensayar esta hipótesis, se determinó la viabilidad de las células MCF7 y MDA-MB231 en presencia de cantidades crecientes de un inhibidor de Chk2. En paralelo, en cada estirpe celular se evaluó la expresión de POLQ.

Como se muestra en la figura 12, MCF7, que expresa tanto como más del doble de ARN de POLQ que MDA-MB231 son hipersensibles al inhibidor de CHK2. De este modo, existe una correlación entre la expresión de POLQ y la sensibilidad a la inhibición de la ruta de señalización del daño al ADN.

#### Listado de secuencias

- 15 <110> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)  
 Université Paul Sabatier Toulouse III  
 Institut Claudius Regaud
- <120> SIGNATURA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA AGRESIVIDAD Y LA INESTABILIDAD GENÉTICA DEL  
 CÁNCER DE MAMA
- 20 <130> D28090  
 <150> EP09306096.0  
 <151> 2009-11-13  
 <160> 15  
 <170> PatentIn version 3.3
- 25 <210> 1  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial
- 30 <220>  
 <223> cebador de IPO8  
 <400> 1  
 aggggaattg atcagtgcat tccac 26
- 35 <210> 2  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 40 <223> Cebador de HMBS  
 <400> 2  
 gcggctgcaa cggcggaaga aaaca 25
- 45 <210> 3  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 50 <223> cebador de POLA  
 <400> 3  
 tacaaccaac caggtgtggt atttc 25
- <210> 4  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 55 <223> cebador de POLD1  
 <400> 4  
 ctgtttgaag cgggatggat ggcaa 25
- 60 <210> 5  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>
- 65

<223> cebador de POLE  
 <400> 5  
 ctttgaagag gtgtgtgatg agatt 25  
  
 5 <210> 6  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> cebador de REV1L  
 <400> 6  
 gggaaacatg ggggtgggtat atggc 25  
  
 <210> 7  
 15 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de POLH  
 20 <400> 7  
 tcacacaata aggtcctggc aaaac 25  
  
 <210> 8  
 <211> 25  
 25 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de POLM  
 <400> 8  
 30 gcagaaagcg gggctccagc accac 25  
  
 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 35 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de POLK  
 <400> 9  
 gccacgaagg ggtccagatt ttatg 25  
 40  
 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> cebador de REV3L  
 <400> 10  
 aaaagcccag ggagattggt ggacg 25  
 50  
 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> cebador de POLL  
 <400> 11  
 gattgagcag acagtccaga aagca 25  
  
 <210> 12  
 60 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador de POLB  
 65 <400> 12  
 gagttagtgg cattggtcca tctgc 25

5      <210> 13  
       <211> 25  
       <212> ADN  
       <213> secuencia artificial  
       <220>  
       <223> cebador de POLN  
       <400> 13  
 10      tggagcaggg aaggagcggc tggct   25  
       <210> 14  
       <211> 25  
       <212> ADN  
       <213> secuencia artificial  
 15      <220>  
       <223> cebador de POLI  
       <400> 14  
       ccagctcgca gggagttcat gatca   25  
 20      <210> 15  
       <211> 25  
       <212> ADN  
       <213> secuencia artificial  
       <220>  
 25      <223> cebador de POLQ  
       <400> 15  
       gccttccca ggtggtcaa tactg   25

## REIVINDICACIONES

1. Método para pronosticar una mala supervivencia de un paciente que sufre un cáncer de mama, que comprende:

- a) medir *in vitro* el nivel de expresión del gen POLQ y/o una o varias de sus isoformas, y el nivel de expresión de un gen de control en una muestra de cáncer de mama de dicho paciente,
- b) calcular para dicho gen POLQ y/o isoforma una relación de nivel de expresión del nivel de expresión de POLQ y/o una o varias de sus isoformas a la expresión de dicho gen de control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente,
- c) comparar dicha relación del nivel de expresión génica con un valor umbral correspondiente, y
- d) pronosticar una mala supervivencia si dicha relación es superior a su valor umbral correspondiente.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el paciente presenta un número elevado de ganglios linfáticos metastásicos.

3. Método según la reivindicación 1, en el que el cáncer de mama expresa un ADNc de p53 de tipo salvaje.

4. Método para diagnosticar la inestabilidad genética en un cáncer de mama en un paciente a partir de una muestra de cáncer de mama de dicho paciente, que comprende:

- a) medir *in vitro* el nivel de expresión del gen POLQ y una o varias de sus isoformas, y el nivel de expresión de un gen de control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente,
- b) calcular para dicho gen POLQ y/o isoforma una relación de nivel de expresión del nivel de expresión de POLQ y/o una o varias de sus isoformas a la expresión de dicho gen de control en dicha muestra de cáncer de mama del paciente,
- c) comparar dicha relación del nivel de expresión génica con un valor umbral correspondiente, y
- d) diagnosticar la inestabilidad genética del cáncer de mama si dicha relación es superior a su valor umbral correspondiente.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho gen de control es un gen constitutivo.

6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho gen constitutivo es un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS.

7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho gen es IPO8 o HMBS.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho nivel de expresión se mide al nivel del ARNm.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho nivel de expresión se mide utilizando PCR cuantitativa o tecnología de micromatrices.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho nivel de expresión se mide a nivel proteico.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho nivel de expresión se mide utilizando anticuerpos específicos.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho valor umbral es 15,8.

13. Utilización de una micromatriz que comprende a lo sumo 500 sondas, hibridándose específicamente al menos una de las cuales a POLQ, e hibridándose específicamente al menos otra sonda a un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en el gen IPO8 y el gen HBMS en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Utilización de un kit, que comprende una micromatriz, comprendiendo dicha micromatriz a lo sumo 500 sondas, hibridándose específicamente al menos una de las cuales a POLQ, e hibridándose específicamente al menos otra sonda a un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en el gen IPO8 y el gen HBMS, o cebadores de amplificación para POLQ, comprendiendo además dicho kit unos cebadores de amplificación específicos para un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en el gen IPO8 y el gen HBMS, en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Método para pronosticar la eficacia de radioterapia o de inhibidores de la reparación del ADN, de la señalización del daño al ADN o del metabolismo nucleotídico, en el tratamiento de cáncer de mama en un paciente, que comprende:

- 5
- a) diagnosticar o no la inestabilidad genética en dicho cáncer de mama en dicho paciente utilizando el método según la reivindicación 4, y
- 10
- b) pronosticar la eficacia de la radioterapia o de los inhibidores de la reparación del ADN si se ha diagnosticado una inestabilidad genética en la etapa a).

Figura 1

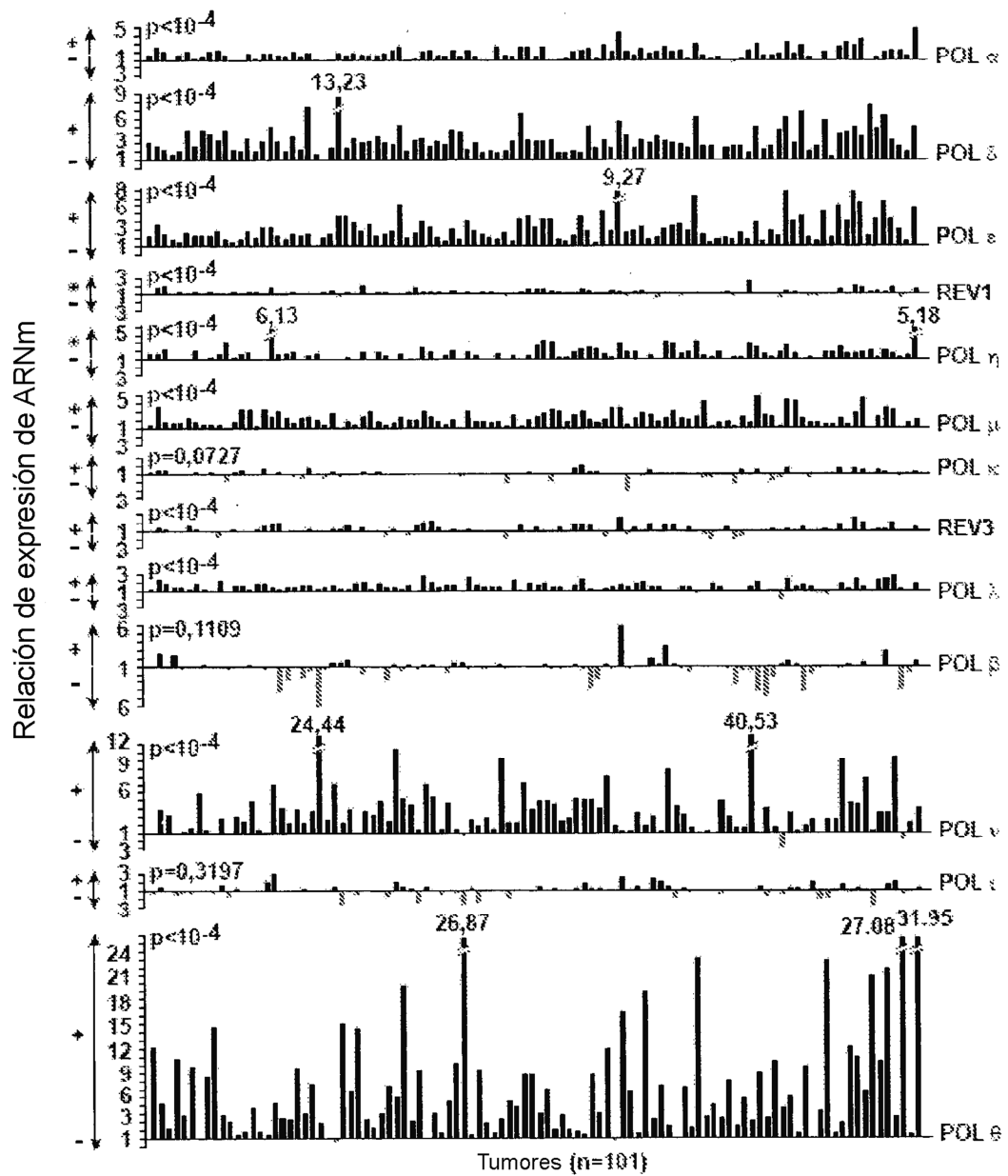


Figura 2

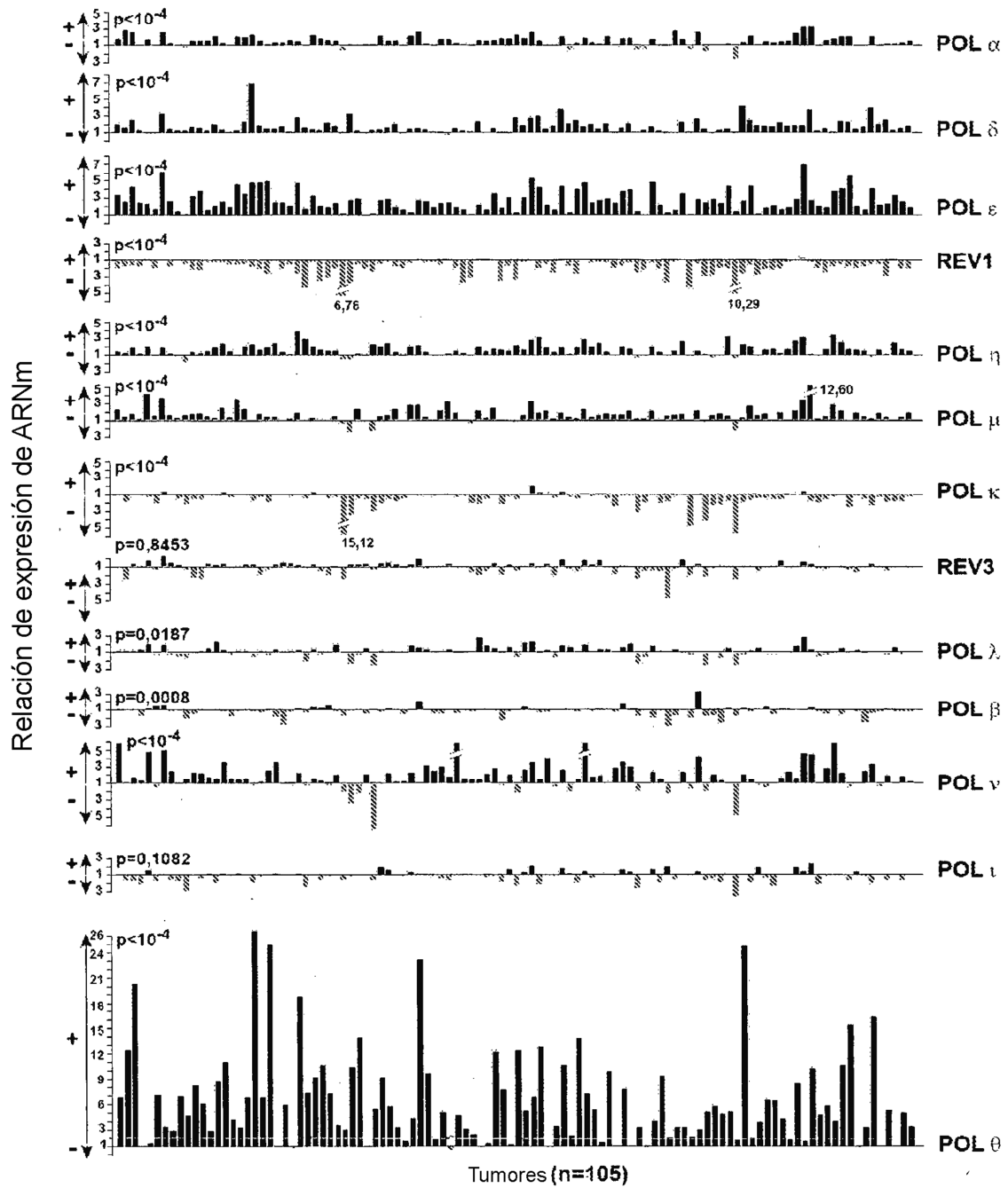


Figura 3

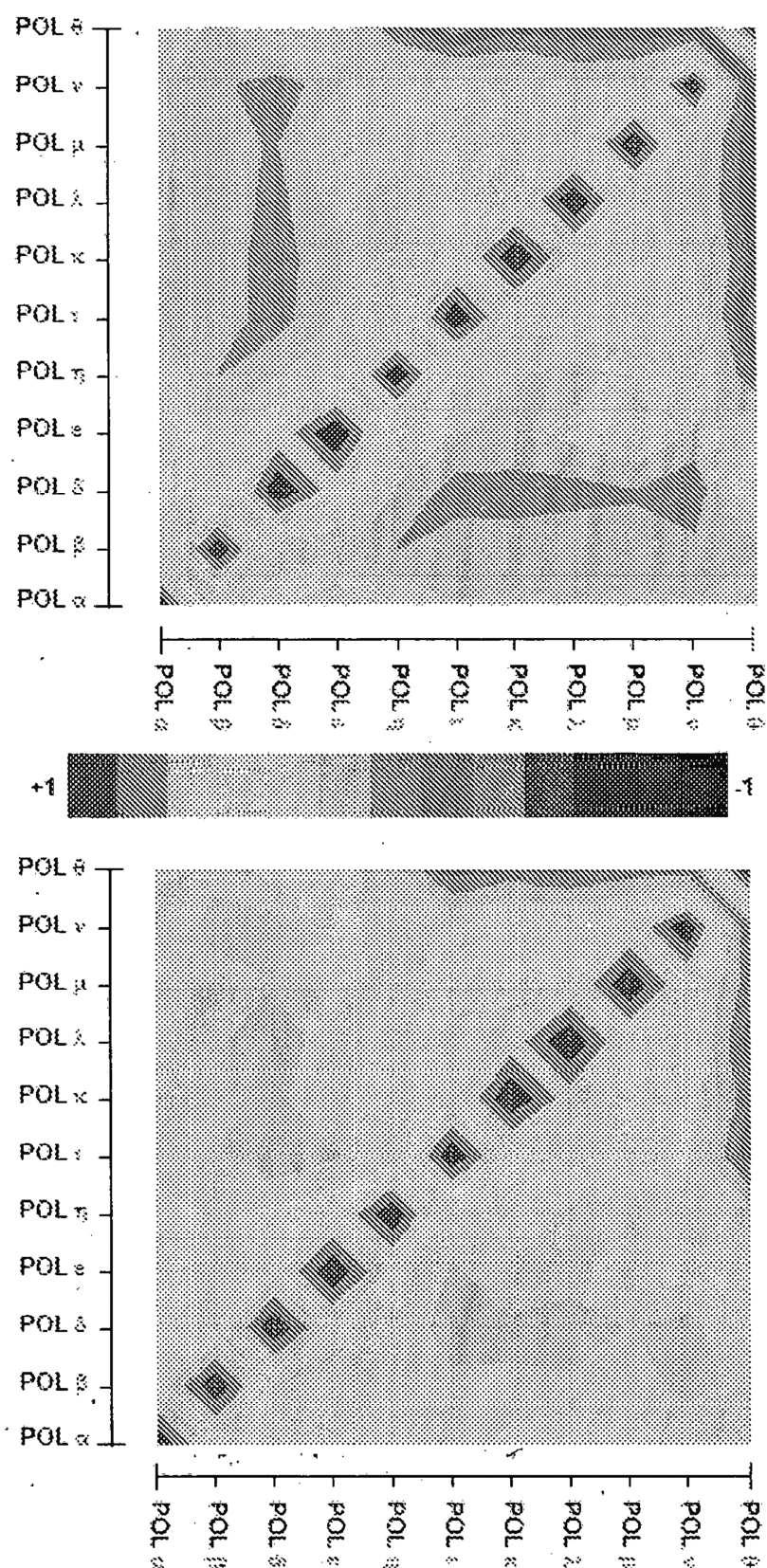


Figura 4

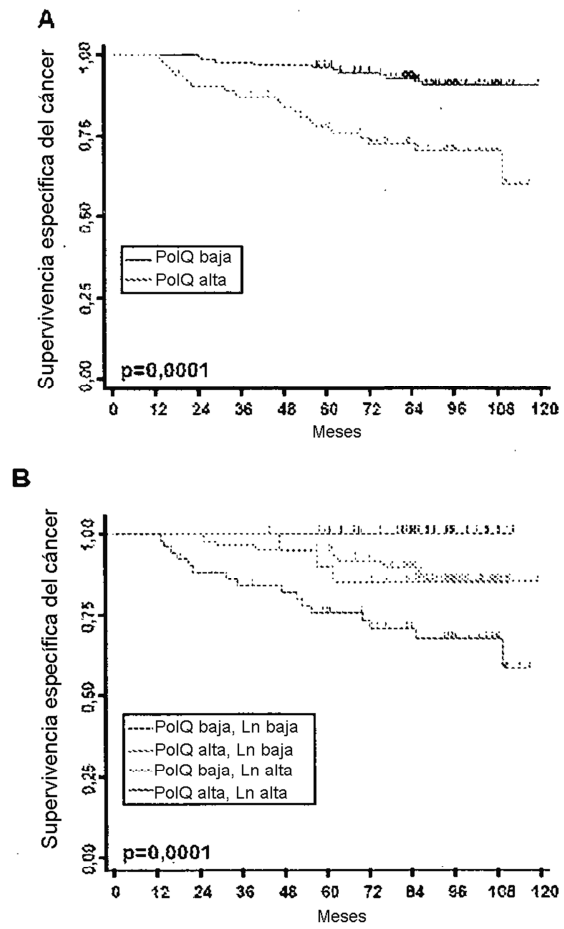


Figura 5

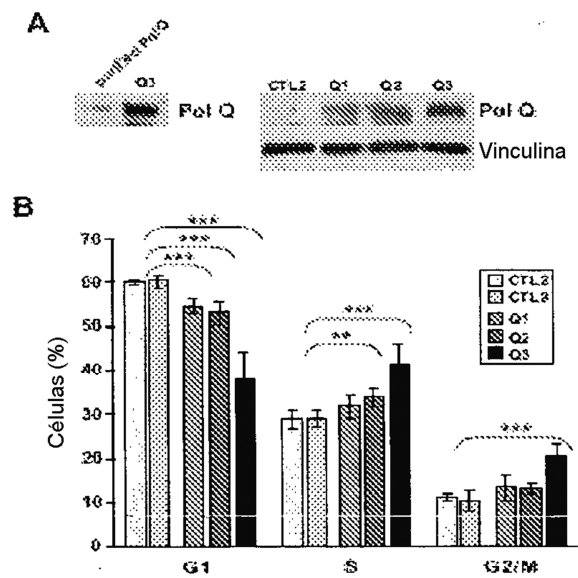


Figura 6

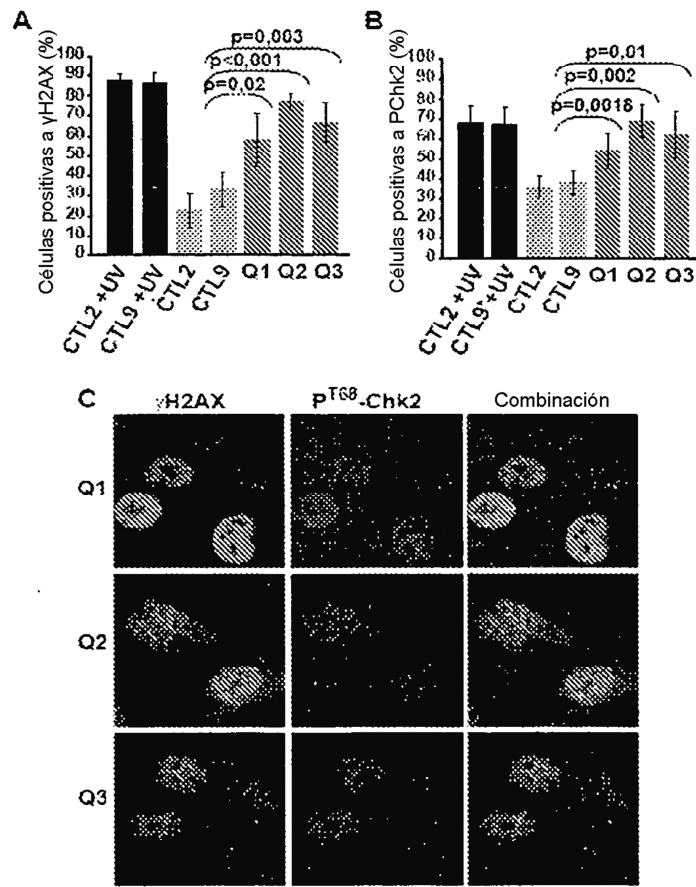


Figura 7

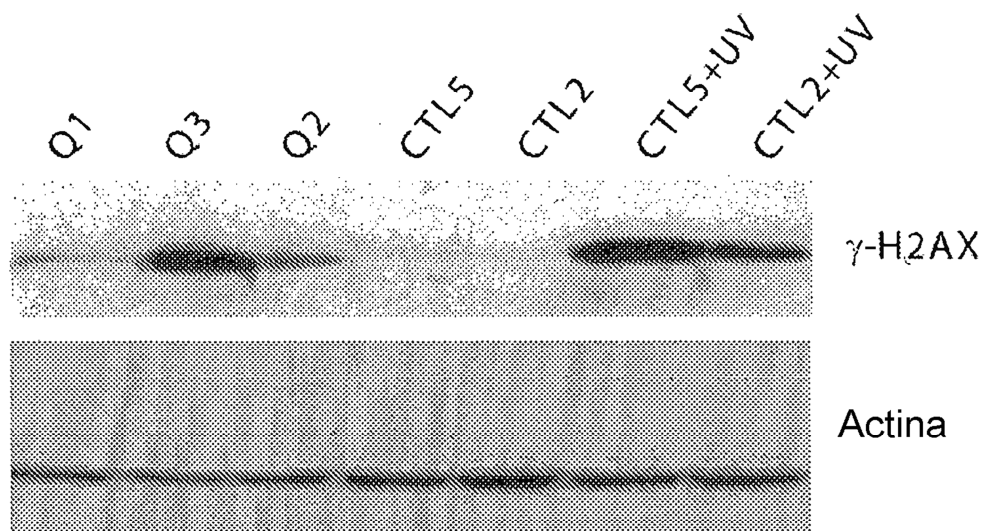


Figura 8

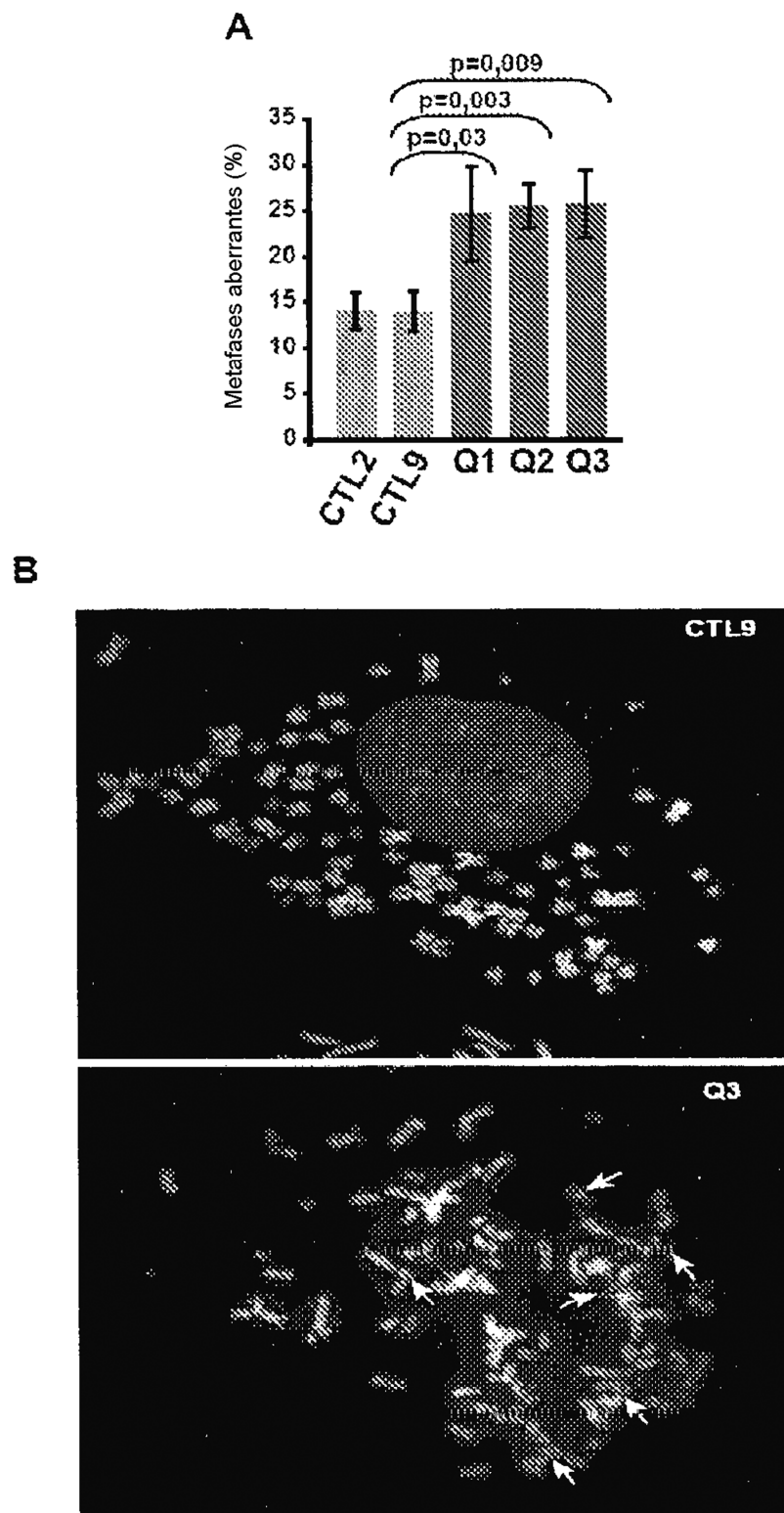


Figura 9

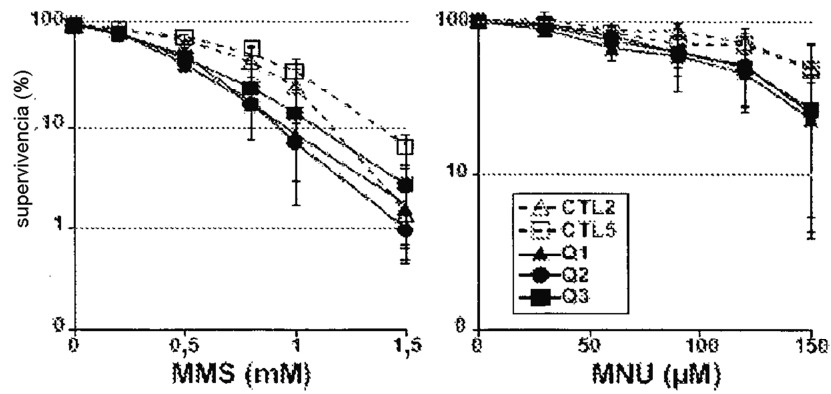


Figura 10

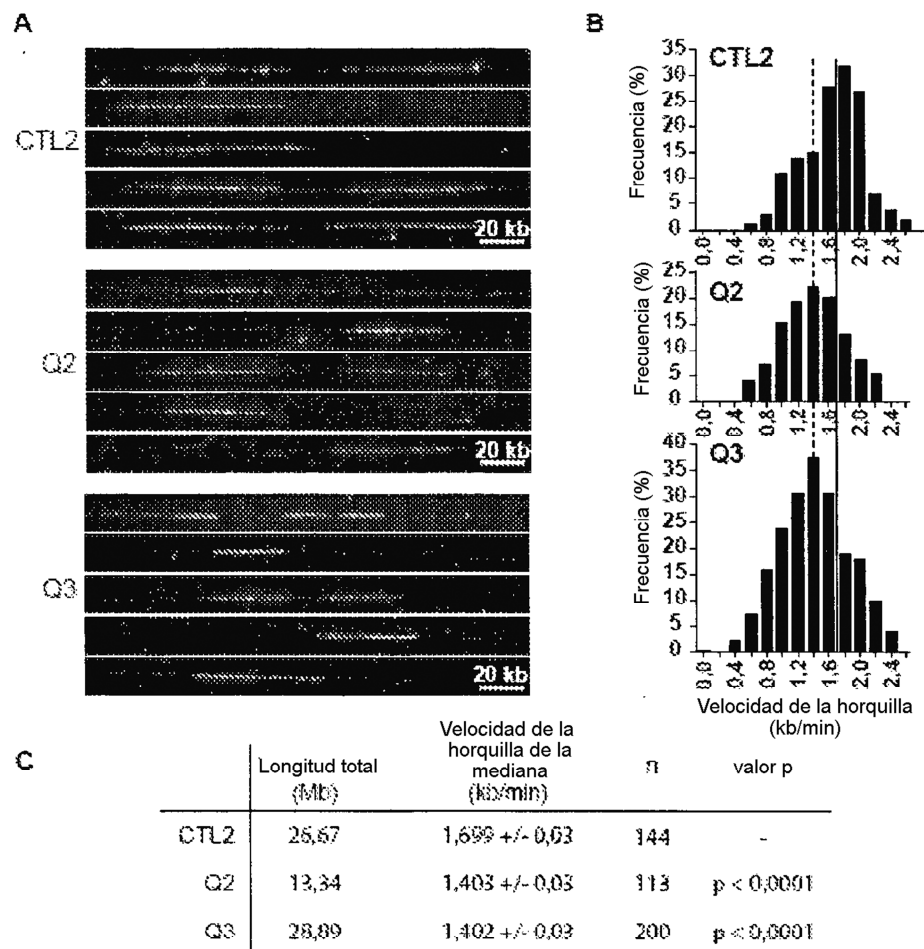


Figura 11

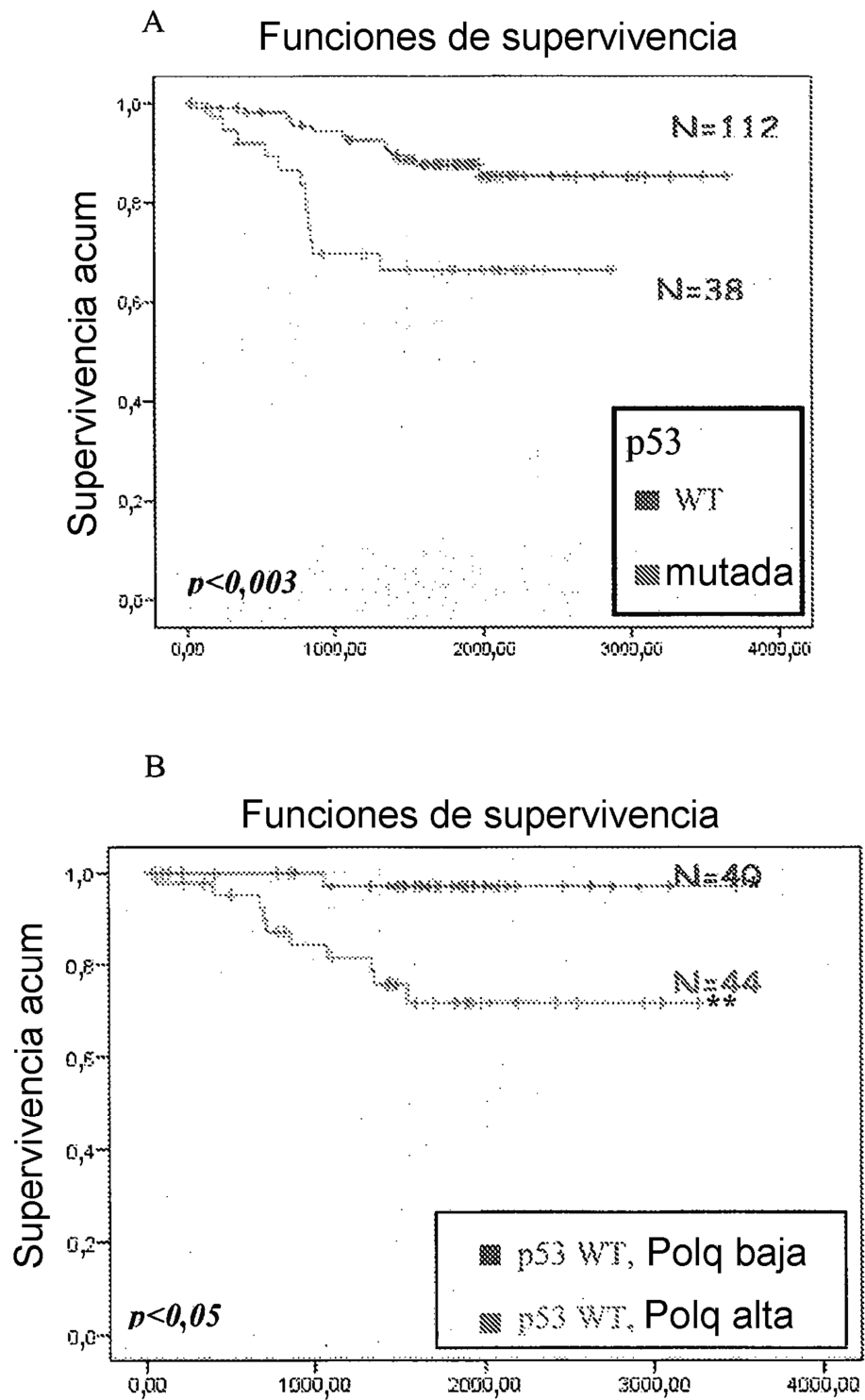


Figura 12

