



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA GLICOPROTEÍNA
ALPHA 1- ACIDA (AGP) Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN CÁNCER DE MAMA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

LILIANA GARCIA ORTIZ

TUTOR
DR. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO (INER)

COTUTORES
DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN (INCICH)
DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA (INCMNSZ)





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EVALUACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA GLICOPROTEÍNA
ALPHA 1- ACIDA (AGP) Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN CÁNCER DE MAMA.

Tutor Principal

Dr. Erasmo Martínez Cordero.

Jefe del Laboratorio de Autoinmunidad, INER.

Tesista

Dra. Liliana García Ortiz.

El presente trabajo se realizó en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER); en colaboración con el Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) con la ayuda de los doctores Mauricio Salcedo Vázquez, Sinué Barroso, Gelasio Zarco Espinoza y Mauricio Gómez del Toro y en el Laboratorio de Genética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana con la ayuda del Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz; bajo la dirección del Dr. Erasmo Martínez Cordero. Se otorgó una beca UNAM-CONACyT con número de registro 176757.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a la UNAM y al CONACyT por haberme permitido formar parte de ellos, apoyándome académica y financieramente y sin lo cual mi estancia en la ciudad de México no hubiera sido posible.

También quisiera agradecer a mi director de tesis, el Dr. Erasmo Martínez Cordero y a mis co-tutores el Dr. Gilberto Vargas Alarcón y el Dr. Julio Granados Arriola por su dirección durante estos años.

Al doctor Mauricio Salcedo Vázquez que sin su ayuda desinteresada, este trabajo no hubiera podido concluir su última etapa, así como también a sus compañeros del IMSS que me dieron consejos para la captación de muestras.

A las pacientes de cáncer de mama del IMSS y a los donantes de sangre del INER por aguantar un dolor más.

Durante mi estancia en el Laboratorio de Genética del IOFCV conocí como amigo (porque ya lo conocía como maestro) al Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz quien me enseñó algunos “tips” de la biología molecular, de esos que no vienen escritos en los instructivos, ¡Muchas gracias!.

Gracias a mis compañeros y amigos de los diferentes laboratorios, en especial a la QFB. Mariana Téllez Araiza y a Eduardo Flores Hernández que me animaban a seguir adelante pese a cualquier tropiezo y por apoyarme en momentos lejanos a mi familia.

Y por último pero no menos importante a mi familia, por la vida, por su amor, su ejemplo, su preocupación, su entrega, sus cuidados. Y por regalarme parte del tiempo familiar para terminar este proyecto. ¡Gracias los quiero mucho!

INDICE

	página
Resumen	X
Summary	XI
Introducción	
1. Glicoproteína alfa-1-ácida	1
1.1. Estructura del gen	1
1.2. Proteína AGP	2
1.3. Lipocalinas	3
1.4. Expresión y Regulación de AGP	6
1.5. Funciones	9
Cáncer de Mama	11
Justificación	15
Planteamiento del Problema	17
Hipótesis	17
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
Material y Métodos	19
1. Tipo de Investigación	19
2. Diseño del Estudio	19
3. Población	19
4. Tamaño de la Muestra	19
5. Selección de la Muestra	20
6. Criterios de Inclusión	20
7. Criterios de Exclusión	20
8. Criterios de Eliminación	21
9. Comité de Ética en Humanos	21
Metodología	
Extracción de DNA	21
Detección del polimorfismo Glu20Arg en el exón 1 del gen ORM1	22

	página
Secuenciación del exón 1	24
Detección del polimorfismo Val156Met en el exón 5 del gen ORM1	25
RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción)	26
Análisis estadístico	27
Resultados	28
Discusión	44
Conclusiones	52
Perspectivas	53
Anexos	54
Bibliografía	56
Artículo Original Publicado	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inmunoэлектроenfоque de la proteína AGP1.

Figura 2. Modelo estructural de AGP1.

Figura 3. Familia de Lipocalinas.

Figura 4. Representación esquemática de la estructura en barril de las lipocalinas.

Figura 5. Representación esquemática de la estructura lineal de las lipocalinas.

Figura 6. Elementos reguladores implicados en la expresión del gen AGP.

Figura 7. Mapa de restricción de la enzima NlaIII.

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Figura 9. Marcador de masa y electroforesis horizontal.

Figura 10. Electroferograma del polimorfismo A1721G (Gln20Arg) del exón 1 de
AGP1.

Figura 11. Gel de poliacrilamida al 12%.

Figura 12. Secuencia nucleotídica del exón 1 del gen ORM1.

INDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS.

- Tabla 1. Distribución genotípica del polimorfismo A → G del exón 1 del gen ORM1 en población sana y pacientes con cáncer de mama.
- Tabla 2. Distribución genotípica del polimorfismo G → A del exón 5 del gen ORM1 en población sana y pacientes con cáncer de mama.
- Tabla 3. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo A → G del exón 1 del gen ORM1.
- Tabla 4. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo G → A del exón 5 del gen ORM1.
- Tabla 5. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo G → A (Val156Met) del exón 5 del gen ORM1 de tres grupos mexicanos comparadas con otras poblaciones.
- Tabla 6. Características generales de los pacientes con cáncer de mama.
- Tabla 7. Edad de diagnóstico en pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo (polimorfismo A → G del exón 1).
- Tabla 8. Tiempo de evolución en años en pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo (polimorfismo A → G del exón 1).
- Tabla 9. Antecedentes personales no patológicos de las pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo.
- Tabla 10. Tiempo de evolución del CaMa y uso de anticonceptivos.
- Tabla 11. Análisis multivariado: Genotipo, tiempo de uso de anticonceptivos y tiempo de evolución de la enfermedad.
- Tabla 12. Antecedentes gineco-obstétricos de los pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo.
- Tabla 13. Localización del tumor en pacientes con cáncer de mama.
- Tabla 14. Tamaño general del tumor.
- Tabla 15. Pacientes con CaMa y metástasis.
- Tabla 16. Estadios del tumor en las pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo.

Gráfica 1. Distribución del polimorfismo A → G en sujetos sanos y pacientes con cáncer.

Gráfica 2. Distribución del polimorfismo G → A en sujetos sanos y pacientes con cáncer.

Gráfica 3. Tiempo de evolución del CaMa dividido por genotipo.

RESUMEN

La glicoproteína α -1 ácida (AGP) es una proteína de fase aguda sintetizada en el hígado y perteneciente a la familia de lipocalinas. Codificada por el gen ORM1 en el cual se han descrito varios polimorfismos, entre ellos un cambio de A/G (Gln20Arg) en el exón 1 que produce una proteína con características electroforéticas migratorias de rápida (FF) a lenta (SS) y el polimorfismo G/A (Val156Met) en el exón 5 que produce dos isoformas rápidas de la proteína: F1 y F2; este cambio es considerado como una mutación caucasoide debido a que la distribución del fenotipo está limitado a europeos. Recientemente se ha observado que AGP tiene un efecto inmunosupresor durante el desarrollo de estados patológicos como el cáncer; aunado a lo anterior se ha reportado que la variante SS del gen ORM1, parece ser más inmunosupresora que la variante FF, afectando el progreso y curso clínico de la enfermedad. Debido a lo anteriormente comentado, el objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos A/G del exón 1 (Gln20Arg) y G/A del exón 5 (Val156Met) del gen ORM1 y evaluar su asociación con cáncer de mama esporádico (CaMa) en pacientes mestizos mexicanos.

Se procesaron 101 muestras de pacientes mestizos mexicanos con CaMa y 101 muestras de mestizos mexicanos más 44 muestras de indígenas Teenek sanos. Se realizó extracción de DNA y análisis de los polimorfismos Gln20Arg y Val156Met mediante secuenciación y PCR-RFLP. Los resultados mostraron que la relación entre la frecuencia del alelo G del exón 1 y el CaMa no fue significativa. Sin embargo las pacientes heterocigotas (AG) tuvieron una mayor sobrevida en comparación con pacientes homocigotas AA ($p=0.04$), a pesar de que estas últimas presentaron un tumor de dimensiones pequeñas (2.57 cm) en comparación con los genotipos AG y GG (3.5 y 3.2 cm, respectivamente). En contraparte, el análisis del exón 5 mostró que el genotipo GA está presente solo en población sana y que la frecuencia del alelo G en CaMa y mestizos ($p=0.0007$ y $p=0.0003$, respectivamente) fue mayor en comparación con indígenas Teenek.

En conclusión, el alelo G del exón 1 (fenotipo S) *per se*, no es capaz de iniciar la transformación maligna del tejido mamario y el alelo G del exón 5, considerado hasta ahora como una mutación caucasoide, podría ser también común en amerindios, como lo demuestra el presente trabajo.

SUMMARY

α 1-Acid glycoprotein (AGP) is an acute-phase glycoprotein synthesized by the liver and belongs of the lipocalin family. This is encoded by then gene ORM1 in which several polymorphisms have seen described, including a change of A/G (Gln20Arg) in exon 1, producing a protein with migratory electrophoretic characteristics from fast (FF) to slow (SS) and G/A (Val156Met) polymorphism in exon 5 that produces two fast isoforms of the protein: F1 and F2; this change is regarded as a Caucasoid mutation because the phenotype distribution is limited to Europeans. Recently it was found that AGP has an immunosuppressive effect during the development of pathological conditions such as cancer; coupled with the above has been reported that the gene variant ORM1- SS seems to be more immunosuppressive than variant FF, affecting the progress and clinical course of disease.

Due to previously commented, the aim of this work was to establish the genotypic and allelic frequencies of A/G of exon 1 (Gln20Arg) and G/A of exon 5 (Val156Met) polymorphisms of ORM1 and evaluate its association with sporadic breast cancer (BrCa) in Mexican mestizo patients.

101 sporadic samples of BrCa patient's and 101 samples of Mexican mestizos over 44 samples of Teenek Amerindian, all of them healthy, were processed. We performed DNA extraction and analysis of Gln20Arg and Val156Met polymorphisms by sequencing and PCR-RFLP.

The results showed that relationship between G allele frequency of exon 1 and BrCa was not significant. However the heterozygote's patients (AG) had higher survival compared with AA homozygote patients ($p=0.04$); although women have a small tumor size (2,57 cm) compared with AG and GG genotypes (3,5 and 3,2 cm, respectively). In contrast, analysis of exon 5 showed that GA genotype was very frequent only in healthy people and allele G frequency in BrCa and Mexican mestizo ($p=0.0007$ and $p=0.0003$, respectively) was higher compared with Teenek Amerindian

In conclusion, G allele of exon 1 (phenotype S) *per se*, is not capable to initiate the malignant transformation of breast tissue and G allele, until now considered like a caucasoide mutation, could be also common in Amerindian, as demonstrated by this study.

INTRODUCCIÓN

1. Glicoproteína Alfa 1-Ácida.

1.1. Estructura del gen.

Los genes que codifican a la glicoproteína α 1-ácida (AGP) conocidos como ORM1 y ORM2 están localizados en el brazo largo del cromosoma 9 en la región 31 a 32 (9q31-32). El gen ORM1 tiene 4.6 Kb de extensión, contiene 6 exones y 5 intrones, mientras que el gen ORM2 se localiza a 3.3 Kb río abajo de ORM-1, mide 6.5 Kb y contiene el mismo número de exones e intrones que ORM1. Presentan una homología del 94% ya que solo difieren en 32 nucleótidos en su secuencia codificante, produciendo una discrepancia de 21 aminoácidos entre ellos; lo que hace pensar que son el resultado de una duplicación de un gen ancestral común. Sin embargo se ha observado que el locus ORM2 es monomórfico en comparación con ORM1 en el cual se han encontrado cerca de 30 variantes alélicas raras (NCBI, Azzimonti F., et al., 2003; Owczarek CM., et al., 2002; Nakamura H., et al., 2000. Yuasa I., et al., 1997; Bowman BH., et al., 1993; Dente L., et al., 1987).

Dos de estas variantes producen fenotipos electroforéticamente distintivos, ya que un cambio de adenina por guanina en el exón 1 provoca una sustitución glicina por arginina en la posición 20 (Gln20Arg) produciendo una proteína con características migratorias lentas (SS, slow) en comparación con la proteína silvestre, la cual tiene una migración rápida (FF, fast), como se muestra en la figura 1.

Por otra parte, el cambio de guanina por adenina en el exón 5, produce la sustitución de valina por metionina en la posición 156 de la proteína (Val156Met) produciendo dos isoformas FF: la F1 y F2 (Duché JC., et al., 1998; Saha N., et al., 1992; Yuasa I., et al., 1990). Por lo que se ha sugerido que el fenotipo F2 pudo haber evolucionado del fenotipo SS por dos eventos mutacionales: SS \rightarrow F1 \rightarrow F2. Este último es considerado producto de una mutación caucasoide debido a que la distribución del fenotipo F2 está limitado a europeos (Yuasa I., et al., 1997). Sin embargo otros estudios han mostrado que el fenotipo F2 también es frecuente

en el norte de África y el oeste de Asia. (Yuasa I., et al., 1997; Johnson A., et al., 1969).

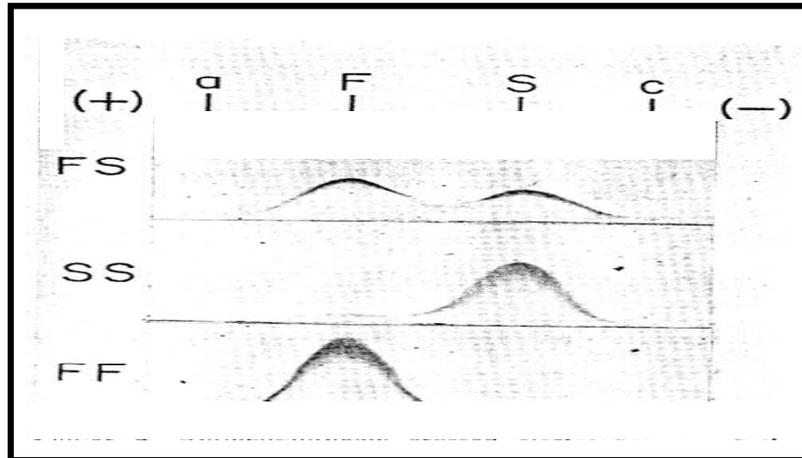


Figura 1. Inmunoelectroenfoque de la Proteína AGP1.
Johnson AM., et al. J Clin Invest 1969; 48:2293-2299.

1.2. Proteína AGP.

Las proteínas AGP1 y AGP2, también conocidas como orosomucoide 1 y 2 respectivamente, debido a sus propiedades físicas y químicas que fueron observadas hace ya varias décadas, descritas como un residuo rojizo-café que permanecía en solución después de que el suero de los pacientes era calentado (Chiu KM., et al., 1977). La concentración normal de AGP en plasma varía entre los rangos de 0.60 - 1.20 mg/mL (Nakano M., et al., 2004; Eap CB., et al., 1988). en una proporción molar de 3:1, AGP1:AGP2 (Fournier T., et al., 2000, Flower DR., et al., 1996, Dente L., et al., 1985).

La proteína AGP1 esta compuesta por 183 aminoácidos, dos puentes disulfuro y un alto contenido de carbohidratos, que corresponde al 45% del peso molecular total, distribuidos en 5 complejos en forma de enlaces N-glicosídicos, (figura 2) (Azzimonti F., et al., 2003; Kopecký V., et al., 2003; Dente L., et al., 1985). El peso molecular reportado para la AGP1 va del rango de 37 – 54 KD dependiendo de los métodos de determinación de la proteína, de los procedimientos de aislamiento,

de si AGP1 es nativa y de su origen: plasma, orina, membranas celulares aisladas de personas sanas o de pacientes (Theilgaard-Mönch K., et al., 2005; Chan J., et al., 1991; Van Dijk W., et al., 1991; Kremer JM., et al., 1988).

Por otro lado se ha observado que en la secuencia de aminoácidos de AGP, puede existir en varias posiciones el intercambio de un aminoácido, indicando un alto grado de heterogeneidad en la secuencia de la proteína, por lo que se ha postulado que existe un cierto grado de homología con las inmunoglobulinas debido a los mecanismos de diversidad que generan dichas estructuras (Zimmermann-Belsing T., et al., 2002; Van Dijk W., et al., 1998; Dente L., et al., 1985).

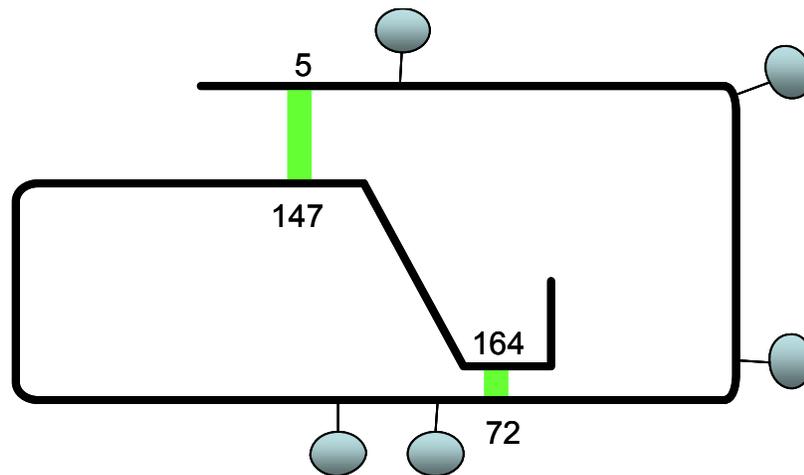


Figura 2. Modelo estructural de AGP1. Cadena polipeptídica de 183 aminoácidos, con 2 puentes disulfuro (en verde), uno entre el aminoácido 5 y 147 y otro entre el aminoácido 72 y 164. Las 5 cadenas de carbohidratos (círculos en azul) de tipo N están unidas a residuos de asparagina en la posición 15, 38, 54, 75 y 86. (Schmid K., et al. *Biochem* 1973; 12:2711-2724).

1.3. Lipocalinas

AGP pertenece a la familia de las lipocalinas, un gran grupo de proteínas pequeñas extracelulares, presentes en animales vertebrados e invertebrados, así como en plantas y bacterias, con propiedades de reconocimiento molecular: son capaces de unirse a pequeñas moléculas hidrofóbicas como el retinol, a

receptores específicos en superficies celulares y son capaces de formar complejos macromoleculares.

Protein	Subunit molecular mas	pI	No. of residues	Oligomeric State	Glycosylation	Number of disulphides	Abbreviation
KERNEL LIPOCALINS							
Retinol-binding protein	21.0	5.5	183	Monomer	-	3	RBP
Purpurin	20.0		175				PURP
Retinoic acid-binding protein	18.5	5.2	166	Monomer	-	1	RABP
α - _{2u} Globulin	18.7	5.7-6.7	162	Dimer	-	1	A2U
Major urinary protein	17.8	5.5-5.7	161	Dimer	-	1	MUP
Bilin-binding protein	19.6		173	Tetramer	-	2	BBP
α Crustacyanin	350.0	4.3-4.7	174/181	Octamer of heterodimers	-	2/2	
Pregnancy protein 14	56.0		162	Homodimer	+		PP14
β -Lactoglobulin	18.0	5.2	162	Dimer/monomer	-	2	Blg
α -1Microglobulin	31.0	4.3-4.8	188	Monomer + complexes	+	1	A1M
C8 γ	22.0		182	Part of complex	-	1	C8 γ
Apolipoprotein D	29.0-32.0	4.7-5.2	169	Dimer + complexes	+	2	ApoD
Lazarrillo	45.0		183	Monomer	+		LAZ
Prostaglandin D synthase	27.0	4.6	168	Monomer	+	1	PGDS
Quiescence-specific protein	21.0	6.3	158			1	QSP
Neutrophil lipocalin	25.0		179	Monomer/dimer+complexes			NGAL
Choroid plexus protein	20.0		183	Monomer	-		
OUTLIER LIPOCALINS							
Odorant-binding protein	37.0-40.0	4.7	159	Dimer		0	OBP
von Ebner's-gland protein	18.0	4.8-5.2	170	Dimer		1	VEGP
α -1-Acid glycoprotein	40.0	3.2	183	Monomer	+	2	AGP
Probasin	20.0	11.5	160				PBAS
Aphrodisin	17.0		151		+	2	

Figura 3. Familia de Lipocalinas.

Las lipocalinas también presentan una diversidad estructural y funcional inter e intraespecies; estas funciones incluyen el transporte de retinol, la coloración en insectos, el transporte de feromonas, la síntesis enzimática de prostaglandinas, y también participan en la regulación de la respuesta inmune y en la homeostasis.

Es por eso que a AGP también se le ha llamado inmunocalina (Kopecký V., et al., 2003; °Akerstrom B., et al., 2000; Flower DR., et al., 1996).

Las lipocalinas se dividen en 2 grupos según sus propiedades físicas y químicas: las lipocalinas “kernel” que contiene 3 regiones conservadas, el primer motivo es igual para todas las lipocalinas y puede ser utilizado como una marca. Y las lipocalinas “outlier” que solo contienen 2 motivos de estos 3 y son más diversas, a este grupo pertenece la AGP (Figura 3).

La estructura de las lipocalinas es altamente simétrica ya que están formadas por 9 hojas plegadas β antiparalelas y por puentes de hidrógeno que forman loops llamados L1 a L7 entre cada hoja plegada β , manteniéndolas unidas para formar un barril que funciona como un sitio de unión a ligando. El loop L1 también llamado loop omega sirve como tapa que cierra parcialmente el sitio de unión al ligando (Figura 4).

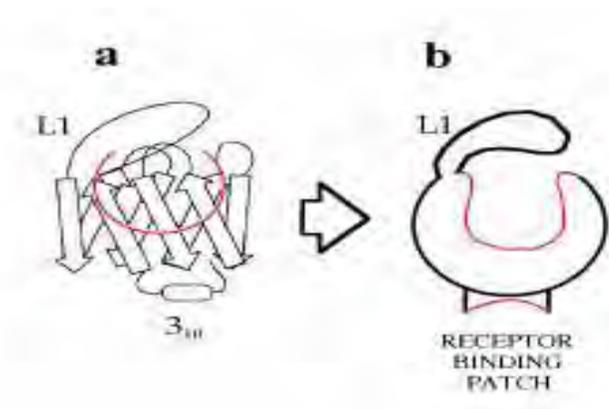


Figura 4. Representación esquemática de la estructura en barril de las lipocalinas. La localización del sitio de unión al ligando se muestra como un semicírculo rosa. Flower DR. Biochem J 1996; 318:1-14.

Los dos extremos del barril beta son topológicamente distintos; un extremo contiene 4 horquillas (L1, 3, 5 y 7) y el sitio abierto de la molécula, mientras que el otro extremo contiene 3 orquillas (L2, 4 y 6) y el sitio cerrado del barril. Todas

estas partes forman a su vez las regiones estructuralmente conservadas o SCR 1, 2 y 3 (Figura 5) (°Akerstrom B., et al., 2000; Flower DR., et al., 1996).

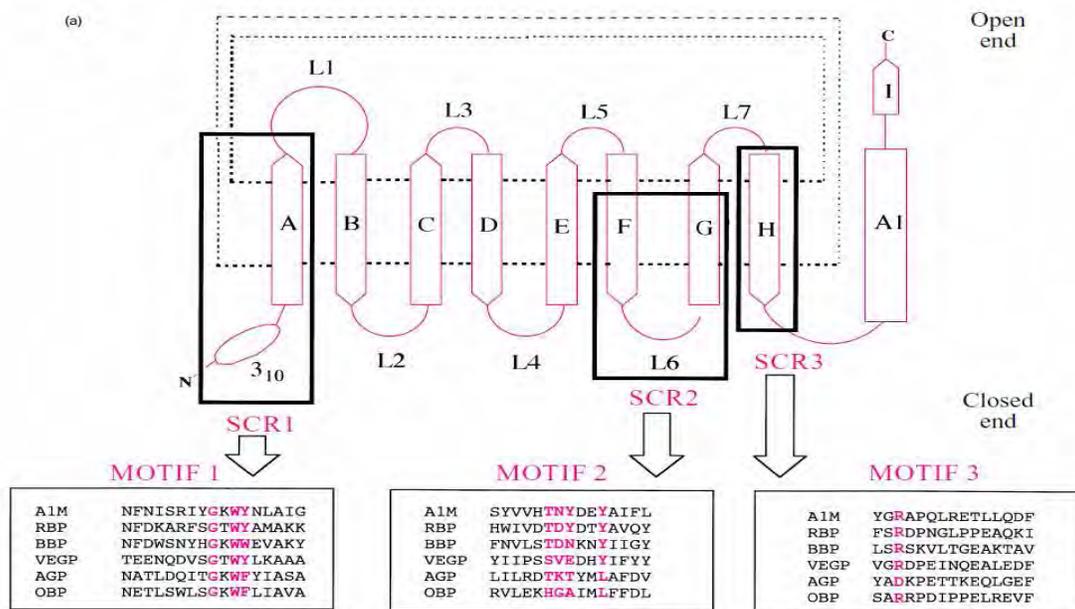


Figura 5. Representación esquemática de la estructura lineal de las lipocalinas. Se muestran las 9 hojas plegadas β con distribución antiparalela, así como las 3 regiones conservadas de la familia de las lipocalinas. Flower DR. Biochem J 1996; 318:1-14.

1.4. Expresión y regulación de AGP.

La AGP1 es sintetizada principalmente en el hígado y secretada por los hepatocitos aunque otros tejidos como el pulmón, colon e íleon, próstata, células epiteliales de tejido mamario así como células neoplásicas pueden expresarla al igual que ciertas estirpes celulares como los macrófagos, células endoteliales y granulocitos (Hochepped T., et al., 2003; Atemezem A., et al., 2001; Sörensson J., et al., 1999; Bowman BH., et al., 1993). La concentración plasmática basal de AGP es de 0.60-1.20 mg/ml y puede incrementar su valor hasta 10 veces ante estímulos infecciosos, inflamatorios, traumáticos y durante el desarrollo de neoplasias malignas, por lo que también es considerada una proteína de fase aguda positiva. (Mittermüller J., et al., 1992. Birch HE., et al., 1986; Dente L., et al., 1985). Este incremento es atribuido principalmente a cambios en la transcripción génica (Fournier T., et al., 2000; De Graaf TW., et al., 1993).

En varios organismos eucariotas incluyendo el humano, la expresión hepática del gen AGP esta modulada por dos citocinas (IL-1 e IL-6) y por glucocorticoides. Estas citocinas, glucocorticoides y el ácido retinoico (AR) juegan un papel importante en la producción de proteínas de fase aguda, ya que el AR aumenta la respuesta a IL-6, pero actúa como un regulador negativo de síntesis de RNAm de AGP inducida por glucocorticoides (Zimmermann-Belsing T., et al., 2002; Fournier T., et al., 2000; Pukhalsky AL., et al., 1998; Van Dijk., et al., 1998; Bowmann BH., et al., 1993).

En forma recíproca y gracias a modelos animales, se ha estudiado la regulación transcripcional de este gen. Interesantemente el estudio de las secuencias promotoras de AGP mediante técnicas de clonación, han permitido determinar las secuencias de DNA que actúan a nivel *cis*, así como las proteínas que actúan a nivel *trans*, involucradas en las respuestas de fase aguda. En la AGP de rata la actividad de IL-1 e IL-6 esta mediada por secuencias de DNA localizadas río arriba llamadas elementos reguladores distales (DRE), los cuales actúan de manera positiva. Los DRE de AGP incluyen sitios de unión para factores de transcripción de la familia C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein β). Se sabe que las citocinas estimulan fuertemente la expresión de C/EBP β en el hígado, por lo que esta isoforma es propuesta como un mediador indirecto de la señalización de citocinas del gen AGP (Fournier T., et al., 2000; Baumann H., et al., 1991; Klein ES., et al., 1987; Gene Card).

Los glucocorticoides actúan a través de elementos de respuesta a glucocorticoides que se encuentran proximales al sitio de inicio de la transcripción a -110 pb dentro de la también llamada "unidad de respuesta mínima a esteroides" (SRU) del promotor de AGP (-155 a -65). Tanto los SRU como los DRE contienen varios sitios de unión a factores de transcripción C/EBP β . Dos de estos sitios de unión se superponen con elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). Una fuerte cooperación positiva entre los receptores de glucocorticoides (GR) y C/EBP β fue reportada para la inducción hormonal del gen AGP (Figura 6). Recientemente se ha mostrado que una de las funciones de GR para activar la transcripción génica de AGP es reclutar C/EBP β y mantener su unión a sus secuencias de DNA blanco

(SRU). Chang y cols., identificaron un nuevo factor transcripcional intermediario (TIF1 β), el cual podría aumentar la transcripción del gen AGP por el GR y C/EBP β . La regulación del gen AGP en otras especies es más parecida a lo que sucede en la rata más que en el humano. (Theilgaard-Mönch K., et al., 2005; Fournier T., et al., 2000; Chang CHJ., et al., 1998). Aunque la regulación génica de AGP es similar entre especies, las secuencias “enhancer” o potenciadoras y su localización son bastante variables; por ejemplo la región promotora del gen AGP de ratón contiene una región llamada elemento de respuesta de fase aguda (APRE) que al parecer participa mediando la inducción de la expresión de AGP en respuesta a lipopolisacáridos.

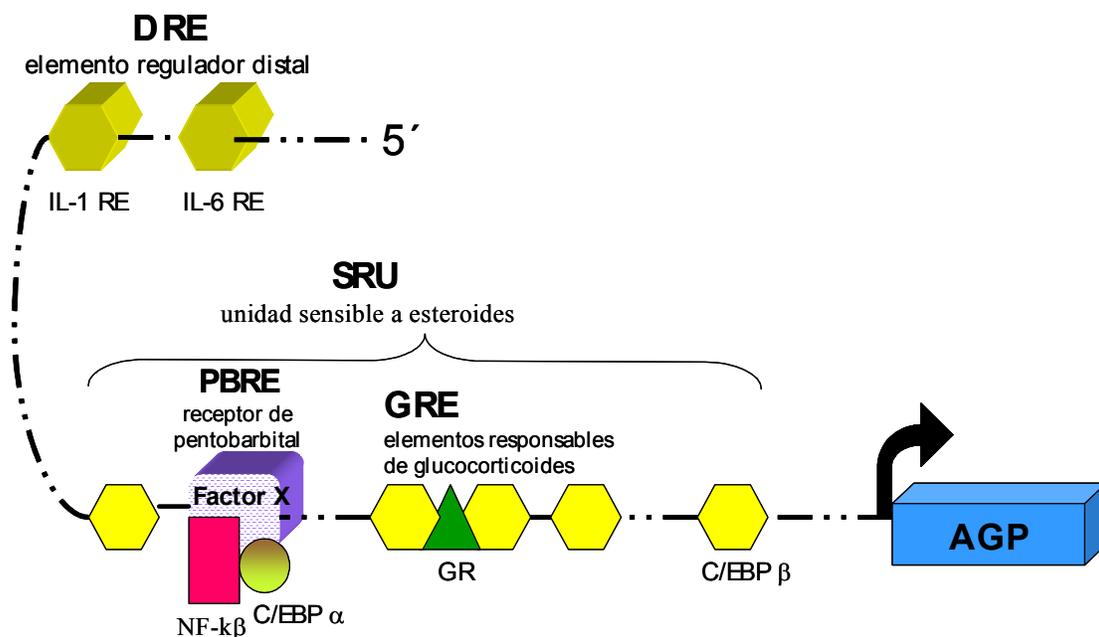


Figura 6. Elementos reguladores implicados en la expresión del gen AGP. El promotor del gen AGP contiene varias secuencias positivas que actúan a nivel cis dentro de los SRU que están involucrados es la regulación por glucocorticoides: los GRE que se unen al receptor de glucocorticoides interactúan con C/EBP β ; los elementos de respuesta río arriba (URE) y otras regiones que interactúan con C/EBP β . Todos estos elementos son esenciales para la inducción máxima del promotor de AGP por glucocorticoides. Los elementos de respuesta distal (DRE) implicados en la regulación de AGP por citocinas están localizados en la región enhancer e interactúan con C/EBP β . (Fournier T., et al. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498:157-171).

Aunque esta región mostró un alto grado de homología con los GRE proximales del gen de la rata este no funciona como un potenciador para glucocorticoides. De hecho la inducción del gen AGP de ratón es mas compleja e involucra tanto

factores de transcripción positivos como negativos. La región de 180pb del promotor contiene 4 motivos reconocidos por un factor de transcripción positivo (C/EBP β) y un elemento *cis* negativo reconocido por un factor negativo (factor B) identificado como nucleolina. Durante la respuesta de fase aguda, existe un incremento dramático en los niveles de C/EBP β , acompañado a un decremento en el factor B, resultando en la inducción de la transcripción del gen AGP. En suma, la transcripción del gen AGP, parece estar regulado por factores tanto endógenos como exógenos (Fournier T., et al., 2000, Van Dijk W., et al., 1998).

1.5. Funciones.

Las funciones biológicas de la AGP1 se han descrito en años recientes, se sabe que es una proteína reguladora de la respuesta inmune ya que modula algunas fases de la inmunidad natural. Entre estas funciones están la de suprimir la activación de neutrófilos y del complemento, al actuar de manera competitiva con receptores y moléculas específicas. Del mismo modo puede regular la función del macrófago e incrementar la secreción de inhibidores de IL-1 posiblemente produciendo antagonistas del receptor de IL-1, además puede modular la secreción de citocinas inducidas por lipopolisacáridos. La AGP también es capaz de inhibir la proliferación linfocitaria inducida por LPS al disminuir la síntesis de IL-2 provocando disminución de mitógenos celulares. De la misma manera inhibe la agregación plaquetaria, consecuentemente es capaz de prevenir la secreción de otros factores proinflamatorios. Por otra parte se ha sugerido, que AGP es necesaria para mantener la permeabilidad de la barrera capilar mediante el incremento selectivo de la carga negativa en el endotelial, por lo que se ha puntualizado que el aumento de la filtración vascular, por edema o proteinuria, podría ser consecuencia de la producción deficiente de orosomucoide y otras partes esenciales del glicocalix. (Hochepped T., et al., 2003; Azzimonti F., et al., 2003; Fournier T., et al., 2000; Sörensson J., et al., 1999; Muchitsch EM., et al., 1998; Flower DR., et al., 1996; Schmid K., et al., 1973).

In vivo, se demostró que el pre-tratamiento con AGP protege a los animales del choque letal inducido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Mestriner

FLAC., et al., 2007; Theilgaard-Mönch K., et al., 2005; Hochepped T., et al., 2003; Van Dijk W., et al., 1998; Muchitsch EM., et al., 1998; Umetsu K., et al., 1995).

In vitro, la glicoproteína fue capaz de unirse a receptores de las quimiocinas CCR5, ya que AGP provocó, en concentraciones fisiológicas, la inhibición de la infección por HIV-1-R5 en macrófagos derivados de monocitos humanos por una unión específica de AGP a los grupos glicanos de estos macrófagos (Hochepped T., et al., 2003; Atemezem A., et al., 2001).

Por ultimo, AGP es la segunda proteína mas abundante en el plasma (50-100 mg/mL) después de la albúmina, la cual funciona como el mayor transportador de medicamentos básicos y neutros; sin embargo estudios recientes mostraron una asociación constante de estos medicamentos a AGP, indicando que la glicoproteína podría contribuir significativamente con la unión plasmática total de los medicamentos, especialmente durante enfermedades en las cuales, la concentración de AGP incrementa o la de albúmina disminuye (Paterson SC., et al., 2003; Kremer JM., et al., 1988).

2. CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama (CaMa) se refiere a la formación de un tumor que se origina tanto en las estructuras ductales como glandulares del tejido mamario y que surge como resultado de una proliferación anormal de células que no responden adecuadamente a las señales que controlan su crecimiento y división, lo que provoca la extensión a diferentes tejidos a través del sistema circulatorio o linfático dando lugar a metástasis (Lester SC., 2009).

El CaMa varía ampliamente en frecuencia y esto depende del país o continente que se trate, por ejemplo en EU y Europa la frecuencia es más alta en comparación con Asia y África. Los países latinoamericanos en general, también tienen frecuencia baja con excepción de Argentina y Uruguay, los cuales tienen tasas semejantes a la de los países europeos, quizá por el origen mayoritariamente europeo de su población, a diferencia del resto de los países latinoamericanos, donde el mestizaje entre indígenas, europeos y negros es la característica predominante (Rodríguez Cuevas SA. y cols., 2006).

En años recientes se informó del incremento paulatino del CaMa en muchos países y México no fue la excepción, ya que estados del norte y centro del país donde el nivel socioeconómico y cultural de las mujeres es más elevado presentaron una mayor frecuencia de la enfermedad, mientras que en los estados donde predomina la población indígena y el nivel socioeconómico bajo, como Chiapas y Oaxaca, la frecuencia es mucho menor. Estas observaciones sugieren que los factores ambientales y el estilo de vida, tienen un papel importante en la evolución del cáncer de mama (Rodríguez Cuevas SA. y cols., 2006).

En el 2001 se informaron 102,657 casos de cáncer en el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, SSA; de los cuales 11,242 casos representaron al CaMa el cual afectó más frecuentemente a las mujeres (62.5% comparado con 37.5% en hombres), ocupando el segundo lugar de los cánceres en la mujer, con un 17% del total.

En México la tasa de mortalidad por cáncer de mama se elevó de 13.6 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años en 1990 a 14.58 por cada 100,000 en el

2001 (www.rhnm.mx, Hidalgo-Miranda A. y cols., 2008; Gómez Dantés H. y cols., 2009).

En el 5 a 10% de los casos de CaMa la predisposición hereditaria desempeña un papel relevante, debido principalmente a mutaciones en los genes BRCA-1 y BRCA-2 y a síndromes asociados a cáncer. También las lesiones benignas de la mama, aunque en menor grado, se consideran factores de riesgo (Lara Medina F. y cols., 2006; Martínez Tlahuel JL. y cols., 2007). Aunado a lo anterior, el 60% de los casos carece de algún factor de riesgo determinable, sin embargo, la menarca temprana con edad tardía de la primera gestación a término, los ciclos menstruales de duración corta, la ausencia de embarazos, los abortos, la falta de lactancia, la menopausia tardía, la dieta hipercalórica, el consumo abundante de grasas saturadas, la obesidad, la terapia de reemplazo hormonal, el uso de anticonceptivos orales y la exposición a radiaciones en tórax, se vincula con mayor probabilidad de adquirir mutaciones durante la proliferación celular.

Los cánceres de mama son neoplasias frecuentemente epiteliales, originadas en el sistema ductolobulillar terminal. El carcinoma ductal infiltrante representa 85% de las anomalías invasivas, seguido del carcinoma lobulillar infiltrante con 5 a 10% de los casos, mientras que los tipos histológicos menos frecuentes son el carcinoma micropapilar y el metaplásico que poseen un peor pronóstico (Lara Medina F. y cols., 2006; Lester SC., 2009; Harrison TR, 2009).

El carcinoma es más frecuente en la mama izquierda, en una proporción de 10:1. Los cánceres son bilaterales o secuenciales en la misma mama en el 4% de los casos.

De los carcinomas mamarios suficientemente pequeños para que pueda identificarse el área donde se han originado, alrededor del 50% lo hacen en el cuadrante superior externo, 10% en cada uno de los cuadrantes restantes y alrededor del 20% en la región central o subareolar (Lester SC., 2009).

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado a los tumores mamarios en:

CARCINOMA NO INVASIVO
Carcinoma ductal in situ
Carcinoma lobulillar *in situ*

CARCINOMA INVASIVO

Carcinoma ductal invasivo
Carcinoma lobulillar invasivo
Carcinoma mucinoso
Carcinoma medular
Carcinoma papilar
Carcinoma tubular
Carcinoma adenoideo quístico
Carcinoma secretor (juvenil)
Carcinoma apocrino
Carcinoma con metaplasia
Carcinoma inflamatorio
Otros
Enfermedad de Paget del pezón

Desde el punto de vista clínico, genético, bioquímico e inmunológico el CaMa es una enfermedad compleja y heterogénea. Se piensa que los tumores malignos son capaces de evadir los mecanismos de defensa del huésped debido a que las células tumorales tienen semejanza, en muchos aspectos, con las células del huésped (Couch FJ and Weber BL., 2002; Abbas AK., 2008).

Por otra parte el crecimiento y la diseminación rápida de los tumores pueden superar la capacidad del sistema inmunitario para erradicar las células tumorales, es así, que la vigilancia de estas neoplasias requiere que todas las células malignas sean eliminadas por los mecanismos efectores de la inmunidad celular; específicamente por linfocitos T, células NK y macrófagos que tienen la capacidad de liberar enzimas lisosómicas, hidrolíticas y proteolíticas, intermediarios reactivos del oxígeno y del óxido nítrico, producir citocinas como TNF, la cual es capaz de destruir tumores mediante efectos tóxicos directos mediados por la unión del TNF a su ligando presente en las células tumorales o activando vías de señalización que conducen a la apoptosis y de forma indirecta actuando sobre la vasculatura tumoral.

Por otra parte los mecanismos de la inmunidad humoral incluyen la activación de varias proteínas (entre las que se encuentra la AGP); activación de la respuesta inflamatoria y la expresión de moléculas de adhesión en el epitelio vascular y en la superficie celular de los leucocitos. Tras la expresión de estas moléculas durante

el proceso inflamatorio, prosigue de manera inmediata la activación de la respuesta de fase aguda, caracterizada por la síntesis hepática de proteínas, en respuesta al estímulo producido por citocinas proinflamatorias principalmente IL-1, IL-6 y TNF-alfa liberadas por los macrófagos en el foco inflamatorio (Abbas AK., 2008; Gabay C., et al., 1999).

Lo anteriormente citado ha impulsado la creación de modelos para el estudio de las bases moleculares de esta neoplasia y la caracterización de numerosos genes que están somáticamente alterados en CaMa esporádico (Couch FJ., et al., 2002).

JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha observado que la proteína de fase aguda AGP1 tiene un efecto inmunosupresor durante el desarrollo de estados patológicos como lo es el cáncer; aunado a lo anterior se ha reportado que la variante SS del gen ORM1, que codifica a esta proteína, parece ser más inmunosupresora que la variante FF lo cual podría afectar el progreso y curso clínico de la enfermedad (Fan C., et al., 1995 b).

En relación con lo anteriormente citado, Mittermüller J. publicó la relación que existía entre el producto del gen ORM-1 y el desarrollo de varios subtipos de carcinoma entre los que se encontraban el de estómago, colon y mama; halló que el fenotipo SS fue significativamente más frecuente en pacientes con carcinoma en comparación con individuos sanos de la misma área geográfica (18.4% vs 12.9%, respectivamente) (Mittermüller J., et al., 1992).

Otro estudio similar realizado por Fan C., coincidió con los resultados obtenidos por Mittermüller ya que los pacientes con cáncer de mama con fenotipo SS presentan un riesgo relativo de 1.56 (IC del 95% = 1.16-2.09, $p=0.0029$) en comparación con el grupo control. Además éstos exhiben un efecto inmunosupresor en el suero, al no permitir que se lleve a cabo el ataque inmunológico en contra de las células tumorales, contribuyendo así al “escape inmunológico del tumor”, lo cual correlaciona con la progresión de la enfermedad y con los niveles séricos elevados de AGP1 (Fan C., et al., 1995 a y b).

En otro momento Jean-Claude Duché observó que la concentración plasmática de la proteína AGP en pacientes con cáncer de mama (CM), cáncer de ovario (CO) y cáncer pulmonar (CP) tuvo un incremento significativo ($p < 0.0001$, 1.12 ± 0.5 g/L) en comparación con la del grupo control (0.50 ± 0.14 g/L) y en 5 pacientes con CM hubo un incremento de la variante lenta (SS) de AGP-1; lo anterior mostró que la inducción del alelo “G” podría depender del estado patológico (Duché JC., et al., 2000).

Actualmente la mayoría de los proyectos que se han realizado con AGP1 se basan en la determinación bioquímica y la concentración plasmática de esta proteína, utilizan métodos como el inmunoelectroenfoque e inmunobloting y los relacionan

con padecimientos crónico-infecciosos, sin embargo, existen relativamente pocos estudios de asociación entre las variantes polimórficas de ORM1 y enfermedad. Aunado a lo anterior, en México no existen estudios que evalúen la frecuencia genotípica o alélica de los polimorfismos del gen ORM1 y mucho menos existen estudios de asociación con enfermedad.

Por lo que el interés en este proyecto está encaminado a evaluar, en un grupo de individuos con cáncer, la distribución de los polimorfismos del gen ORM-1 y comparar si esta distribución difiere de la población sana y de otras poblaciones reportadas. Debido a que en México existe un alto grado de mestizaje decidimos incluir a un grupo de indígenas denominados Teenek cuyo significado es “los que viven en el campo, con su idioma, sangre y comparten la misma idea”. La mayoría de ellos habitan en la Huasteca Potosina, al oriente del estado, localizado dentro de la cuenca del río Pánuco. Once municipios concentran al 90% de los Teenek, de los cuales sobresalen Aquismón, Tanlajás, Ciudad Valles, Huehuetlán, Tancanhuitz, San Antonio, Tampamolón y San Vicente Tancuayalab (www.cdi.gob.mx/ini/). Nos interesa estudiar esta comunidad debido a que históricamente se les considera un grupo racialmente puro debido a que cuando llegaron los españoles al continente en 1519, conquistaron las tierras huastecas, pero las 2 sociedades subsistieron una al lado de la otra, con sus leyes y sus formas de vida y sin mezclarse (www.cdi.gob.mx/ini/). Actualmente este grupo indígena puro no ha sido clasificado, hablando lingüísticamente. Por lo que esta información se aprovechará para determinar si los alelos predominantes del gen ORM1 en mestizos son a favor del componente indígena o europeo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que el fenotipo SS de la proteína AGP se ha relacionado con un mayor riesgo para cáncer. ¿Es el homocigoto GG del polimorfismo A → G (Gln20Arg) del gen ORM-1, un factor de riesgo para cáncer de mama en comparación con el homocigoto silvestre (AA) y el heterocigoto (AG)?

Si la transición G → A del exón 5 del gen ORM-1 es considerada una mutación caucasoide ¿Existen diferencias en la frecuencia genotípica y alélica de las variantes del gen ORM1 de mestizos e indígenas mexicanos? y ¿Existen diferencias en la distribución de los polimorfismos del gen ORM-1 entre mexicanos y otras poblaciones del Mundo?

HIPÓTESIS

El alelo G del polimorfismo Gln20Arg del gen ORM-1 se presenta con mayor frecuencia en pacientes con cáncer de mama en comparación con individuos sanos.

La distribución de los alelos A/G del polimorfismo Gln20Arg y los alelos G/A del polimorfismo Val156Met del gen ORM-1 en nuestra población difiere de las reportadas para otras poblaciones.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos A/G del exón 1 (Gln20Arg) y G/A del exón 5 (Val156Met) del gen ORM1 y evaluar su utilidad como marcador pronóstico en cáncer de mama esporádico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos A/G del exón 1 (Gln20Arg) y G/A del exón 5 (Val156Met) del gen ORM-1 en mestizos mexicanos e indígenas Teenek sanos.
- Analizar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen ORM-1 entre mestizos mexicanos e indígenas Teenek.
- Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen ORM-1 de mestizos mexicanos con otras poblaciones del mundo.
- Estudiar la relación de los factores epidemiológicos del CaMa con los diferentes genotipos del gen ORM-1.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tipo de Investigación: Observacional, transversal, prospectiva, comparativa, abierta.

2. Diseño del Estudio
De casos y controles.

3. Población

- Un grupo de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama esporádico.
- Un grupo de individuos mestizos mexicanos no relacionados, sanos.
- Un grupo de indígenas Teenek de la Huasteca Potosina, sanos.

4. Tamaño de la Muestra

Universo: Pacientes con diagnóstico de cáncer de mama esporádico que acudieron a Oncología (Clínica de mama) del Centro Médico Nacional Siglo XXI entre febrero del 2006 a febrero 2007. La totalidad del universo fue de 480 pacientes.

Muestra: Se estableció el tamaño de muestra aceptando un error del 5% (0.05) y un nivel de confianza del 95%. La frecuencia alélica de los polimorfismos a estudiar en esta enfermedad, es aún desconocido para la población mexicana, por lo que se consideró que la frecuencia de los polimorfismos era de $p = 0.6$, además se admitió que las personas susceptibles son aquellas homocigotos mutantes para el alelo de riesgo. Para la obtención de la muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \times p \times q \times N}{e^2 \times (N-1) + Z^2 \times p \times q}$$

Donde: n = tamaño de la muestra, $p = 0.6$ (proporción supuesta en la población), $q = (1 - p) = 0.5$, $N = 480$ (población o universo), $Z = 1.96$ (intervalo de confianza), $e = 0,05$ (máximo error tolerable). También se consideró 20% de pérdidas, por lo que el grupo de estudio estaría conformado por 208 pacientes.

5. Selección de la muestra

El grupo de pacientes con cáncer de mama se concertó de la Consulta de Oncología y Clínica de Mama del CMN Siglo XXI a cargo del Dr. Sinué Barroso.

La muestra de mestizos mexicanos sanos, no relacionados, fue obtenida del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (donador).

Del grupo de indígenas Teenek, recibimos el material genético de la biblioteca de DNA's del Dr. Gilberto Vargas Alarcón del INCICH.

6. Criterios de Inclusión

- *Para pacientes con cáncer de mama esporádico:*

Todas aquellas pacientes que acudieron a la Clínica de mama con diagnóstico de adenocarcinoma esporádico de glándula mamaria.

- *Para mestizos mexicanos sanos no relacionados:*

Personas donadoras de sangre y que por historia clínica, biometría hemática y química sanguínea se les clasificó como apto para donar.

- *Para indígenas Teenek:*

Todos los DNA's que contaban con adecuada concentración de material genético.

7. Criterios de Exclusión

- *Para pacientes con cáncer de mama:*

Se excluyeron los casos de cáncer de mama familiar.

Se excluyeron los casos de cáncer de mama que sean BRCA positivos.

Que no aceptara firmar la hoja de consentimiento informado.

- *Para mestizos mexicanos sanos, no relacionados:*

Se excluyeron aquellos individuos de la población general que al momento de la toma de muestra:

Presentara algún cuadro infeccioso o inflamatorio.

Que tuvieran algún grado de parentesco con otro donador.

Que no fueran mestizos mexicanos (Nosotros definimos al mestizo mexicano como aquel individuo cuyas 3 generaciones, incluyendo la suya, hubieran nacido en México).

Que no aceptara firmar la hoja de consentimiento informado.

- *Para indígenas Teenek:*

Se excluyeron DNA's que no tuvieran la concentración mínima de 5 ug/ul.

8. Criterios de Eliminación para todos los casos:

Que una vez seleccionados y por cualquier motivo no puedan participar en la toma de muestra de sangre.

Que las condiciones de la muestra sanguínea o los rótulos de los tubos no sean las adecuadas.

Que la cantidad de DNA obtenido sea insuficiente

Que la concentración del DNA sea inadecuada.

9. Comité de ética en humanos

El presente estudio se evaluó por el Comité de Ciencia y Bioética del INER.

A todos los participantes se les solicitó la firma del consentimiento informado. (Anexo 1 y 2).

Extracción de DNA.

A cada uno de los participantes seleccionados se les tomó una muestra de sangre venosa en tubos Vacutainer® Brand de 5 mL conteniendo EDTA. Posteriormente cada muestra fue rotulada en forma alfa-numérica y se llevó al Laboratorio de Autoinmunidad donde fue centrifugada a 1935 g (4,000rpm) por 5 minutos en una centrífuga Beckman modelo TJ-6R, para realizar la separación celular.

El suero fue congelado a menos 70°C en microtubos de 1.5 mL; y los leucocitos fueron utilizados para la extracción del DNA, la cual se realizó por el método de expulsión salina, que consistió en 3 lavados con TTS compuesto por Tris 10mM a pH 7.4, Tritón X 100 al 1% y Sacarosa 300mM. Cada lavado fue centrifugado a 20,800g por 2 min, en la base del microtubo encontramos el botón celular y la fase

acuosa se desechó por decantación. Al botón celular se le adicionó cloruro de sodio 5.0 mM y SDS al 10%, que se utiliza como detergente iónico, posteriormente se homogenizó por 5 min, y se adicionaron 200 uL de cloruro de sodio saturado, la mezcla fue centrifugada a 20,800g por 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un microtubo nuevo, al cual se le adicionaron 600 uL de SEVAG (Cloroformo-Alcohol Isoamílico) a una concentración de 49:1 y se homogenizó, posteriormente se centrifugó a 20,800g durante 6 min. La fase líquida fue transferida a un frasco de vidrio de 5 mL estéril conteniendo 2 mL de etanol absoluto, se almacenó toda la noche a -20°C, para lograr la precipitación del DNA.

Al día siguiente el DNA fue transferido a un microtubo nuevo y estéril de 0.5 mL conteniendo 400 uL de etanol al 70%, se centrifugó a 20,800g durante 10 min, se decantó el etanol y el DNA se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 100 uL de agua inyectable estéril.

Una vez obtenido, el DNA se cuantificó en un espectrofotómetro Pharmacia Biotech. La pureza del DNA fue cuantificada dividiendo la absorbencia de 260nm entre la absorbencia de 280nm; valores superiores a 1.2 fueron considerados como DNA puros. Posteriormente la absorbencia de 260nm fue multiplicada por el factor 50 para obtener la concentración del DNA en ug/mL.

Detección del polimorfismo Glu20Arg en el exón 1 del gen ORM-1.

Para la amplificación del exón 1 se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada), de la siguiente manera: se tomó una alícuota de DNA a una concentración mínima de 5 µg/ µL se mezcló con la reacción de PCR la cual estuvo integrada por 4 umol del primer sentido (5'ACGTGCCTCCTGGTCTCA3') y antisentido (3'CACGTCAAAAGCAAGCATGT 5'), 200 µM de dNTP's, 2 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) y 1 U de Taq polimeras (Invitrogen®) para un volumen total de 50µL. El programa de PCR fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, continuando con 1 min a 94°C, 1 min a 56°C (alineamiento), 2 min a 72°C (extensión) por 30 ciclos y una extensión final de 10 min a 72°C., con lo que se obtuvo un producto de amplificado de ≈1785 pb que contiene a los exones 1, 2 y 3.

Para la amplificación específica del exón 1, se utilizaron 5 μ L del primer amplicón obtenido por PCR, el cual se mezcló con una segunda reacción de PCR de la siguiente manera: se colocaron 4 μ mol del primer sentido (5'ACGTGCCTCCTGGTCTCA3') y antisentido (3'CAGAGAAGGGAGGCAGCT5'), 200 μ M de dNTP's, 2 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen®) en un volumen total de 25 μ L. El programa de PCR fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, continuando con 25 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C (alineamiento) por 1 min, 72°C (extensión) por 1 min y una extensión final de 5 min a 72°C. para obtener un producto de amplificado de 190 pb.

Los primers fueron diseñados por Yuasa I. y cols., (Yuasa I., et al., 1997). Y realizamos un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comprobar que éstos no presentaran homología con otras secuencias nucleotídicas humanas.

A continuación los 25 μ L del producto de amplificado de 190 pb fueron sometidos a electroforesis, en geles de agarosa ultra pura (Invitrogen®) al 1.5%, para verificar su presencia; con un tiempo de corrida de 1 hora a 100 volts, en cámaras horizontales de la marca BioRad®. Posteriormente los geles fueron teñidos con 2 μ L de bromuro de etidio (BE) 10 mg/mL, para 50 mL de agarosa y se revelaron en un transiluminador UV. En seguida, la banda de 190 pb fue recortada del gel de agarosa para purificarla en columnas microcentradoras de la marca QIAGEN (No. cat. 28706), que filtran en membranas de sílica el DNA de la siguiente manera, el segmento de agarosa que contiene el amplificado se colocó en un microtubo de 1.5 mL junto con 3 volúmenes del amortiguador QG (Tiocianato de Guanidina), se incubó a 50°C por 10 minutos o hasta que el gel se disolviera; posteriormente se agregó un volumen de isopropanol, se insertó la columna microcentradora en un tubo colector y todo el contenido del microtubo fue vertido en esta columna, se centrifugó a 20,800g por un min en una microcentrífuga refrigerada Eppendorf®, modelo 5417R. El producto de PCR queda incorporado a la columna y los desechos permanecen en el tubo colector. Se le agregó nuevamente amortiguador QG (500 μ L) a la columna, se centrifugó por 1 min y se tiró el sobrante, a continuación se le agregaron 750 μ L de amortiguador PE a la columna, se

centrifugó por 1 min a 20,800g, el sobrante se desechó y la columna se eluyó con 50 μ L de H₂O desionizada estéril.

Una vez obtenido el producto de purificado, 4 μ L fueron sometidos a electroforesis horizontal, en geles de agarosa al 1.5%, junto con un marcador de masa Invitrogen® (No. Cat. 10068-013) para verificar su peso y presencia; el resto del material se almacenó a 5°C hasta su uso posterior.

Secuenciación del exón 1.

El producto de purificado se secuenció, la PCR de secuenciación se preparó de la siguiente manera: en un microtubo de 200 μ L se colocaron 2 μ L de amortiguador, 4 μ L de Big Dye, Applied Biosystems (que contiene los terminadores dideoxidonucleótidos y los dNTP's fluorescentes), 1 μ L [20 μ M] de primer sentido del exón 1, 4 μ L del purificado y 9 μ L de agua desionizada para una reacción total de 20 μ L. El programa de PCR consistió de 25 ciclos a 96°C (desnaturalización) por 30 segundos, 50°C (alineamiento) por 15 segundos y una extensión de 4 min a 60°C. La terminación de dichos fragmentos fue de manera aleatoria, debido a que en el extremo 3' se encuentra un didesoxinucleótido. Lo anterior tuvo como objetivo crear "n" número de copias del segmento de interés y que contiene el cambio de G \rightarrow A.

Consecutivamente el producto de secuenciación fue liofilizado en columnas Applied-Biosystems® (no. cat. 401762) que contienen cefarosa las cuales tuvieron que ser previamente hidratada con 800 μ L de agua desionizada.

Posteriormente la columna fue centrifugada a 960g por 3 min con el fin de remover la mayor cantidad de agua. La columna fue colocada en un tubo colector de 1.5 mL, se vertieron los 20 μ L del producto de PCR de secuenciación, se centrifugó por 3 min a 960g y el producto recuperado, se colocó en la bomba se vació por un tiempo aproximado de 30 min. Entonces se agregaron 25 μ L de TSR (Template Supresión Reagent) el cual permite mantener el producto de PCR estable para que sea analizado por el secuenciador. El último paso consistió en leer el electroferograma de cada uno de los casos por medio de un software (o

herramienta de análisis) que se encuentra instalado en el secuenciador automático de un solo capilar Applied-Biosystems.

Detección del polimorfismo Val156Met en el exón 5 del gen ORM-1.

Para la amplificación del exón 5 también se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada), de la siguiente manera: en un tubo de 200 μL se colocó el DNA a una concentración mínima de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ mas la mezcla de PCR la cual consistió de 4 μmol del primer sentido (5'AGTGCATCTATAACACCACC3') y antisentido (3'GGTTTCACAGGGACTTCTC5'), 200 μM de dNTP's, 2 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl_2) y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen®) para un volumen total de 50 μL .

El programa de PCR fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, continuando con 1 min a 94°C, 1 min a 54°C (alineamiento), 2 min a 72°C (extensión) por 30 ciclos, una extensión final de 10 min a 72°C para obtener un producto de amplificado de $\cong 1370$ pb., que contiene los exónes 4 y 5.

Para la amplificación específica del exón 5, se utilizaron 5 μL del 1er amplificado de PCR el cual se mezcló con una segunda reacción de PCR la cual estuvo integrada por 4 μmol del primer sentido (5'CACCATGTCCCCAGTCAGTC3') y antisentido (3'TTTCCTGCTCTGGGCCTCTG5'), 200 μM de dNTP's, 2 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl_2) y 1 U de Taq polimeras (Invitrogen®) para un volumen total de 25 μL . El programa de PCR fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, continuando con 1 min a 94°C, 1 min a 66°C (alineamiento), 1 min a 72°C (extensión) por 25 ciclos; una extensión final de 5 min a 72°C obteniendo un producto de amplificado de 219 pb. A continuación, 4 μL de este producto fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa ultra pura (Invitrogen®) al 1.5% por 1 hora a 100 volts, en cámaras horizontales de la marca BioRad®, los geles fueron teñidos con 2 μL (10 mg/mL) de BE. Posteriormente los geles fueron colocado en un transiluminador de luz UV y fotografiados.

RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción).

Del producto de amplificado de 219 pb obtenido en el paso anterior, se ocuparon 10 μ L y fueron mezclados con una reacción de digestión para la enzima NlaIII (Neisseria lactámica) que reconoce la secuencia CATG ∇ (Figura 7), la cual contenía 2 μ L [10X] de amortiguador, 0.2 μ L [10 μ g/ μ L] de BSA acetilado (albúmina de suero bovino) y 0.5 μ L de enzima para un volumen total de 12.7 μ L. El microtubo con la mezcla se colocó en una placa de calentamiento Bio-Dynamics por 4 horas a 37°C.

Posteriormente el corte enzimático fue examinado por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 a una concentración de 12%, con un tiempo de corrimiento de 2 horas a 100 volts. Los geles fueron teñidos con un Kit de tinción con plata Bio-Rad (no. cat. 1610444).

La mutación G \rightarrow A crea un nuevo sitio de restricción que es reconocido por la enzima NlaIII (Figura 7).

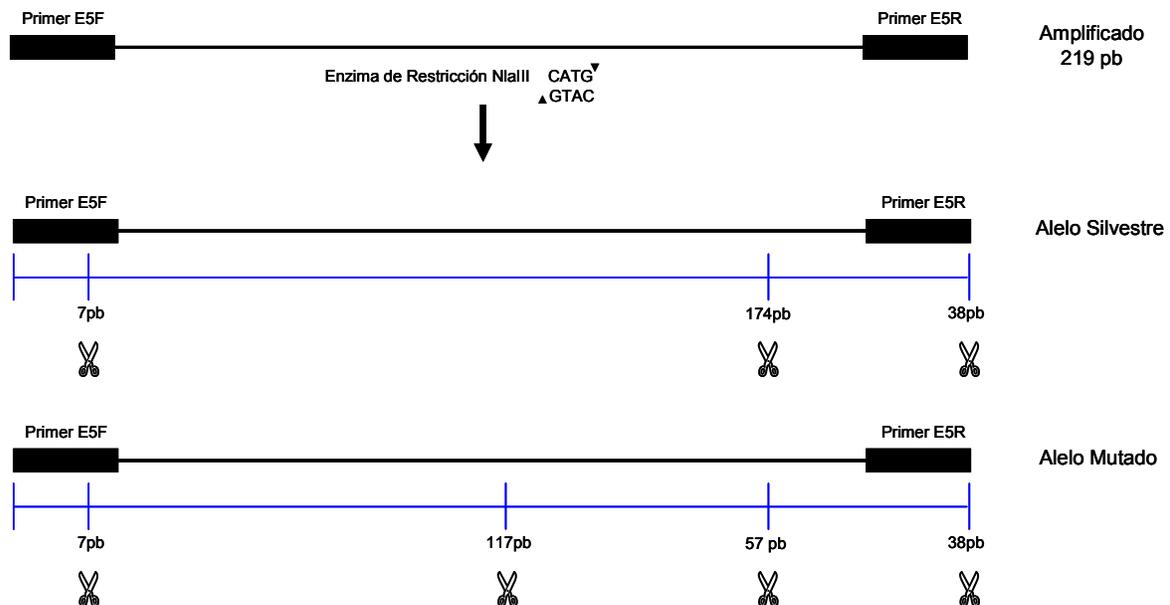


Figura 7. Mapa de restricción de la enzima NlaIII. La sustitución de G \rightarrow A en el exón 5 de AGP-1 de la forma mutante crea un nuevo sitio de restricción para la enzima NlaIII, por lo que el producto de 219 pb se divide en fragmentos de 7, 38, 57 y 117pb.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism versión 4. Los resultados cualitativos se expresaron como porcentajes o números absolutos y se ilustraron por medio de tablas o graficas. Fueron analizados usando tablas de contingencia con pruebas de Yates, Fisher o χ^2 , según corresponda al tipo de variable y al total de resultados obtenidos para cada situación.

Los datos cuantitativos se presentaron como promedios + D.E. ó E.E., según corresponda y se ilustraron por medio de gráficas de barras y/o lineales. Se analizaron usando la prueba "t" de student, no pareada para poblaciones dispersas y con distribución normal, utilizando U de Mann-Withney o rangos de Wilcoxon, según corresponda. La asociación entre variables se evaluó por medio del coeficiente de Spearman.

Los resultados fueron agrupados de acuerdo con la situación clínica así como por medio del resultado de análisis genotípico por lo que se usó un análisis multivariado ajustado para datos cuantitativos o cualitativos según fue descrito anteriormente. Los pacientes a los que les faltaba algún dato fueron excluidos del análisis multivariado.

Para el análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas, se utilizó cuando correspondió, el Equilibrio de Hardy-Weinberg. Para todos los casos, se tomó en cuenta una $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

De todas las sangres colectadas se lograron extraer entre 200 a 350mg de DNA/mL de sangre, procesando de 2 hasta 4 mL por paciente. En todos los casos el DNA fue de calidad suficiente para obtener los productos de PCR (Figura 8).

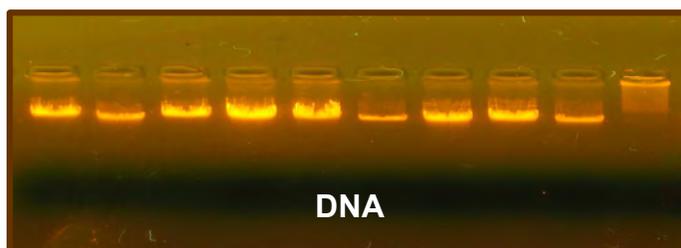


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.
DNA genómico de varios participantes.

Para la genotipificación del polimorfismo Glu20Arg del exón 1 del gen ORM1 se realizó la PCR anidada, el producto de 190 pb., se purificó del gel de agarosa y nuevamente fue sometido a electroforesis junto con un marcador de masa Invitrogen® (No. Cat. 10068-013) para calcular la concentración a la que se encuentra el producto de purificado (Figura 9).

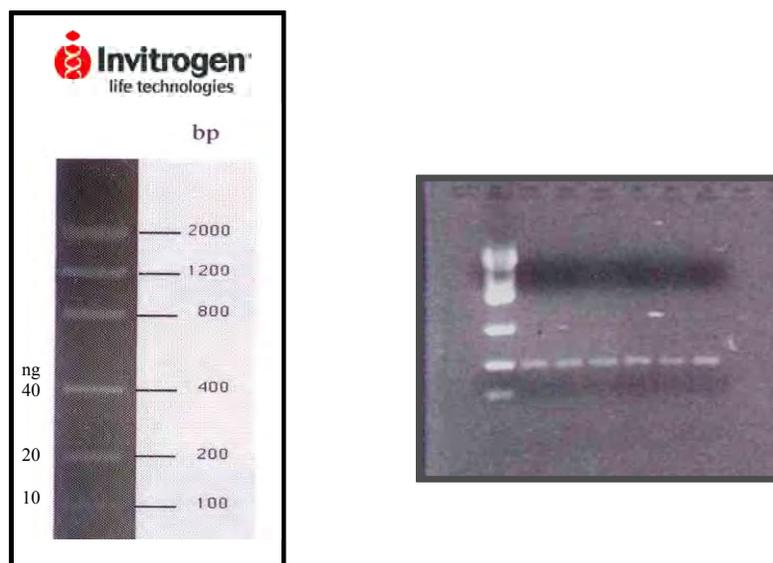


Figura 9. Marcador de masa y electroforesis horizontal. A la izquierda se muestra El marcador de masa que sirve como referencia para calcular la cantidad de DNA en nanogramos, (10, 20,40, 80 ng, etc.). A la derecha se muestra un gel de agarosa al 2% conteniendo el producto de 190 pb del exón 1 de AGP1 de varios participantes.

Posteriormente el producto de purificado de 190 pb del polimorfismo Gln20Arg fue secuenciado y se obtuvieron 3 patrones de gráficas en el electroferograma: la del homocigoto silvestre, la del heterocigoto y la del homocigoto mutante (Figura 10).

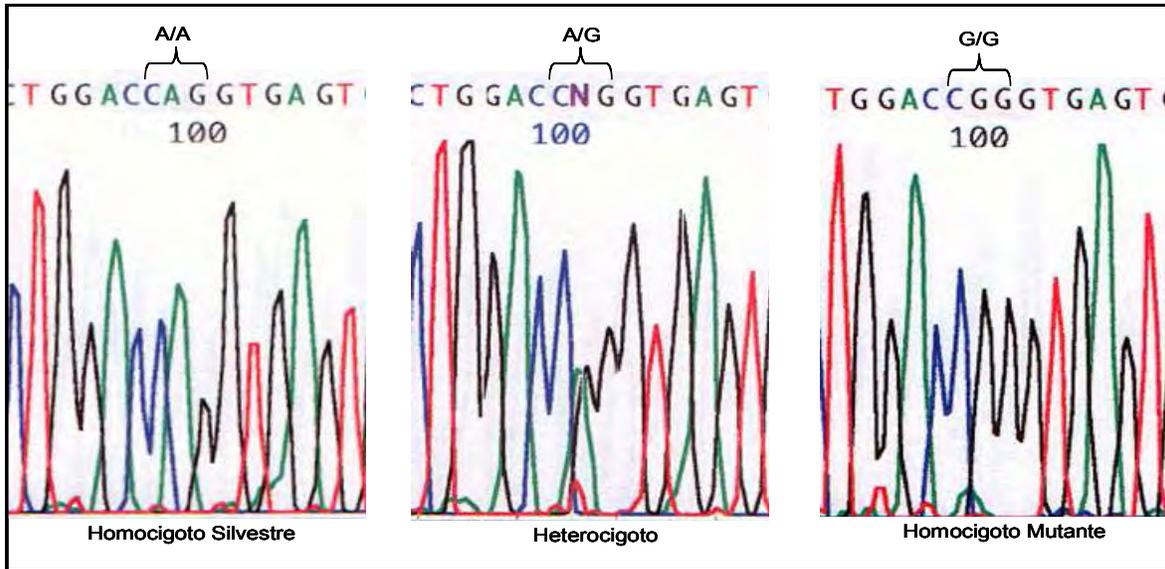


Figura 10. Electroferogramas del polimorfismo A1721G (Gln20Arg) del exón1 de AGP1. Se muestra al Homocigoto Silvestre (AA), Heterocigoto (AG) y Homocigoto Mutante (GG). Secuencia normal NCBI: TGGACC[A/G]Ggtg.

Para la genotipificación del polimorfismo Val156Met del exón 5 se llevó a cabo la técnica de PCR-RFLP con la enzima NlaIII, los productos de corte fueron analizados en una electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, teñidos con plata (Figura 11).

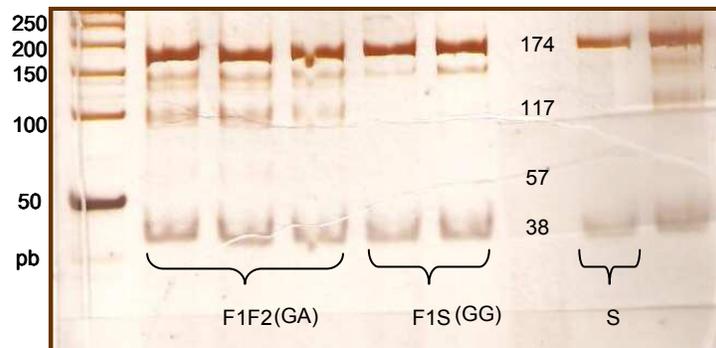


Figura 11. Gel de poliacrilamida al 12%. Muestra el polimorfismo del exón 5 de AGP-1 (G → A, Val156Met) que distingue el fenotipo F1 del F2.

Los resultados muestran que si el genotipo es homocigoto silvestre “GG” se observan 3 bandas (174, 38 y 7pb) si el genotipo es homocigoto mutante “AA” se observan 4 bandas (117, 57, 38 y 7pb) y si el genotipo es heterocigoto “GA” se observaron 5 bandas (174,117, 57, 38 y 7pb).

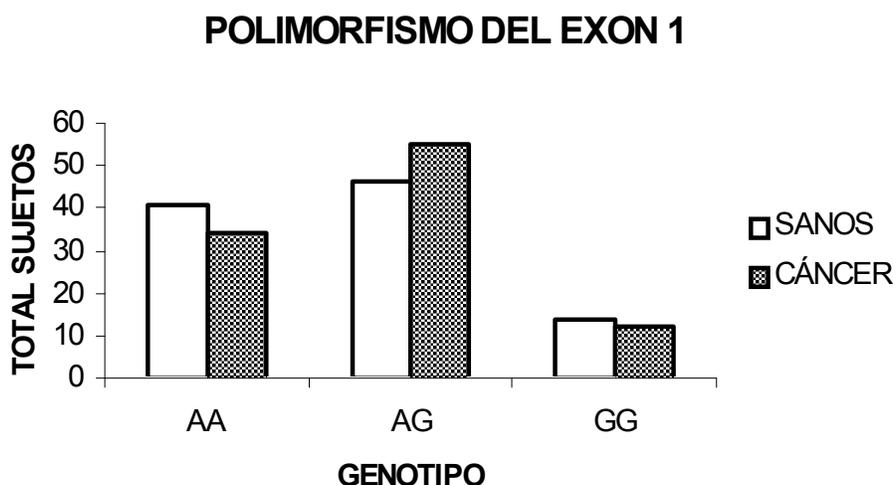
Consecutivamente nos dimos a la tarea de evaluar si la presencia del genotipo GG, es frecuente en los pacientes con CaMa en comparación con los sujetos sanos (que en este caso fueron los mestizos mexicanos).

Como se muestra en la tabla 1 y gráfica 1, la distribución de los genotipos para el exón 1 fue prácticamente similar entre los sujetos sanos y pacientes con CaMa, predominando en ambos grupos el genotipo AG, seguido por AA y GG.

Tabla 1. Distribución genotípica del polimorfismo A → G del exón 1 del gen ORM1 en población sana y pacientes con cáncer de mama.

POLIMORFISMO EXÓN 1	SANOS (n)	CÁNCER (n)
AA	41	34
AG	46	55
GG	14	12

Al realizar el análisis de χ^2 para tendencias no se observaron diferencias significativas ($X^2= 0.28$, $p= 0.59$).

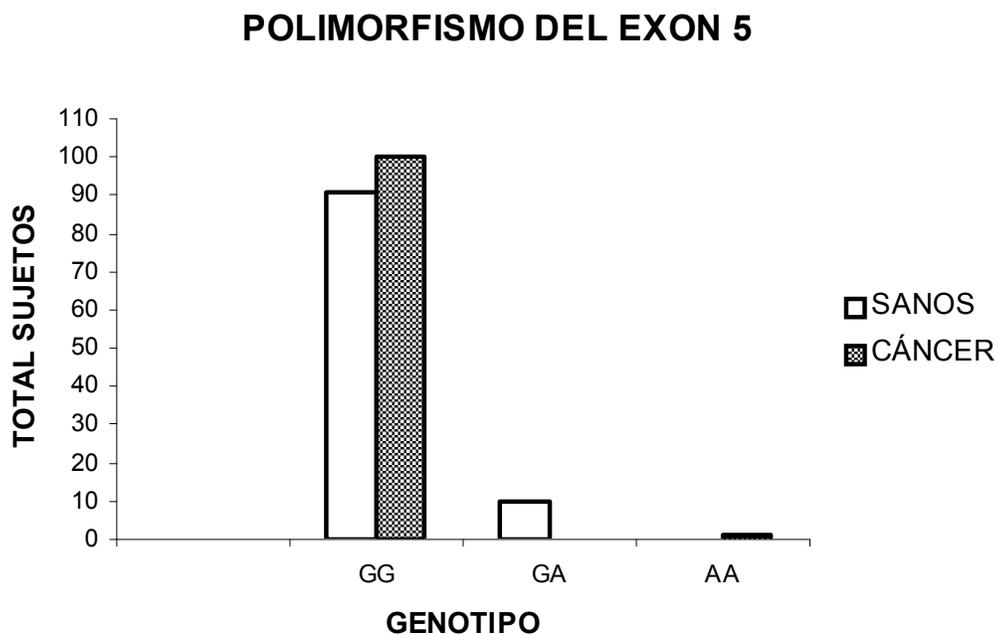


Gráfica 1. Distribución del polimorfismo A → G en sujetos sanos y pacientes con cáncer.

Por otra parte, la distribución del genotipo GG y AA del polimorfismo Val156Met del exón 5, fue prácticamente similar entre sujetos sanos y pacientes con CaMa, mientras que el genotipo GA solo se observó en sujetos sanos (Tabla 2 y gráfica 2). Al comparar el genotipo GG vs GA de pacientes con CaMa y sujetos sanos observamos que si existen diferencias significativas entre ellos ($p=0.001$, $X^2=10.42$, $RR= 1.11$, $IC\ del\ 95\%=1.040 - 1.184$).

Tabla 2. Distribución genotípica del polimorfismo G → A del exón 5 del gen ORM1 en población sana y pacientes con cáncer de mama.

POLIMORFISMO EXÓN 5	SANOS (n)	CÁNCER (n)
GG	91	100
GA	10	0
AA	0	1



Gráfica 2. Distribución del polimorfismo G → A en sujetos sanos y pacientes con cáncer.

Para continuar, realizamos el análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas del exón 1 A → G (Gln20Arg) y del exón 5 G → A (Val156Met) en mestizos mexicanos e indígenas Teenek, también se colocó al grupo de pacientes con CaMa como referencia (Tabla 3). Las frecuencias observadas y esperadas para el polimorfismo del exón 1 estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A → G del exón 1 del gen ORM1.

GRUPOS	n	GENOTIPO			FRECUENCIA ALÉLICA
		AA	AG	GG	
CÁNCER DE MAMA	101	34 (33.7%)	55 (54.4%)	12 (11.9%)	A 0.609 G 0.391
MESTIZOS MEXICANOS	101	41 (40.6%)	46 (45.5%)	14 (13.9%)	A 0.634 G 0.366
INDÍGENAS	44	9 (20.5%)	25 (56.8%)	10 (22.7%)	A 0.489 G 0.511

*Todos los grupos analizados estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los mestizos mexicanos tuvieron una alta frecuencia del genotipo AA ($p = 0.018$) y del alelo A en el exón 1 ($p = 0.020$) y una baja frecuencia del alelo G ($p = 0.020$) en comparación con los indígenas Teenek. Aunque el grupo con cáncer de mama presentó una frecuencia genotípica y alélica similar al de los mestizos mexicanos, cuando se compararon con indígenas Teenek, no mostraron diferencias significativas ($p = 0.076$).

Interesantemente durante el análisis del polimorfismo A → G del exón 1 del gen ORM1 el cual se llevo a cabo por PCR anidada y secuenciación, pudimos observar un caso, en el grupo de los mestizos, que presentó además del polimorfismo en estudio, un cambio de A → T en el nucleótido 1711 (Figura 12), originando la sustitución de treonina por serina en el aminoácido 17 (T17S); un cambio hasta ahora no descrito en otras poblaciones, lo que confirma que el gen

ORM1 es polimórfico y será de interés para nuestra población, estudiar este caso en un contexto familiar.

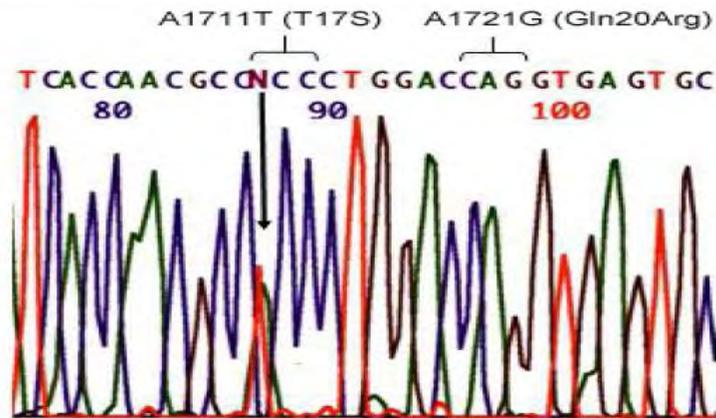


Figura 12. Secuencia nucleotídica del exón 1 del gen ORM1. Se muestra el cambio de A → T (flecha) en el nucleótido 1711 caracterizado por la presencia de adenina (pico verde) y timina (pico rojo). El polimorfismo A/G en el nucleótido 1721 también se muestra para su comparación.

El análisis del polimorfismo del exón 5 reveló una frecuencia significativamente mayor del genotipo GG ($p=0.0003$) y del alelo G ($p=0.0007$) en los mestizos en comparación con indígenas Teenek (Tabla 4), mientras que el genotipo GA y el alelo A fueron significativamente menos frecuentes en mestizos cuando se compararon con indígenas Teenek ($p=0.0007$ y $p=0.0003$, respectivamente).

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo G → A del exón 5 del gen ORM1.

GRUPOS	n	GENOTIPO			FRECUENCIA ALÉLICA
		GG	GA	AA	
CÁNCER DE MAMA	101	100 (99.0%)	0 (0.0%)	1 (1.0%)	G 0.990 A 0.010
MESTIZOS MEXICANOS	101	91 (90.1%)	10 (9.9%)	0 (0.0%)	G 0.951 A 0.049
INDÍGENAS	44	29 (57.8%)	15 (42.2%)	0 (0.0%)	G 0.830 A 0.170

Por otro lado, las frecuencias alélicas del exón 5 en los 3 grupos estudiados, fueron comparadas con los datos reportados para otras poblaciones (Tabla 5). Los pacientes con CaMa y los mestizos mostraron similares frecuencias genotípicas y alélicas a las reportadas para chinos, africanos y europeos (GeneID:5004/rs2636890). En contraste, los indígenas Teenek tuvieron una frecuencia mayor del alelo A cuando se compararon con los Chinos y Africanos ($p < 0.05$) así como una frecuencia mayor del genotipo G/A en comparación con los Chinos, Africanos y Europeos ($p < 0.05$). Mientras que la frecuencia del genotipo GG fue menor en los indígenas Teenek en comparación con estas 3 poblaciones ($p < 0.05$).

Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo G → A (Val156Met) del exón 5 del gen ORM1 de tres grupos mexicanos comparadas con otras poblaciones (NCBI).

	Cáncer de Mama (N= 101)	Mestizos Mexicanos (N= 101)	Indígenas Teenek (N= 44)	Chinos (N= 23)	Africanos (N= 23)	Europeos (N= 24)
Alelo						
G (Val)	0.990	0.951	0.830	1.000	0.957	0.938
A (Met)	0.010	0.049	0.170 ^a	0.000	0.043	0.062
Genotipo						
GG (Val/Val)	0.990	0.901	0.660 ^c	1.000	0.913	0.917
GA (Val/Met)	0.000	0.099	0.340 ^b	0.000	0.087	0.042
AA (Met/Met)	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042

^a Aumento de la frecuencia cuando se compara con poblaciones Chinas y Africanas ($p < 0.05$).

^b Aumento de la frecuencia cuando se compara con poblaciones Chinas, Africanas y Europeas ($p < 0.05$).

^c Disminución de la frecuencia cuando se compara con poblaciones Chinas, Africanas y Europeas ($p < 0.05$).

Debido a que el polimorfismo G → A del exón 5 no fue informativo debido a que la mayoría de los casos y controles presentaron el genotipo homocigoto GG, proseguimos analizando los factores epidemiológicos de las pacientes con CaMa tomando en cuenta únicamente el polimorfismo A → G del exón 1 (genotipo GG/

fenotipo SS), considerada por otros autores como una variante inmunosupresora en relación al fenotipo FF.

En la tabla 6 se muestran datos epidemiológicos de las pacientes con CaMa. Para cada variable se observa el total de sujetos (N), el promedio, la desviación estándar (DE), el error estándar (E:E), así como los límites (mínimo, máximo y mediana). En resumen, la edad promedio de las pacientes al momento de la entrevista fue de 53 años, sin embargo el diagnóstico de CaMa se les realizó 3 años antes; lo cual se ajusta con las características epidemiológicas y la distribución por edades de las mujeres en México, publicadas por otros autores (Mainero Rathelous FE., et al., 2008). En los antecedentes gineco-obstétricos pudimos observar que en promedio estas pacientes tuvieron su primer hijo a los 23 años, con un promedio de 4 gestas (3 por parto normal). La menopausia se presentó a un promedio de edad de 45 años.

Tabla 6. Características generales de las pacientes con cáncer de mama.

Variable	N	Promedio	D.E.	E.E.	Mínimo	Máximo	Mediana
Edad actual (años)	101	52.83	8.963	0.8919	28	80	53
Menarca (edad)	101	12.81	1.339	0.1333	10	16	13
FUM	83	45.86	5.215	0.5724	33	59	46
Edad 1ra. gesta	88	22.78	4.995	0.5325	15	37	22
Gestas	101	3.733	2.457	0.2445	0	15	3
Paras	101	2.594	2.417	0.2405	0	12	2
Abortos	101	0.4851	0.8557	0.08515	0	3	0
Menopausia (edad)	89	44.48	11.54	1.223	0	65	46
Edad de la paciente al realizar el diagnóstico (años).	101	49.5	8.78	0.87	26	78	49
Tiempo de evolución de la enfermedad (años).	101	3.34	3.49	0.348	0	26	2

Para conocer si el promedio de edad de presentación del CaMa esta relacionado con este polimorfismo realizamos una comparación por genotipo; sin embargo el

análisis estadístico no mostró diferencias entre ninguno de los grupos, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Edad de diagnóstico en pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo (polimorfismo A → G del exón 1).

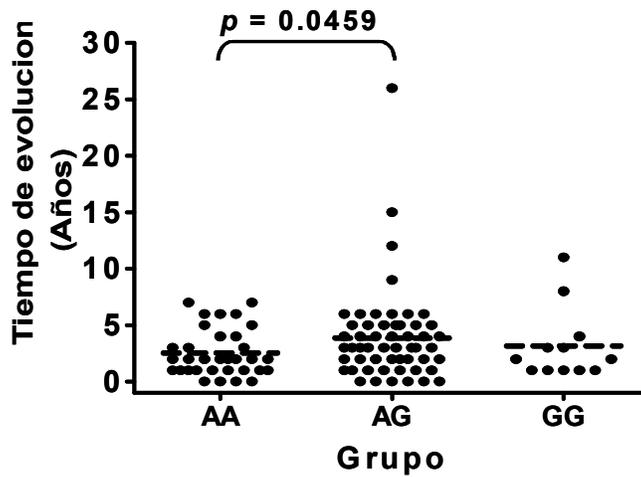
Genotipo	N	Edad de diagnóstico en años (promedio)	D.E.	Rango	Mediana
AA	34	49.47	10.06	30 a 78	48
AG	55	49.62	8.379	26 a 67	50
GG	12	49	7.261	40 a 66	48

La tabla 8 y grafica 3 muestran el análisis estadístico realizado con la prueba de “t” de student no pareada con corrección de Welch para los promedios del tiempo de evolución en años de la enfermedad para cada grupo de pacientes de acuerdo con su genotipo (el tiempo de evolución lo definimos como el tiempo que transcurrió desde el diagnóstico de la enfermedad hasta el momento que la paciente fue ingresada al protocolo). Observando que las pacientes con genotipo heterocigoto muestran una mayor sobrevida en comparación con las que portan el genotipo AA, ya que las primeras al parecer continúan con el tratamiento, con las consultas y el seguimiento y las segundas no lo hacen o se mueren antes.

Tabla 8. Tiempo de evolución en años en pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo (polimorfismo A → G del exón 1).

Genotipos	N	Tiempo evolución en años (promedio)	D.E.	Rango	Mediana
AA	34	2.529 ^a	2.078	0 a 7	2
AG	55	3.873	4.146	0 a 26	3
GG	12	3.167	3.186	1 a 11	2

^a Genotipo AA vs Genotipo AG, $p= 0.0459$



Gráfica 3. Tiempo de evolución del CaMa dividido por genotipo.

Al estudiar los antecedentes personales no patológicos (Tabla 9) encontramos que la mayoría de las pacientes con CaMa y genotipo AA no fuma ni hace ejercicio pero si consume alcohol. En el caso de las pacientes con genotipo GA la mayoría tienen un consumo negativo de tabaco, alcohol y no realiza actividad física. Por último, la mayoría de las pacientes con CaMa y genotipo GG, no fuman y no hace ejercicio, pero si consume alcohol; sin embargo ninguna correlación fue estadísticamente significativa.

La tabla 10 muestra el promedio del tiempo de evolución de CaMa en las pacientes que usaron y no usaron anticonceptivos, este análisis se llevó a cabo con la finalidad de observar si el uso de anticonceptivos por las pacientes tiene influencia en el tiempo de evolución de la enfermedad. El análisis estadístico mediante t de student pareado simple y t de student no pareado con prueba de Mann-Whitney no mostraron diferencias significativas.

Tabla 9. Antecedentes personales no patológicos de las pacientes con cáncer de mama divididas por genotipo.

Variable	Genotipo	Negativo	Positivo
		No. (%)	No. (%)
Tabaquismo	AA	23 (22.8)	11 (10.9)
	AG	34 (33.7)	21 (20.8)
	GG	8 (7.9)	4 (3.9)
	Total	65 (64.4)	36 (35.6)
Alcoholismo	AA	16 (15.8)	18 (17.8)
	AG	28 (27.7)	27 (26.7)
	GG	4 (4.0)	8 (8.0)
	Total	48 (47.5)	53 (52.5)
Ejercicio	AA	20 (19.8)	14 (13.9)
	AG	36 (35.6)	19 (18.8)
	GG	3 (3.0)	9 (8.9)
	Total	59 (58.4)	42 (41.6)

Tabla 10. Tiempo de evolución del CaMa y uso de anticonceptivos.

Parámetro	Anticonceptivos	
	Con uso	Sin uso
N	50	51
Tiempo evolución cáncer (promedio en años)	3.36	3.314
D.E.	2.686	4.164
E.E.	0.3799	0.5831
Mínimo (años)	0	0
Máximo (años)	12	26
Mediana (años)	3	2

Sin embargo al realizar una prueba t de student no pareado con corrección de Welch y prueba F para comparar varianzas, mostró que si existe una variación significativa entre el uso y no uso de anticonceptivos con el tiempo de evolución de la enfermedad (valor F: 2.403; DF_n= 50; Df_d= 49, valor p= 0.0013).

Para seguir con el examen de los resultados, realizamos un análisis multivariado (Tabla 11) tomando en cuenta el polimorfismo, el tiempo de uso de anticonceptivos y el tiempo de evolución de la enfermedad, con la finalidad de conocer si la evolución de la enfermedad esta relacionada al uso de anticonceptivos. A pesar de que las pacientes con genotipo GG presentaron un promedio de uso de anticonceptivos de 6 años, la evolución de la enfermedad (3.75 años) no fue estadísticamente diferente del resto de los tiempos de evolución que presentan los demás genotipos. El análisis estadístico mostró que los genotipos AA y AG tienen un promedio menor en el tiempo de uso de anticonceptivos (t de student con corrección de Welch) en comparación con el genotipo GG; lo cual resultó estadísticamente significativo.

Tabla 11. Análisis multivariado: Genotipo, tiempo de uso de anticonceptivos y tiempo de evolución de la enfermedad dividido por genotipo.

Genotipo	Variable	Promedio (años)	D.E.	E.E.	Mínimo (años)	Máximo (años)	Mediana (años)
AA (n= 17)	Tiempo uso de anticonceptivos	4.656*	3.935	0.9543	0.33	12	5
	Evolución	3.059	2.277	0.5522	0	7	2
AG (n= 25)	Tiempo uso de anticonceptivos	5.44*	5.496	1.099	0.08	16	3
	Evolución	3.44	2.631	0.5262	0	12	3
GG (n= 8)	Tiempo uso de anticonceptivos	6	6.302	2.228	1	15	2.5
	Evolución	3.75	3.808	1.346	1	11	2

*p < 0.05 comparado con el grupo GG

La tabla 12 muestra los antecedentes ginecoobstétricos de todas las pacientes, señalando la edad de aparición de la menarca, la edad de la primera gesta, promedio de gestas, paras y abortos, la edad promedio de último parto (FUP) y de la última menstruación (FUM) y menopausia.

Tabla 12. Antecedentes gineco-obstétricos de las pacientes con cáncer de mama divididos por genotipo.

Genotipo	Parámetro	Menarca (edad)	Edad 1ª gesta	Gestas	Paras	Abortos	FUP (edad)	FUM (edad)	Menopausia (edad)
AA	N	34	32	34	34	34	30	30	30
	Promedio	12.82	18.97	4.18	2.97	0.50	23.17	42.47	43.10
	D.E.	1.42	9.24	2.52	2.63	0.86	14.56	12.67	12.84
	E.E.	0.24	1.63	0.43	0.45	0.15	2.66	2.31	2.34
	Mínimo	10	0	1	0	0	0	0	0
	Máximo	16	35	13	12	3	37	55	58
	Mediana	13	21	4	3	0	30.50	46.50	46.50
AG	N	55	55	55	55	55	48	47	48
	Promedio	12.82	20.73	3.35	2.15	0.51	23.96	43.26	45.04
	D.E.	1.32	8.78	2.34	2.07	0.90	13.89	12.57	11.89
	E.E.	0.19	1.19	0.32	0.28	0.12	2	1.83	1.72
	Mínimo	10	0	0	0	0	0	0	0
	Máximo	16	37	15	11	3	37	59	65
	Mediana	13	22	3	2	0	30	46	46
GG	N	12	12	12	12	12	21	11	11
	Promedio	12.75	21.50	4.25	3.58	0.33	32.19	45.36	45.82
	D.E.	1.28	5.60	2.70	2.93	0.65	12.35	3.91	4.44
	E.E.	0.37	1.62	0.78	0.85	0.19	2.69	1.18	1.34
	Mínimo	11	15	2	0	0	0	40	39
	Máximo	16	36	11	11	2	48	52	54
	Mediana	12.50	20.50	3.50	2.50	0	36	45	45

Cada variable ginecológica de las pacientes fue agrupada de acuerdo al genotipo, se realizó la prueba de Wilcoxon con rangos de Spearman de la siguiente manera: AA vs AG, AA vs GG y AG vs GG. Es así que todas las comparaciones resultaron estadísticamente diferentes entre sí para las variables de edad de la menarca, FUM, de primera gesta, del último parto y de edad de la menopausia. En todos los casos la prueba de Wilcoxon tuvo un valor de $p < 0.001$ y los rangos de Spearman tuvieron una $p < 0.05$.

A continuación se analizaron las características generales del tumor y su relación con el polimorfismo A → G del mismo exón 1.

En la tabla 13 se muestra el número de pacientes agrupadas por genotipo y el lado donde fue localizado el tumor. En el caso del genotipo AG hubo una paciente que presentó el tumor en forma bilateral, que para fines del análisis no se incluyó en esta tabla. Como podemos observar la mayoría de los casos presentó el tumor del lado izquierdo, tal y como se señala en la literatura (Lester SC., 2009).

Tabla 13. Localización del tumor en pacientes con cáncer de mama.

Genotipo	Localización del tumor	
	IZQUIERDO (n)	DERECHO (n)
AA	22	12
AG	27	27
GG	4	8
Total	53	47

Al realizar el análisis de Chi cuadrada para tendencias pudimos observar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los genotipos y el lado en donde se localizado el tumor ($X^2 = 3.920$, $p = 0.047$).

La tabla 14 muestra los promedios del tamaño del tumor expresado en centímetros que presentaron las pacientes. Como podemos observar las pacientes con genotipo AA tuvieron el tumor más pequeño (2.6) en comparación con las pacientes de genotipo AG y GG que tuvieron un tumor de tamaño promedio de 3.5 y 3.2 respectivamente.

Tabla 14. Tamaño general del Tumor.

TAMAÑO DEL TUMOR	GENOTIPO (Fenotipo)		
	AA (F)	AG (FS)	GG (S)
N	23	40	11
Promedio	2.57	3.508	3.182
D.E.	1.224	2.192	1.54
E.S.	0.2552	0.3466	0.4643
Mínimo	0.5	0.9	1
Percentila 25%	1.6	2.1	2
Media	2.5	3	3
Percentila 75%	3.5	4.4	4.5
Máximo	5	14	6

Pudimos observar, al realizar el análisis por ANOVA-Friedman, que existe una tendencia significativa entre el tamaño del tumor y el fenotipo (F vs S con una $p < 0.001$ y FS vs S con una $p < 0.01$)

La tabla 15 se refiere al total de pacientes que presentaron o no metástasis agrupadas por genotipo. La mayoría de pacientes con genotipo AA y AG no presentó metástasis, por el contrario la mayoría de pacientes con genotipo GG si la presentó. Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos con el análisis de Chi^2 .

Tabla 15. Pacientes con cáncer de mama y metástasis.

Variable	Genotipo		
	AA	AG	GG
Metástasis (n)	15	20	8
Sin Metástasis (n)	19	31	4

La tabla 16 muestra los diferentes estadios en los que se encontraba el tumor de las pacientes con CaMa al momento del diagnóstico. Con todos los datos se realizó un análisis de chi cuadrada en el cual, no se observaron resultados estadísticamente significativos ($X^2= 16.46$, $p= 0.08$).

Tabla 16. Estadios del tumor en las pacientes con cáncer de mama divididos por genotipo.

GENOTIPO (fenotipo)	ESTADIOS DE CaMa					
	II-A	II-B	III-A	III-B	III-C	IV
AA (F)	7	2	8	6	2	0
AG (FS)	11	9	10	3	0	1
GG (S)	0	4	2	2	2	0

DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que estudia la relación entre cáncer de mama esporádico y los polimorfismos del gen ORM1 en población mexicana. Como pudimos observar los genotipos del polimorfismo Gln20Arg del exón 1 en pacientes con CaMa y en sanos se distribuyeron de manera similar; indicando que el fenotipo S de AGP1 no es frecuente en las pacientes. Aunado a lo anterior, encontramos que la distribución del genotipo AG del polimorfismo Val156Met del exón 5 fue más frecuente en el grupo de sanos, demostrando que hay un menor riesgo de cáncer en las personas con genotipo heterocigoto y/o fenotipo F1F2.

De acuerdo con Fan C., la variante F1 de AGP1 se encontró en varias enfermedades incluidas el cáncer, sugiriendo que esta variante contribuye al desorden inmunogenético multifactorial, influyendo en la progresión y el curso clínico de la enfermedad más que el comienzo de la misma (Fan C., et al., 1995).

En otra investigación realizada en pacientes con diferentes tipos de cáncer, se mostró que existe un incremento relativo de la variante S de ORM1 entre pacientes con cáncer de mama y ovario pero no en los pacientes con cáncer pulmonar, por lo que los autores concluyen que la inducción de un alelo podría depender del estado patológico (Duché JC., et al., 2000).

Varios grupos señalaron la posible significancia clínica de los citados polimorfismos (Mittermüller J., et al., 1992; Fan C., et al., 1995 a y b; Duche JC., et al., 2000; Lee SY., et al., 2001; Hashimoto S., et al., 2004). Aunque la causa de esta relación no se ha esclarecido, se especula que AGP1 y otras proteínas de fase aguda podrían actuar, bloqueando marcadores tumorales necesarios para el reconocimiento y así contribuir al escape inmunológico del tumor. Esto se demostró al observar una correlación de los efectos inmunosupresores de AGP entre el estadio clínico de la enfermedad y los niveles séricos de la proteína (Fan C., et al., 1995).

En un estudio realizado por Hashimoto, se demostró que los niveles séricos de AGP en el grupo de pacientes con diferentes tipos de cáncer entre los que se incluían el cáncer de mama fueron significativamente mas altos comparado con el grupo control (Media \pm DE de 888.3 ug/mL \pm 558.8 ug/uL vs 569.4 ug/uL \pm 238.0

ug/uL; $p < 0.001$). Cuando los niveles de AGP fueron comparados con el tamaño del tumor, estadio clínico y el status de acuerdo a la clasificación TNM, no se observaron diferencias significativas, sin embargo los pacientes con enfermedad avanzada o recurrente y con metástasis secretaron niveles altos de AGP; esto puede sugerir que aunque AGP es conocido como un marcador de inflamación, sus niveles séricos por si mismos, podrían no necesariamente relacionarse con las características generales del tumor. Sin embargo en pacientes con buen pronóstico los niveles séricos de AGP disminuyeron después de la cirugía y en pacientes con mal pronóstico nunca se modificaron o se modificaron pobremente, encontrando también que el grado de ramificación que sufrió AGP cambió (Hashimoto S., et al., 2004).

Así se sugiere que los niveles séricos de AGP sirvan como biomarcadores potenciales para el seguimiento del curso clínico de la enfermedad y para la existencia y severidad de una respuesta inflamatoria, ya que se ha observado que estos niveles caen durante la fase de regresión del tumor. También existe una correlación entre la elevación de los niveles séricos de AGP durante el periodo de pos-tratamiento con el incremento de la carga tumoral. (Fish RG., et al., 1982).

La propuesta de que ORM es un gen de riesgo para cáncer de mama, requiere estudios de seguimiento en diferentes poblaciones, ya que nuestro análisis no mostró relación significativa entre la variante G (o fenotipo S) y la enfermedad, por lo que nuestros resultados permiten sugerir que el polimorfismo no participa, de forma aislada, en la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer.

Por otra parte es importante tomar en cuenta que existen diferentes tipos de AGP y que dependiendo del tipo que se trate por ejemplo, F1S o A (del gen ORM2 el cual no fue motivo de estudio en este proyecto) aumenta el contenido de ácido siálico o fucosa en la estructura de la proteína. La variante A difiere de F1S por la substitución de 22 aminoácidos, algunos de los cuales están localizados en la cercanía a sitios de glicosilación (posición 15, 75 y 85), mientras que F1 y S difieren solo por un aminoácido (posición 20) cercano a asparagina 15. Debido a estas diferencias en los patrones de glicosilación y entre los fenotipos F1S y A se ha sugerido que la glicosilación de AGP depende de los polimorfismos genéticos,

ya que se ha reconocido que un polipéptido puede ejercer control sobre su propia glicosilación. Incluso cambios sutiles en la secuencia de aminoácido de las glicoproteínas pueden causar variaciones en los oligosacáridos ligados a ellos (Hervé F., et al., 2003).

Determinar los cambios en la glicosilación así como los niveles séricos de AGP podría ser de utilidad para el diagnóstico y manejo de varias enfermedades, incluido el cáncer. Los cambios en las glicofomas de AGP sugieren que el incremento en la cantidad relativa de estructuras biramificadas más que en las tri o tetra, ocurre con nueva síntesis de AGP como consecuencia de una reacción de fase aguda. Estas investigaciones han demostrado que los índices de ramificación y fucosilación son marcadores significativos para el pronóstico comparados con otros factores clínicos, incluyendo el tamaño del tumor, la clasificación TNM y los niveles séricos de AGP. Sugiriendo también que el incremento de la fucosilación en AGP dependiente del tumor resulta de cambios en el proceso de glicosilación hepática de AGP, debido a que la fucosilación no puede llevarse a cabo en el plasma por la ausencia de GDP-fucosa como un donador de azúcar para la enzima α -fucosiltransferasa. La glicofoma de AGP clasificada como tipo D (que contiene principalmente 5 oligosacáridos tri o tetraramificados y que substancialmente están fucosilados) fue asociada con un pobre pronóstico en pacientes con carcinoma, observándose también que parte de los oligosacáridos fucosilados están presentes en una configuración sialil Lewis (SLe^x); mientras las glicofomas clasificadas como tipo A-C fueron asociadas con un buen pronóstico (Hashimoto S., et al., 2004).

Se piensa que es de esta manera que AGP podría tener una actividad inmunomoduladora ya que al estar fucosilada, expresa mayor cantidad de grupos SLe^x , un pentasacárido que también se expresa en células del sistema inmune y que participa en procesos inflamatorios; por lo que AGP tendría mayor afinidad con las selectinas E. Sin embargo se ha expuesto recientemente, que existen 2 formas de AGP en los neutrófilos: una forma abundante y altamente glicosilada de 45-60 KDa, la cual es generada en metamielocitos y almacenada en gránulos secundarios y una forma escasa de 41 KDa la cual es endocitada del plasma y

almacenada en vesículas secretorias; lo que demuestran que los patrones de glicosilación de AGP dependen de su origen celular y que AGP derivada de neutrófilos puede ejercer una actividad inmunomoduladora local (Theilgaard-Mönch K., et al., 2005). Por otra parte estudios realizados *in vivo* sugieren que AGP puede tener un efecto en la diapedesis linfocitaria ante un proceso inflamatorio, al aumentar la cantidad de grupos SLe^x en la molécula (mecanismo humoral) provocando una inhibición competitiva en la extravasación de granulocitos, células T y leucocitos a los sitios de inflamación. (De Graaf T., et al., 1993).

También se ha observado que AGP puede derivar de las células epiteliales de la mama y al contener grupos SLe^x en episodios de cáncer, estas células podrían aumentar su capacidad para invadir otros tejidos y evadir al sistema inmune, funcionando finalmente como un inmunomodulador (Gendler S.J., et al., 1982; Gallegos Velasco, 2008).

Es así que el epitelio normal del tejido mamario regularmente tiene una mínima expresión del gen ORM, sin embargo durante un proceso maligno como es el cáncer, se especula que estas células sobre-expresan el gen, originando una respuesta inmune no protectora, que al inhibir los neutrófilos se provocará la disminución de la diapedesis celular y por lo tanto de la fagocitosis. Por otra parte al regular la actividad del macrófago se impedirá la secreción de cantidades mayores de IL-1, provocando la no activación de células NK y T, necesarias para el correcto funcionamiento de la respuesta antitumoral y para la síntesis y secreción de citocinas tales como TNF e IFN γ , necesarias para la expresión del factor tisular y en consecuencia para la atracción de plaquetas y estímulo del macrófago para producir IL-12. Por lo tanto el tumor mamario presentará una proliferación celular por inhibición de la respuesta inmune antitumoral.

AGP es actualmente la proteína de fase aguda más extensamente estudiada, cuya secuencia completa de aminoácidos es conocida, al igual que su contenido de carbohidratos, AGP muestra secuencias homólogas con las inmunoglobulinas y ha sido localizada en la superficie de linfocitos (Theilgaard-Mönch K., et al., 2005). Sin embargo, más que presentar secuencias homólogas a inmunoglobulinas, AGP parecería funcionar con un mecanismo de recombinación génica semejante a lo

que sucede con las inmunoglobulinas, donde una proteína o un conjunto de proteínas que conforman la “recombinasa de cambio”, reconocen secuencias de repeticiones cortas que al unirse a ellas, llevan a cabo la recombinación del DNA o lo que se conoce como cambio de isotipo de las inmunoglobulinas. Mientras que otras proteínas reguladoras conocidas como citocinas, actúan como factores de cambio con funciones relevantes en la determinación de la clase particular de inmunoglobulina, por ejemplo, la interleucina 4 induce un cambio de isotipo IgM a IgD o IgE. De esta misma manera parecería funcionar AGP; al tener una variabilidad polimórfica en su secuencia y con la ayuda de las citocinas provocar un cambio estructural en sus patrones de glicosilación, ya que como hemos visto esta proteína no solo se sintetiza a nivel hepático sino también hay síntesis local. Otros autores también han propuesto que la glicosilación de AGP podría depender de sus polimorfismos genéticos (Hervé F., et al., 2003).

Actualmente no ha sido establecido si el polipéptido por si mismo o los carbohidratos de esta proteína son responsables para su actividad. Si bien la parte de los carbohidratos es importante para la vida media de la proteína y para su distribución intracelular, se conoce poco de la relación entre glicosilación y expresión génica de AGP (Hervé F., et al., 2003).

Por otra parte el presente trabajo analizó las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos A/G (Gln20Arg) del exón 1 y G/A (Val156Met) del exón 5 del gen ORM1 en población mexicana. Este hecho es importante debido a que la distribución de los polimorfismos en los grupos estudiados difirió no solo en un aspecto antropológico y cultural sino también en un aspecto genético. Estas observaciones se obtuvieron al estudiar específicamente los fenotipos F, S (exón 1) y F1, F2 (exón 5) del gen ORM1 los cuales han ayudado a distinguir varias poblaciones del mundo (Duché JC., et al., 2000; Fan C., et al., 1995; Mittermüller J., et al., 1992; Yuasa I., et al., 1990; Umetsu K., et al., 1988 y 1995).

Se encontró que al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre mestizos e indígenas mexicanos estas mostraron diferencias significativas. Aunque es difícil proponer una causa definitiva para estas diferencias genéticas, varios factores podrían explicar estos acontecimientos. Uno de ellos es que los indígenas Teenek

han habitado la Huasteca Potosina, subsistiendo sin mezclarse, como un grupo nativo puro al resistir 2 conquistas: la azteca y la española (Gallardo Arias, 2004). Fue hasta la intervención francesa, que los indígenas vieron una forma de abolir el sistema opresor debido a que los indígenas apoyaron a los franceses. A finales del siglo XVI aumentó la presión de los latifundistas mestizos sobre las comunidades indígenas con el fin de despojarlos de sus territorios mediante la renta del mismo. El despojo de tierras se aceleró a causa de las leyes de desamortización que suprimían la propiedad comunal. La Revolución de 1910 en la región Huasteca tuvo un carácter conservador; ésta no modificó las estructuras agrarias. Fue hasta los años treinta, cuando las comunidades indígenas recuperaron algunas tierras y ejidos, en tanto que los mestizos conservaron la planicie y los valles (www.cdi.gob.mx/ini/). Por lo que estas barreras sociales, culturales y territoriales también pudieron contribuir a las diferencias genéticas significativas entre mestizos e indígenas.

En la actualidad existen pocos reportes acerca de los polimorfismos de ORM1 en poblaciones latinas o indígenas. Al principio cuando comenzamos a estudiar estos polimorfismos en el año 2004 no se contaban con reportes de la diversidad poblacional en las bases de datos mundiales. Hoy en día estos polimorfismos han tomado interés debido a su relación con enfermedades crónico-degenerativas y hemos podido comparar nuestros resultados. Interesantemente, nuestra población mostró una mayor variabilidad genética en el exón 1 tanto entre mestizos e indígenas (frecuencia del alelo G o fenotipo S =0.366 vs 0.511, respectivamente) así como con la población europea (NCBI, rs17650) ya que en estos últimos solo se ha observado la presencia del alelo A o fenotipo F y el genotipo heterocigoto AG.

Recientemente se describió la presencia de al menos dos tipos de ORM1-F1 en africanos: F1(Ala) y F1(Thr), los cuales dependen de un cambio de G → A en el nucleótido 1708 (aminoácido 16) del exón 1, (Yuasa I., et al., 2006). Nuestro estudio reveló la frecuente ocurrencia del alelo G (F1 Ala) y además fue posible encontrar otra mutación en el exón 1 en mestizos mexicanos (heterocigoto A/T en

el nucleótido 1711) la cual no ha sido previamente descrita y merece una futura investigación.

ORM1 S también ha sido clasificado como S2 (T) y S2 (C) de acuerdo a la presencia de timina o citosina en el nucleótido 3626 (Yuasa I., et al., 2006), lo cual es de interés debido a que este cambio fue observado en una familia ghaniana; aunque existen algunos grupos asiáticos, finlandeses y suecos que han reportado la baja frecuencia del alelo S2 (Fan C., et al., 1993). En nuestra población no se presentó este polimorfismo; por lo que consideramos que más estudios son necesarios para demostrar que existen arreglos génicos que puedan distinguir a otras poblaciones del mundo o grupos étnicos específicos, incluyendo a los amerindios.

Con lo que respecta al polimorfismo del exón 5, los mestizos mexicanos tuvieron características genéticas similares a otras poblaciones del mundo (Johnson A., et al., 1969) mientras que los indígenas Teenek mostraron una alta frecuencia del alelo A y del genotipo GA en relación con poblaciones asiáticas, africanas y europeas (NCBI). Aunque la transición $G \rightarrow A$ del exón 5 es descrita como un polimorfismo caucasoide y ha sido predominantemente referida a europeos, el presente estudio reporta que es de igual forma, común en Amerindios.

El exón 5 también permite distinguir entre varios fenotipos del gen ORM1 (F1, F1F2, F2, F1S, F2S y S). Al comparar nuestros resultados observamos que el fenotipo más frecuente fue F1S, seguido por el fenotipo F1, como sucede en otras poblaciones del mundo (Mittermüller J., et al., 1992); sin embargo para los indígenas Teenek, el segundo lugar lo ocupó el fenotipo S y F2S, este hecho es importante debido a que la variante SS ha sido frecuentemente relacionada con cáncer (Mittermüller J., et al., 1992; Fan C., et al., 1995 a y b; Duché JC., et al., 2000). Inconvenientemente, en México no contamos con bases de datos que nos señalen si la frecuencia de casos de cáncer en poblaciones indígenas esté o no incrementada en comparación con los mestizos.

Finalmente, este gen y su proteína deben seguirse estudiando utilizando diferentes métodos y tomando en cuenta los polimorfismos, la expresión génica, los cambios postraduccionales y los niveles séricos de AGP en diversas

situaciones ya que como se confirma en estudios de proteómica, AGP podría funcionar como un marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer de mama (Alexander H., et al., 2004).

CONCLUSIONES

1. Nuestro trabajo no mostró relación significativa entre el alelo G (fenotipo S) y el cáncer de mama.
2. Los polimorfismos Gln20Arg y Val156Met del gen ORM1 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre mestizos e indígenas.
3. La población mestiza e indígena presentaron una frecuente ocurrencia del fenotipo ORM1 F1(Ala) el cual depende de un cambio de G → A en el aminoácido 16 del exón 5.
4. Durante mucho tiempo el polimorfismo G → A del exón 5 se consideró como un polimorfismo caucasoide, sin embargo el presente estudio reporta que también podría ser común en Amerindios.

PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio las perspectivas son las siguientes:

1. Publicación de los resultados obtenidos de las frecuencias genotípicas y alélicas del gen ORM1 en pacientes con cáncer de mama esporádico.
2. Publicación de los resultados obtenidos en las pacientes con cáncer de mama esporádico y su relación con los factores epidemiológicos y clínicos.
3. Presentar una propuesta para un proyecto de investigación ante FOSEC-CONACyT que incluya el análisis genotípico, transcripcional, traduccional y de las modificaciones postraduccionales de la glicoproteína alpha-1-ácida en pacientes con y sin patología (cáncer).
4. Realizar acuerdos interinstitucionales UNAM-ISSSTE para la tutoría de alumnos de licenciatura, maestría y/o doctorado.
5. Participar en foros nacionales e internacionales para la difusión de los resultados del proyecto.
6. Solicitar la incorporación al Sistema Nacional de Investigadores.

ANEXO 1
CARTA DE CONSENTIMIENTO

Estimado Paciente:

Estamos realizando una investigación cuyo propósito es definir la frecuencia de algunas variaciones en marcadores genéticos en la población mexicana a partir de muestras de sangre.

Por lo anterior, tomando en consideración su decisión de donar sangre al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, solicitamos su participación voluntaria en el estudio mencionado la cual consiste en autorizar al Banco de Sangre y a nuestro Laboratorio de Investigación en Autoinmunidad, conservar la muestra de sangre que se le toma antes de la donación formal de sangre. En esta muestra se realiza la cuenta de las células circulantes (Biometría Hemática; BH) y después de obtener los resultados se desecha, por lo que su autorización para conservar la muestra de sangre no tiene ningún riesgo o consecuencia sobre sus resultados de BH; tampoco tiene ningún costo para usted, no altera el uso del paquete de sangre donado y no afecta en manera alguna la atención que usted o su paciente recibe por parte del Instituto.

La información que se obtenga de nuestro estudio podrá ser de utilidad médica futura; los resultados serán publicados exclusivamente en revistas especializadas por lo que los resultados individuales no le serán proporcionados.

Su participación es totalmente voluntaria, por lo que si no desea participar está en total libertad de hacerlo.

Agradecemos de antemano su participación y le pedimos que marque con una "x" su respuesta.

Una vez que se me ha explicado lo anterior, he decidido que:

Si autorizo conservar mi muestra de sangre

No autorizo conservar mi muestra de sangre

Nombre y firma del donador

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma del testigo 2

ANEXO 2
CARTA DE CONSENTIMIENTO

Estimado Paciente:

Estamos realizando una investigación cuyo propósito es definir la frecuencia de algunos marcadores genéticos en la población mexicana a partir de muestras de sangre de pacientes que acuden al servicio de Oncología del Instituto Mexicano del Seguro Social Siglo XXI (IMSS).

Por lo anterior, solicitamos su participación voluntaria en el estudio mencionado la cual consiste en autorizar que se le tome una muestra de 10 mL de sangre venosa, la cual no representa ningún riesgo para su salud, solamente la posible formación de un pequeño "moretón" en el área de la punción.

Este estudio no tiene ningún costo para usted y no afecta de ninguna manera la atención que usted recibe por parte del Instituto

La información que se obtenga de nuestro estudio podrá ser de utilidad médica futura; los resultados serán publicados exclusivamente en revistas especializadas, por lo que los resultados individuales no le serán proporcionados.

Su participación es totalmente voluntaria, por lo que si no desea participar está en total libertad de hacerlo.

Agradecemos de antemano su participación y le pedimos que marque con una "x" su respuesta.

Una vez que se me ha explicado lo anterior, he decidido que

Si autorizo la toma de sangre

No autorizo la toma de sangre

México D.F. a _____ de _____ del 2006.

Médico responsable _____ Firma _____.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del testigo 1

Nombre y firma del testigo 2

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK. Inmunidad Antitumoral. En: Abbas AK. Inmunología Celular y Molecular. 6ª. ed. Barcelona, España: Elsevier Saunders; 2008. 397 – 417.
2. °Akerstrom B., Flower DR., Salier JP. Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482:1-8.
3. Alexander H., Stegner AL., Wagner-Mann C., Du Bois GC., Alexander S., and Sauter ER. Proteomic Analysis to Identify Breast Cancer Biomarkers in Nipple Aspirate Fluid. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7500-7510.
4. Arnaiz-Villena A., Vargas Alarcón G., Granados J., Gómez Casado E., Longas J., González Hevilla M., Zúñiga J., Salgado N., Hernández Pacheco G., Guillen J., Martínez Laso J. HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Ameritas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 2000; 56; 405-416.
5. Atemezem A., Mbemba E., Vassy R., Slimani H, Saffar L. and Gattegno L. Human α -1-acid glycoprotein binds to CCR5 expressed on the plasma membrane of human primary macrophages. *Biochem J* 2001; 356, 121-128.
6. Gallardo Arias P. Huastecos de San Luis Potosí. 1ª ed. México: Progreso SA de CV; 2004.
7. Azzimonti F., Atchley DH., Morrison CA., Dodd S., Boulton DW., DeVane CL., Arnaud P. One step purification of alpha 1-acid glycoprotein from human plasma. Fractionation of its polymorphic allele products. *J Chromatogr* 2003; 784:33-38.
8. Baumann H., Jahreis GP., Morella KK., Won KA., Pruitt SC., Jones VE., et al. Transcriptional Regulation through Cytokine and Glucocorticoid Response Elements of Rat Acute Phase Plasma Protein Genes by C/EBP and JunB. *J Biol Chem* 1991; 266:20390-20399.
9. Birch HE., and Schreiber G. Transcriptional Regulation of Plasma Protein Synthesis During Inflammation. *J Biol Chem* 1986; 261:8077-8080.

10. Bowman BH. Acute-Phase Reactants. En: Bowman BH. Hepatic Plasma Proteins Mechanisms of Function and Regulation. 1^a ed. United States of America: Academic Press, Inc; 1993. 47 - 95.
11. Couch FJ., Weber BL. Breast Cancer. En: Vogelstein Bert. The genetic basis of human cancer. 2a ed. United States of America: McGraw-Hill Companies; 2002. 549-581.
12. Chan J. and Yu D. One-Step Isolation of α 1-Acid Glycoprotein. Protein Expr Purif 1991; 2:34-36.
13. Chang Ch-J., Chen YL. And Lee S-Ch. Coactivator TIF1 β Interacts with Transcription Factor C/EBP β and Glucocorticoid Receptor to Induce α 1-Acid Glycoprotein Gene Expression. Mol Cel Biol 1998; 18:5880-5887.
14. Chiu KM., Mortensen RF., Osmand AP., Gewurz H. Interactions of alpha1-acid glycoprotein with the immune system I. Purification and effects upon lymphocyte responsiveness. Immunology 1977; 32:997-1005.
15. De Graaf TW., Van der Selt M., Anbergen MG., and Van Dijk W. Inflammation-induced Expression of Sialyl Lewis X-containing Glycan Structures on α ₁-Acid Glycoprotein (Orosomucoid) in Human Sera. J Exp Med 1993; 177:657-666.
16. Dente L., Ciliberto G., Cortese R. Structure of human α 1 glycoprotein gene: sequence homology with other human acute phase protein genes. Nucl Acids Res 1985; 13:3941-3953.
17. Dente L., Pizza MG., Metspalu A. and Cortese R. Structure and expression of the genes coding for human α 1-acid glycoprotein. EMBO J 1987; 6:2289-2296.
18. Duché JC., Herve F., Tillement JP. Study of the expression of the genetic variants of human α 1-acid glycoprotein in healthy subjects using isoelectric focusing and immunoblotting. J Chromatogr 1998; 715:103-109.
19. Duché JC., Urien S., Simon N., Malaurie E., Monnet I. and Barré J. Expression of the Genetic Variants of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein in Cancer. Clin Bioch 2000; 33:197-202.

20. Eap CB., Cuendet C. and Baumann P. Orosomucoid (alpha-1 acid glycoprotein) phenotyping by use of immobilized pH gradients with 8M urea and immunoblotting. A new variant encountered in a population study. *Hum Genet* 1988; 80:183-185.
21. Fan C, Sikström C, Beckman G and Beckman L. Orosomucoid polymorphism in Finns, Swedes and Swedish Saamis. *Hum Hered* 1993; 43: 272-275.
22. Fan C., Nylander PO., Stendahl U., Thunell M., y Beckman L. Synergistic Interaction between ORM1 and C3 Types in Disease Associations. *Exp Clin Immunogenet* 1995 a; 12:92-95.
23. Fan C., Stendahl U., Stjernberg N., Beckman L. Association between orosomucoid types and cancer. *Oncology* 1995 b; 52:498-500.
24. Fish RG., Yap AKL., and James K. Changes in Serum Acute Phase Proteins in Breast Cancer Patients Receiving Methotrexate Infusion Therapy. *Clin Biochem* 1982; 15:4-8.
25. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318:1-14.
26. Fournier T., Medjoubi-N N., Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498:157-171.
27. Gabay C., and Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med* 1999; 11:448-454.
28. Gallardo-Arias P. Huastecos de San Luís Potosí, pueblos indígenas del México contemporáneo. 1ª ed. México: CDI y PNUD; 2004.
29. Gallegos-Velasco IB., Coutiño R., Martínez G., y Hernández Cruz P. Marcadores Glicosilados en Cáncer de Mama. *REB* 2008; 27:52-59.
30. Gendler SJ., Dermer GB., Silverman LM., and Tökes ZA. Synthesis of α 1-Antichymotrypsin and α 1-Acid Glycoprotein by Human Breast Epithelial Cells *Cancer Res* 1982; 42:4567-4573.
31. Gómez Dentés H. El cáncer de mama en América Latina y el Caribe: morbilidad y carga de la enfermedad. Fundación Mexicana para la salud, 2009.

32. Harrison TR. Principios de Medicina Interna. 17^a ed. China: McGraw Hill Interamericana; 2009.
33. Hashimoto S., Asao T., Takahashi J., Yagihashi Y., Nishimura T., Saniabadi AR., et.al. α 1-Acid Glycoprotein Fucosylation as a Marker of Carcinoma Progression and Prognosis. *Cancer* 2004; 101:2825-2836.
34. Hervé F., d'Athis P., Tremblay D., Tillement JP. And Barré J. Glycosylation study of the major genetic variants of human α 1-acid glycoprotein and of their pharmacokinetics in the rat. *J Chromatogr B* 2003; 798:283-294.
35. Hidalgo-Miranda A., Jiménez-Sánchez G. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Publica Mex* 2009; 51:S197-S207.
36. Hochepped T., Berger FG., Baumann H., Libert C. α 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:25-34.
37. Johnson A. Myron, Schmid K. and Alper Chester A. With the technical assistance of Lesley Bissett. Inheritance of Human α 1-Acid Glycoprotein (Orosomuroid) Variants. *J Clin Invest* 1969; 48:2293-2299.
38. Klein ES., Reinke R., Feigelson P. And Ringold GM. Glucocorticoid-regulated Expression from the 5'-Flanking Region of the Rat α 1-Acid Glycoprotein Gene. Requirement for ongoing protein synthesis. *J Biol Chem* 1987; 262:520-523.
39. Kopecký V. Jr., Etrich R., Hofbauerová K. And Baumruk V. Structure of human α 1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:41-46.
40. Kremer JM., Wilting J., Janssen LHM. Drug Binding to Human Alpha-1-acid Glycoprotein in Health and Disease. *Pharmacological Reviews* 1988; 40:1-47.
41. Lara Medina F., Arce Salinas C., Alvarado Miranda A., Pérez Sánchez V., Castañeda Soto N., Ramírez Ugalde MT y Maafs Molina E. Cáncer de mama. Capítulo 47. En: JL. Aguilar Ponce. Manual de Oncología,

- Procedimientos Médico Quirúrgicos. 3^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2006. 467 - 487.
42. Lee SY, Lim JW and Kim YM. Effect of alpha1-acid glycoprotein expressed in cancer cells on malignant characteristics. *Mol Cells* 2001; 11: 341-345.
 43. Lester SC. The Breast. En: Robbins CK. *Pathologic Basis of Disease*. 8^a. ed. China: Saunders Elsevier; 2009. 1065 – 1094.
 44. Mainero Rathelous FE., Aguilar Gallegos UI., Bernechea Miranda A., Vargas Solano JM., Burgos Portillo I. Edad, etapa clínica y tipo histológico del carcinoma mamario en la Gineco 4. *IMSS. Rev Mex Mastol* 2008; 3:57-60.
 45. Martínez Tlahuel JL. Cáncer de mama. *Boletín de Práctica Médica Efectiva* 2007; 1-6. <http://www.insp.mx/nls/bpme>.
 46. Meneses García A., Mohar Betancourt A. Principales neoplasias malignas en México. 1^a ed. México: Manual Moderno; 1999.
 47. Mestriner FLAC., Spiller F., Laure HJ., Souto FO., Tavares-Murta BM., Rosa JC., Basile-Filho A., Ferreira SH., Greene LJ., and Cunha FQ. Acute-phase protein α -1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. *PNAS* 2007; 104:19595-19600.
 48. Mittermüller J., Weidinger S. Genetic study of orosomuroid by isoelectric focusing and immunoprinting in patients with carcinoma. *Electrophoresis* 1992; 13:785-786.
 49. Muchitsch EM., Auer W., Pichler L. Effects of α 1-acid glycoprotein in different rodent models of shock. *Fundam Clin Pharmacol* 1998; 12:173-181.
 50. Nakamura H. The rearrangement of the human α 1-acid glycoprotein/ orosomuroid gene: Evidence for tandemly triplicated genes consisting of two AGP1 and one AGP2, *Bioch Biop Research Comm* 2000; 276:779-784.
 51. Nakano M., Kakehi K., Tsai MH. And Lee YC. Detailed structural features of glycan chains derived from α -1-acid glycoprotein of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology* 2004; 14:431-441.

52. Owczarek CM., Owczarek AL. and Board PG. Identification and characterization of polymorphisms at the HAS α -1-acid glycoprotein (ORM*) gene locus in Caucasian. *Genet Mol Res* 2002; 1:96-105.
53. Paterson SC., Lim CK., and Smith KD. Analysis of the interaction between alpha-1-acid glycoprotein and tamoxifen and its metabolites. *Biomed chromatogr* 2003; 17:143-148.
54. Pukhalsky AL., Shyian SD., Kalashnikova EA., Shmarina GV., Pukhalskaya DA. And Bovin NV. Immunomodulating activities of a natural α -1-acid glycoprotein and its carbohydrate chains attached to the protein-free polymer. *Mediators of Inflammation* 1998, 7; 115-118.
55. Rodríguez Cuevas SA. y Capurso García M. Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol Obstet Mex* 2006; 74:585-593.
56. Saha N., Undevia JV., Juneja RK., Gahne B. and Tay JSH. Polymorphisms of Alpha-1-Acid (Orosomuroid), Alpha-2-HS-Glycoproteins and Alpha-1-B among the Parsis of India. *Hum Hered* 1992; 42:367-371.
57. Schmid K., Kaufmann H., Isemura S., Bauer F., Emura J., Motoyama T., et. al. Structure of α -1-Acid Glycoprotein. The Complete Amino Acid Sequence, Multiple Amino Acid Substitutions, and Homology with the Immunoglobulins. *Biochem* 1973;12:2711-2724.
58. Sörensson J., Matejka Göran L., Ohlson M. and Haraldsson B. Human endothelial cells produce orosomuroid, an important component of the capillary barrier. *Am J Physiol* 1999; 276:H530-H534.
59. Theilgaard-Mönch K., Jacobsen LC., Rasmussen T., Niemann CU., Udby L., Borup R., and et. al. Highly glycosylated α -1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *J Leukoc Biol* 2005; 78:462-470.
60. Umetsu K., Yuasa I., Chen ER., Kudo T., Suzuki T. Orosomuroid 1 and orosomuroid 2 types in the Taiwanese and Japanese: Evidence for five new orosomuroid variants. *Electrophoresis* 1988; 9:224 - 226.
61. Umetsu K., Yuasa I., Harada A., Susuki T., Pan IH., Ishida T., et. al. Orosomuroid Phenotyping with Monoclonal Antibodies: Polymorphic

- Ocurrente of ORM1*Q0 in Aboriginal Taiwanese Populations. Hum Hered 1995; 45:181-185.
62. Van Dijk W., Brinkman-Van der Linden ECM, and Havenaar EC. Glycosylation of α 1-acid Glycoprotein (Orosomucoid) in Health and Disease: Occurrence, Regulation and Possible Functional Implications. Trends Glycosci and Glycotechnol 1998; 10:235-245.
63. Van Dijk W., Pos O., Van der Stelt ME., Moshage HJ., Yap SH., Dente L., Baumann P., and Eap CB. Inflammation-induced changes in expresión and glycosylation of genetic variants of α -1-acid glycoprotein. Chin B Biochem J 1991; 276:343-347.
64. Yuasa I., Umetsu K., Suenaga K., Iha M., Hirata H., Ikebuchi J. Orosomucoid (ORM) Typing by Isoelectric Focusing: An Analysis of ORM Haplotypes. Hum Hered 1990; 40:267-271.
65. Yuasa I., Umetsu K., Vogt U., Nakamura H., Nanba E., Tamaki N., Irizawa F. Human orosomucoid polymorphism: molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORM1*F1, ORM1*F2, and ORM1*S. Hum Genet 1997; 99:393-398.
66. Yuasa I, Nakamura H, Umetsu K, Irizawa Y, Henke L, Henke J. The structure and diversity of alpha1-acid glycoprotein/orosomucoid gene in Africans. Biochem Genet 2006; 44:145-160.
67. Zimmermann-Belsing T., Rasmussen AK., Feldt-Rasmussen U. And Bog-Hansen TC. The influence of alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid) and its glycoforms on the function of human thyrocytes and CHO cells transfected with the human TSH receptor. Mol Cell Endocrinol 2002; 188:241-251.

SITIOS DE INTERNET

68. RHNM www.rhnm.mx
69. INI www.cdi.gob.mx/ini/
70. NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/
71. Gene Cards www.genecards.org/