



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PLAN ÚNICO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA “DR. SILVESTRE FRENK FREUND”
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO p.V660L
EN EL GEN *PGR* Y RIESGO PARA CÁNCER DE MAMA
DE PRESENTACIÓN ESPORÁDICA EN MUJERES MEXICANAS.**

**TESIS
PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN
GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA
DRA. MARÍA TERESA DE JESÚS CERVANTES DÍAZ**

**TUTOR:
DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA,
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA “DR. SILVESTRE FRENK FREUND”,
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.**

**COLABORADORES:
DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES
INVESTIGADOR ASOCIADO A, LABORATORIO DE GENÓMICA FUNCIONAL Y PROTEÓMICA,
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA,
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA “DR. SILVESTRE FRENK FREUND”,
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.**

**MÉXICO, DISTRITO FEDERAL
JULIO 2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

"2011, Año del Turismo en México"

29 de noviembre del 2011

Ref. 09-B5-61-2800/201100/ 194

Dr. Arenas Aranda Diego Julio
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Siglo XXI
Nivel Central

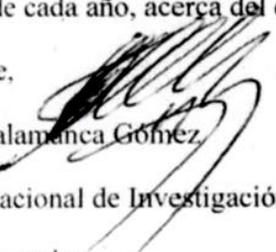
Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Estudio de asociación entre los Polimorfismos de Nucleótido Único CASP8 (D302), IGFBP3 (202c>a), PGR (V660L), SOD2 (V16A) y TGFB1 (L10P) y riesgo para cáncer de mama de presentación esporádica en mujeres mexicanas.**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: R-2011-785-066.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de Junio y Diciembre de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente,


Dr. Fabio Salamanca Gómez
Presidente
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

CMMA/ iah. F-CNIC-2011-109

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

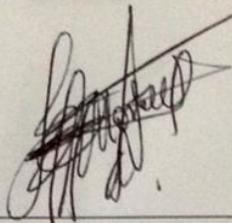


Dra. María Antonieta Araujo Solís

Presidente

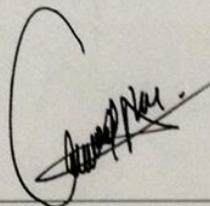
Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola

Secretaria



Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel

Vocal



Dr. Alan Cárdenas Conejo

Vocal

Dra. Haydeé Rosas Vargas

Vocal

INDICE

RESUMEN	2
I. ANTECEDENTES	4
Cáncer de mama	4
Riesgo de cáncer de mama esporádico y polimorfismos de nucleótido único (SNP).....	7
Receptor de progesterona	9
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
VI. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS	19
1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO:.....	19
2. DISEÑO.....	19
2.1 TIPO DE ESTUDIO	19
2.2 GRUPOS DE ESTUDIO	19
A. CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS:.....	19
B. CARACTERÍSTICAS DE LOS CONTROLES:.....	20
A) CRITERIOS DE SELECCIÓN	20
a. Criterios de inclusión.....	20
b. Criterios de exclusión.....	20
c. Criterios de eliminación	20
2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	20
2.4 DEFINICIÓN DE LA VARIABLES	21
2.5 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.....	22
2.6 ANÁLISIS DE DATOS	28
VIII. ASPECTOS ÉTICOS.....	29
IX. RESULTADOS	31
X. DISCUSIÓN	37
XI. CONCLUSIONES.....	42
XII. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	43
XIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	45
XIV. BIBLIOGRAFÍA	46
XV. ANEXOS	50
Anexo 1.....	50
Anexo 2.....	52

RESUMEN

Antecedentes: El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente en el mundo. En México en 2010, ocupó el primer lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres mayores de 35 años de edad. La forma esporádica constituye el 80% de los casos y está asociada frecuentemente al tipo intraductal. Se ha reportado en algunos estudios en poblaciones europeas, que la presencia del polimorfismo de nucleótido único p.V660L, en el gen que codifica para el receptor de progesterona, se encuentra asociado a un incremento en el riesgo para desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, hay mucha variabilidad en los resultados publicados al respecto, debido a que existen reportes aparentemente contradictorios en la literatura donde no se ha podido establecer dicha asociación.

Objetivo: Determinar si existe asociación entre el polimorfismo p.V660L en el gen del receptor de progesterona y el riesgo para el desarrollo de cáncer de mama de presentación esporádica en mujeres mexicanas.

Tipo de estudio: Casos y controles.

Métodos: Se incluyeron en el estudio 101 casos con cáncer de mama esporádico y 99 controles, previa firma de consentimiento informado. Los casos fueron mujeres con diagnóstico de cáncer de mama esporádico, con confirmación histopatológica. Los controles fueron mujeres libres de cáncer de mama al momento de la inclusión en el estudio, lo cual fue confirmado por mastografía. A ambos grupos se les tomó 5 ml de sangre periférica para la extracción de DNA. Posteriormente, se realizó PCR en tiempo real (discriminación alélica) empleando sondas TaqMan para la genotipificación del polimorfismo p.V660L del gen del receptor de progesterona.

Análisis estadístico: Se realizó estadística descriptiva con frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas y para las variables cuantitativas medidas de tendencia central (media o mediana) y dispersión (desviación estándar o mínimos y máximos). Para la prueba de asociación de las variables cualitativas, se realizó prueba de chi cuadrada o prueba exacta de Fisher; las variables cuantitativas con distribución normal se analizaron aplicando la prueba de T de Student, y para las variables cuantitativas con distribución libre prueba de U de Mann Whitney. Regresión logística multivariada para determinar el impacto de cada una de las variables sobre la presencia de cáncer de mama esporádico.

Resultados: Nuestro estudio no mostró una asociación entre el ser portador del alelo polimórfico T tanto en forma homocigota (TT; $p=0.97$; OR=1.02 con IC 95%: 0.14-7.49) como heterocigota (TG; $p=0.62$, OR=1.14 con IC 95%: 0.65-2.00), y un incremento en el riesgo para desarrollar cáncer de mama esporádico. Nuestros resultados revelan que la edad mayor a 50 años y el tiempo de tabaquismo mayor a 20 años fueron factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama, mientras que la lactancia durante 12 meses o más fue un factor protector.

Conclusiones: Nuestros datos indican que no hay una asociación entre la presencia del polimorfismo p.V660L y el aumento en el riesgo para desarrollar cáncer de mama esporádico. Además, en este estudio corroboramos los datos que indican que la edad y el tabaquismo son factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama y que la lactancia es un factor protector.

I. ANTECEDENTES

Cáncer de mama.

El cáncer de mama (CaM) es el tumor maligno más frecuente en el mundo; se estima que al año, se diagnostican 1.38 millones de casos nuevos en mujeres. En el año 2008, esta neoplasia representó el 23% del total de tipos de cáncer diagnosticados en mujeres a nivel mundial y el 14% del total de muertes por cáncer.¹ Actualmente, el CaM es el tipo de cáncer más común tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo^{1,2}. Su tasa de incidencia varía de una región geográfica a otra, siendo de 19.3 por cada 100,000 mujeres en el este de África a 89.7 por cada 100,000 mujeres en el oeste de Europa. Con base en lo reportado, se ha observado que las tasas de incidencia son más altas (mayores a 80 por cada 100,000 mujeres) en países desarrollados (excepto Japón) y bajas en la mayoría de los países no desarrollados (menores a 40 por cada 100,000 mujeres). El rango de tasas de mortalidad es mucho menor, aproximadamente de 6 a 19 por cada 100,000 mujeres, debido a las tasas de sobrevivencia más favorables en países desarrollados, a pesar de tener las incidencias más altas. Como resultado de lo anterior, el cáncer de mama ocupa el quinto lugar como causa de muerte por cáncer a nivel mundial, pero todavía es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo^{1,2}.

En el 2010, el cáncer de mama ocupó el primer lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas mayores a 35 años de edad, con una tasa de mortalidad del 17%³. En el 2011, de las personas con cáncer de 20 años y más, 30 de cada 100 mujeres tuvieron cáncer de mama y en ese mismo año, la principal causa de egreso hospitalario en las mujeres por tumores malignos se debió al cáncer de mama (29.6%). En las mujeres, el cáncer de mama es la primera causa de morbilidad hospitalaria, presentándose 57 de cada 100 casos en el grupo de edad de 40 a 59 años. Durante el año 2012, el cáncer de mama fue la segunda causa de muerte entre las mujeres con cáncer de 20 años y más (15.38 de cada 100 mil mujeres de esa edad)⁴. Según los datos reportados por el registro histopatológico de neoplasias malignas de la Secretaría de Salud, la tendencia va en aumento.

En relación al tipo de cáncer mamario, el que se asocia con más frecuencia a la forma esporádica de cáncer de mama es el cáncer intraductal. La forma esporádica de cáncer de mama, es decir, aquella en la cual no se presentan factores familiares asociados o hereditarios clásicos, es la presentación más frecuente de esta neoplasia, constituyendo aproximadamente el 80% del total de casos a nivel mundial, y los casos restantes se distribuye entre los casos de agregación familiar (15-20%) y de síndromes de cáncer hereditario específicos (5-10%) asociados con este tipo de tumor y otros. Se estima que el 15 a 20% de mujeres con cáncer de mama tienen historia familiar de la enfermedad^{5,6}.

En el caso del cáncer de mama, existen estudios contundentes mediante los cuales se ha demostrado un riesgo aumentado de desarrollar este tipo de cáncer cuando existe la interacción con factores como anticonceptivos hormonales, nuliparidad, menarca prematura, edad avanzada, tabaquismo y obesidad, entre otros^{7,8}. Son pocos los casos en los cuales contamos con mutaciones específicas que conducen invariablemente a un riesgo mucho mayor para el desarrollo de la patología, como es el caso de síndromes de cáncer hereditario por mutaciones en genes que controlan el ciclo celular⁹.

El CaM se estadia mediante la clasificación TNM propuesta por el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, modificado por última vez en 2002. Este sistema de estadificación está basado en factores anatómicos como son el tamaño del tumor, la presencia de metástasis a ganglios linfáticos y de metástasis a distancia, que una vez identificados permiten clasificar a las pacientes en grupos por estadio clínico¹⁰.

Histológicamente, el CaM se divide en *in situ* (ductal y lobular) e invasivo, siendo el más frecuente el carcinoma invasivo sin un tipo especial. Los otros tipos de tumor son tipos morfológicamente diferentes que incluyen el lobular invasivo, tubular, mucinoso, carcinoma metaplásico y carcinoma con características medulares, neuroendocrinas o apocrinas¹¹.

En todos los carcinomas de mama invasivos, independientemente del tipo histológico debe establecerse el grado histológico ya que es un factor pronóstico muy importante. El sistema más utilizado para esto es el de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston y Ellis. En este sistema, el puntaje se asigna de acuerdo a la proporción de formación de túbulos correspondiendo un punto si el 75% o más del tumor presenta túbulos, dos puntos si el 10-75% del tumor tiene formación de túbulos y 3 puntos si la formación

de túbulo es menor a 10%; el grado nuclear, otorgándose un punto si el núcleo es pequeño pero muy similar a un núcleo normal, dos puntos si el núcleo es mayor que uno normal y presenta cromatina en grumos y 3 puntos cuando el núcleo tiene una variación marcada en forma, tamaño y patrón de la cromatina con dos o más nucléolos; el número de mitosis, asignándose un punto para 0-9 mitosis por 10 campos de gran aumento, dos puntos para 10 a 19 mitosis y tres puntos para 20 o más mitosis. El puntaje total permite conocer el grado histológico; para un puntaje de 3 a 5 corresponde el grado 1 (tumor más diferenciado), para un puntaje de 6-7 corresponde el grado 2 y para un puntaje de 8-9, el grado 3 (menos diferenciado)¹¹.

De forma rutinaria en la práctica clínica se utilizan biomarcadores como ER (receptor de estrógenos), PR (receptor de progesterona) y HER2/Neu (miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico 2). Estos biomarcadores permiten predecir la respuesta del tumor con la terapia hormonal y también se utilizan como factores pronósticos para recurrencia y desenlace a largo plazo. Cerca de 80% de los tumores de mama son ER positivos y aproximadamente el 77% de los tumores ER y PR positivos responden a terapia hormonal con tamoxifeno o inhibidores de aromatasas. Sin embargo, 40% de los tumores de mama son ER positivos y PR negativos, lo que conlleva a que el tumor responda menos a la terapia hormonal. En cuanto a HER2, el 13 a 20% de los tumores de mama son positivos y, de este porcentaje, aproximadamente la mitad son negativos a ER y PR; cuando este biomarcador se encuentra positivo es un factor de mal pronóstico y permite predecir una buena respuesta al tratamiento sistémico con trastuzumab, el cual es un anticuerpo monoclonal específico anti-HER2. Aproximadamente 10 a 15% de los tumores de mama son negativos para ER, PR y HER2 por lo que se denominan triple negativo¹¹⁻¹³.

Con base en estos biomarcadores antes mencionados y algunos otros nuevos biomarcadores como Ki-67, el cual es una proteína nuclear que se expresa únicamente en células en proliferación, o citoqueratinas CK5/6 y CK14 que se expresan normalmente en el compartimiento celular mioepitelial/basal en la mama normal, se ha podido establecer una clasificación molecular del CaM con el uso de perfiles de expresión génica obtenidos mediante microarreglos. Esta clasificación comprende los subtipos luminal A y B, similar al basal, HER2 positivo, similar al normal y bajo en claudina¹¹⁻¹³. Sin embargo, ya que el uso de

perfiles de expresión génica para clasificar el CaM es de utilidad limitada en la práctica clínica diaria debido al costo y al tiempo que se necesita para llevar a cabo los microarreglos, varios grupos han intentado realizar esta clasificación molecular mediante inmunohistoquímica utilizando como biomarcadores principalmente ER, PR, HER2, así como Ki-67, CK5/6 y EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)¹⁴. El subtipo luminal se caracteriza por ser ER positivo. Específicamente el luminal A corresponde a tumores de bajo grado, PR positivo, HER2 negativo; mientras que el luminal B abarca tumores de alto grado, PR positivo o negativo, HER2 negativo o positivo y Ki-67 elevado, por lo que este último biomarcador permite diferenciar entre luminal A y luminal B. Las pacientes con tumor subtipo luminal A tienen mejores tasas de supervivencia comparadas con pacientes con tumores de otros subtipos. El subtipo similar al basal se caracteriza por la expresión de CK5/6, CK14, EGFR y ser triple negativo, siendo la mayoría de grado histológico 3 y con un comportamiento clínico agresivo. El subtipo HER2/neu positivo se caracteriza por la sobreexpresión de este oncogén, la cual se asocia a un alto grado histológico en el tumor, baja expresión de ER y PR y mal pronóstico en las pacientes; este subtipo es particularmente resistente a la terapia hormonal independientemente del estado de los receptores hormonales, pero responde bien al tratamiento con trastuzumab¹¹⁻¹³.

Riesgo de cáncer de mama esporádico y polimorfismos de nucleótido único.

Se ha demostrado que existe una predisposición con modelo de herencia autosómico dominante que confiere un riesgo incrementado para el desarrollo de CaM al estudiar los genes de cáncer de mama 1 de inicio temprano (*BRCA1*) y de cáncer de mama 2 de inicio temprano (*BRCA2*). Mutaciones en estos genes se relacionan fuertemente con un incremento en el riesgo de CaM en presencia de antecedentes heredofamiliares compatibles con el síndrome de cáncer de mama-ovario (menos del 5% de los casos de cáncer de mama); sin embargo, no se ha observado la misma asociación cuando se presenta la forma esporádica de CaM^{5,6,9}. Por el contrario, existe evidencia de que los polimorfismos de nucleótido único (SNP) muestran una contribución en el incremento del riesgo de CaM esporádico¹⁵.

Un polimorfismo de nucleótido único, por sus siglas en inglés SNP (Single Nucleotide Polymorphism), constituye una forma de variación en la secuencia del genoma que involucra un solo par de bases que es alternativo (T,C,G,A) y que se presenta con una frecuencia mayor al 1% en la población, sin generar directamente un fenotipo patológico específico¹⁶. En principio, dos, tres o cuatro nucleótidos alternativos en cualquier locus en particular puede clasificarse como un SNP; únicamente cuatro diferentes SNPs bialélicos existen: una transición (T/C) y tres transversiones (T/A, T/G, C/G), las otras dos sustituciones (A/G, A/C) son el complemento de la cadena representada por las dos primeras indicadas (T/C, T/G). Se estima que el genoma del ser humano presenta de cuatro a cinco SNPs por cada 1,000 bases, lo cual, si se extrapola a todo el genoma humano, corresponde a más de 10, 000, 000 de SNPs. Los SNPs contribuyen a la variación fenotípica; por ejemplo, metabolismo de fármacos y susceptibilidad a enfermedades, entre otros^{16,17}.

El efecto fenotípico de los polimorfismos se basa en efectos genéticos directos, epistasis e interacciones gen-ambiente, afectando distintos mecanismos de aumento o reducción de la transcripción, alteraciones postranscripcionales o actividad postraduccional, así como cambios en la estructura terciaria del producto proteico^{15,16}.

Aunque el tamaño del efecto de la mayoría de los SNPs de forma individual no es tan alto, ya que se han descrito asociados a valores de OR menores a 1.5, la combinación del efecto de un grupo de SNP puede ser aditivo o sinérgico para contribuir al aumento del riesgo para desarrollar CaM. Lo anterior puede ser explicado mediante epistasis, epigenética y modelos poligénicos que confieran mayor susceptibilidad al desarrollo de dicha neoplasia^{15,18}.

Actualmente, el valor clínico que tienen los SNPs en el diagnóstico del CaM es para considerar susceptibilidad para el desarrollo de este tipo de cáncer y estimar un riesgo, en adición a marcadores tradicionales como son los antecedentes familiares e índice de masa corporal. Por lo cual, las consecuencias clínicas que su estudio ha generado repercuten en el tipo de dieta de las pacientes, la optimización del índice de masa corporal, la realización de ejercicio físico, evitar el consumo de alcohol y ciertos fármacos, como los anticonceptivos orales y terapias hormonales de reemplazo y la participación

de las mujeres en programas de tamizaje para la detección de CaM esporádico entre los 50 y 70 años. Medidas más drásticas, como serían la mastectomía profiláctica o quimioprevención con moduladores selectivos del receptor de estrógenos (tamoxifeno), no están indicados al establecer un riesgo con base en el análisis de SNPs^{15,18,19}.

De acuerdo con el metaanálisis realizado por *The Breast Cancer Association Consortium* (2006), se estableció que tras el análisis estadístico de una serie de trabajos publicados donde había encontrado un riesgo incrementado al asociar ciertos polimorfismos con el desarrollo de CaM, únicamente cinco SNPs fueron estadísticamente significativos: p.D302H en el gen *CASP8* (*Peptidasa de cisteína asociada a apoptosis, caspasa 8*), c.-202C>A en el gen *IGFBP3* (*Proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a insulina*), p.V660L en el gen *PGR* (*Receptor de progesterona*), p.V16A en el gen *SOD2* (*Superoxido dismutasa 2*) y p.L10P en el gen *TGFBI* (*Factor transformante de crecimiento, beta 1*), con una significancia estadística límite con valores de $p= 0.016, 0.050, 0.047, 0.056$ y 0.0088 , respectivamente²⁰. Este metaanálisis es una referencia importante ya que englobó 16 SNP que previamente habían sido estudiados buscando su asociación con CaM y analizó los resultados de por lo menos tres estudios llevados a cabo con anterioridad para cada SNP, incluyendo en el análisis 8187 sujetos controles y 7593 casos, aunque la mayoría pertenecían a población caucásica.

Receptor de progesterona

Con respecto al gen del receptor de progesterona (*PGR*), también llamado *NR3C3* (*receptor nuclear, subfamilia 3, grupo C, miembro 3*), se localiza en la región 11q22.1 y codifica para el receptor de progesterona, el cual está involucrado en el desarrollo sexual femenino y la actividad reproductiva²¹.

Todas las funciones mayores de la progesterona están mediadas por las dos isoformas del receptor de progesterona, PRA y PRB, las cuales son factores de transcripción dependientes de ligando. PRB difiere de PRA por la presencia de 164 aminoácidos adicionales en la región N-terminal. La parte restante es idéntica para ambas proteínas y consiste en el dominio de unión a DNA (DBD) y el dominio de unión a ligando C-terminal (LBD)²²⁻²⁵. Funcionalmente, PRB es un activador transcripcional más poderoso que

PRA; mientras que PRA puede actuar como supresor de PRB y de otros receptores nucleares. Estudios en modelos murinos *knockout* demostraron que ratones sin expresión de PRA tenían un desarrollo glandular mamario normal a diferencia de los ratones sin expresión de PRB, los cuales tuvieron un desarrollo glandular mamario disminuido²².

El gen *PGR* comprende ocho exones y siete intrones (A-G) (Figura 1). Una variante polimórfica de este gen, *PROGINS* consiste de una inserción Alu PV/HS-1 de 320 pb en el intrón G y dos polimorfismos de nucleótido simple. El SNP c.3432G>T afecta al exón 4 y causa una sustitución de aminoácido a nivel de la proteína (p.V660L), y el SNP c.3764C>T afecta al exón 5 y ocasiona un cambio sinónimo o silencioso p.H770H. Cualquiera de estas tres variantes ha sido considerada como un marcador de la presencia de las otras dos, ya que se ha reportado que las tres se encuentran en un perfecto desequilibrio de ligamiento^{26,27}.

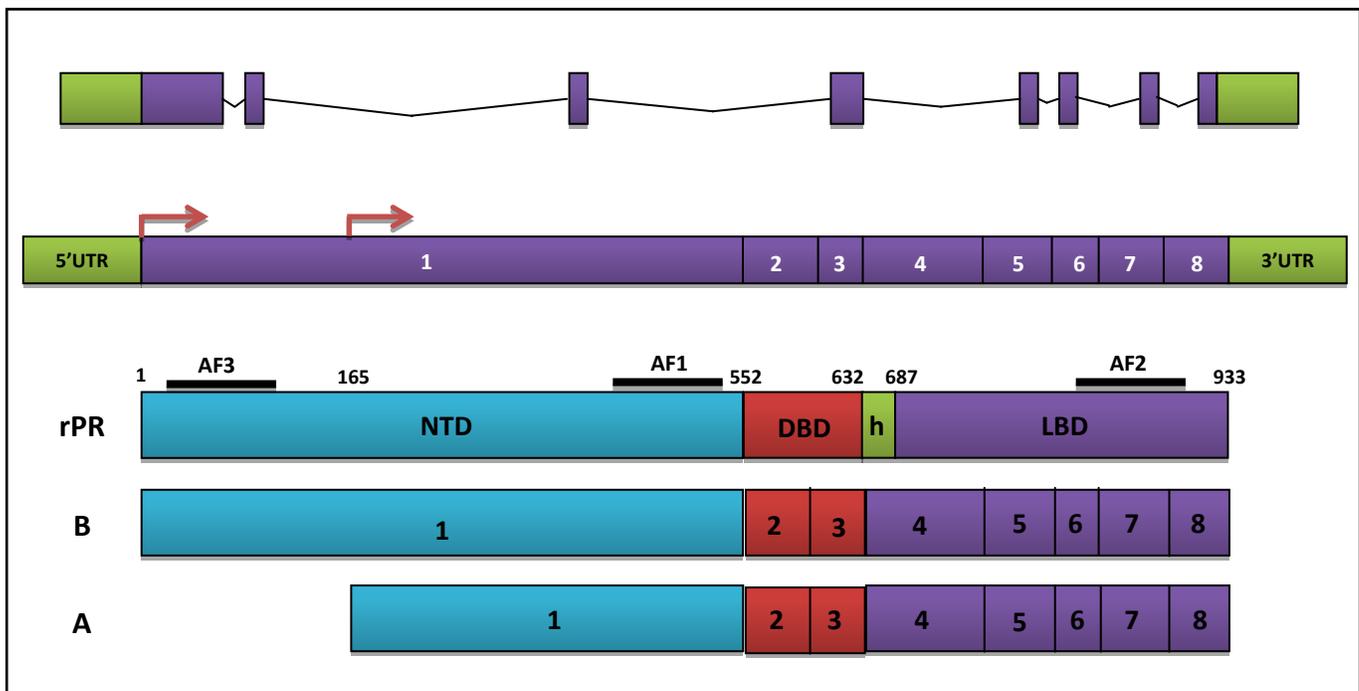


Figura 1. Estructura del gen *PGR*. (Modificado de Misrahi y colaboradores, 1993 y Hill y colaboradores, 2012). Se observan las regiones 5'UTR y 3'UTR señaladas en los recuadros verdes, así como los sitios de inicio de transcripción para las isoformas A y B (flechas rojas). rPR: receptor de progesterona, LBD: dominio de unión a ligando, DBD: dominio de unión a DNA, NTD: dominio amino-terminal, h: dominio en bisagra. AF1, AF2 y AF3: función de activador transcripcional.

Considerando las posibles consecuencias funcionales de cada una de estas tres alteraciones que conforman el polimorfismo *PROGINS*, únicamente la inserción Alu y la sustitución del aminoácido p.V660L se espera que afecten la función del receptor, ya que el cambio sinónimo o silencioso (p.H770H) no se espera que altere las propiedades de la proteína porque no origina un cambio de aminoácido. Sin embargo, se conoce que los genomas en procariotas y eucariotas presentan un sesgo en el uso de codones para la traducción; es decir, utilizan algunos codones con más frecuencia que otros en correlación con la abundancia de las moléculas de tRNA isoceptoras lo que conlleva a optimizar la eficiencia de la traducción; por lo que al generarse un codón de uso poco frecuente, podría influir en los niveles de expresión génica y disminuir la eficiencia de la traducción²⁸. Con respecto a los SNPs (c.3432G>T en el exón 4 o el c.3764C>T en el exón 5), se sabe que el procesamiento del RNA no está influenciado por los dos. Se ha encontrado que ni el plegamiento del RNA, ni los sitios de unión para complejos de ribonucleoproteínas involucrados en la maduración del mRNA están afectados por estos dos SNPs. Varios autores han indicado que las inserciones Alu pueden ser de relevancia funcional con respecto a la metilación del DNA en las islas CpG, transcripción génica y unión a factores de transcripción²⁹. Por lo tanto, la inserción Alu en el intrón G puede afectar la transcripción y maduración del pre-mRNA, mientras que en un estudio llevado a cabo por Agoulnik y colaboradores en el 2004 mediante caracterización funcional del receptor de progesterona mutado mostró que la sustitución del aminoácido p.V660L tiene una mayor actividad transcripcional comparado con el receptor de progesterona silvestre y que la mutación estabiliza a ambas isoformas²⁷. El mRNA maduro no contiene el intrón polimórfico G (con o sin el elemento Alu); sin embargo, el mRNA transcrito a partir del alelo *PROGINS* puede distinguirse del transcrito procedente del alelo silvestre porque todavía contiene los dos SNPs en el exón 4 y 5 que se encuentran en desequilibrio de ligamiento^{26,27}.

Existen varios estudios en la literatura, que han tratado de establecer una asociación entre SNPs en el gen *PGR* (específicamente el polimorfismo p.V660L) y el desarrollo de CaM. Sin embargo, los resultados derivados de dichos estudios difieren unos de otros y por lo tanto no son concluyentes. En algunos de estos estudios, como en el realizado por Spurdle y colaboradores en 2002, el cual consistió en un estudio

de casos y controles en mujeres australianas, no se encontró evidencia de un incremento en el riesgo para el desarrollo de CaM asociado con los genotipos GT o TT comparado con el genotipo común GG. Los OR (*odds ratio o razón de momios*) fueron 0.97 (IC 95%, 0.79–1.19) y 1.52 (IC 95%, 0.87–2.66), respectivamente ($p=0.8$ y 0.1)³⁰. De igual manera, Fabjani y colaboradores (2002), no encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de las portadoras del polimorfismo *PROGINS* (23.2%) y del grupo control (26.4%), lo cual indica que dicho polimorfismo no se encuentra asociado con aumento o disminución del riesgo de desarrollar este tipo de cáncer³¹. Asimismo, en 2008 Johnatty y colaboradores, publicaron un estudio en el que no observaron un aumento significativo para el riesgo de desarrollar CaM al comparar a las pacientes homocigotas para el alelo silvestre. Los OR de las pacientes heterocigotas para el alelo polimórfico y para las pacientes homocigotas para el alelo polimórfico fueron de 1.06 (IC 95%, 0.97–1.15) y de 1.05 (IC 95%, 0.75–1.49)³². Por su parte, en los Estados Unidos, Diergaarde y colaboradores (2008) condujeron un estudio de casos y controles en mujeres postmenopáusicas. Según sus resultados, ninguno de los polimorfismos estudiados, por sí mismo, estuvo asociado con el riesgo de padecer CaM; sin embargo, observaron una relación estadísticamente significativa ($p=0.01$) entre el polimorfismo p.V660L y el uso de estrógenos y progesterona, incluso en mujeres heterocigotas para dicho polimorfismo³³. Por otro lado, Romano y colaboradores en 2006, reportaron que la frecuencia de mujeres portadoras del alelo A2 era similar comparado con las mujeres controles (26.9% y 21.7%, respectivamente), pero no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre un grupo y otro³⁴.

En el año 2000, Wang-Gohrke y colaboradores realizaron un estudio de casos y controles en mujeres alemanas de edad igual o menor a 50 años. Ellos encontraron que el riesgo de cáncer de mama estaba disminuido en mujeres portadoras del alelo *PROGINS*. El OR ajustado por edad y región estudiada fue de 0.76 (IC 95%, 0.58 –1.00) para el alelo silvestre (homocigotas A1/A1); comparado con esto, el OR para heterocigotas A1/A2 y homocigotas A2/A2 para el alelo polimórfico fue de 0.82 (IC 95%, 0.62-1.08) y 0.27 (IC 95%, 0.10-0.74) respectivamente, sugiriendo un efecto dosis génica para el alelo A2³⁵.

De manera similar, en 2006, Pooley y colaboradores llevaron a cabo un estudio de casos y controles en mujeres del Reino Unido, buscando una probable asociación entre varios SNPs en el gen *PGR* y el riesgo de desarrollar CaM. Encontraron que sólo un SNP se encontraba significativamente asociado con un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de mama, el polimorfismo p.V660L. El OR para heterocigotos VL fue de 1.13 (IC 95%, 1.03-1.24) y para homocigotos LL el OR fue 1.30 (IC 95%, 0.98-1.73), con una $p=0.008$ y $p=0.002$, respectivamente³⁶. En India, Govindan y colaboradores realizaron un estudio en el 2007 donde observaron una frecuencia alélica del polimorfismo *PROGINS* de 14.6% en mujeres con cáncer de mama, comparado con 5.5% en mujeres sanas, indicando que el polimorfismo *PROGINS* está significativamente asociado al desarrollo de cáncer de mama (OR: 2.91, IC 95%: 1.14-7.43)³⁷.

Como se puede observar en lo mencionado anteriormente, hay mucha variabilidad en los resultados que se han publicado a la fecha con respecto a la asociación entre el polimorfismo p.V660L y el riesgo de desarrollar CaM. Es por eso, y debido a que dicho polimorfismo se presenta con una frecuencia elevada en otros estudios de asociación que fue considerado como relevante para la población mexicana, por la alta variabilidad genética que puede existir en nuestra población.

Diversos estudios han demostrado que aunado al propio riesgo que presenta cada polimorfismo por separado para el desarrollo de CaM el efecto aditivo de los mismos confiere un aumento en la significancia para desarrollar esta neoplasia de forma esporádica en varios grupos étnicos. Asimismo, cada polimorfismo puede presentar un comportamiento relativamente variable a través de las poblaciones estudiadas, ya que la interacción entre los genes y sus variantes polimórficas responden de forma ciertamente diversa para determinadas patologías en diferentes grupos étnicos^{15,18,19,38}.

La identificación y el entendimiento de los genes involucrados en el establecimiento y desarrollo del CaM, sus interacciones génicas, las alteraciones bioquímicas y genéticas resultan de trascendental importancia no sólo para la comprensión del proceso etiológico, sino también para comenzar a formular estrategias terapéuticas, pero principalmente preventivas que nos orillen a limitar cada vez más la progresión de la patología y la mortalidad ocasionada por la misma. En América Latina y en México, existen pocos estudios de asociación entre polimorfismos y CaM, algunos estudios sugieren únicamente la presencia de

ciertos polimorfismos en el cáncer de mama realizando una gran consideración al efecto aditivo y de interacción entre polimorfismos de genes implicados³⁹.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaM es el tumor maligno más frecuente en el mundo tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. En México, en el 2010, ocupó el primer lugar como causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas mayores de 35 años de edad, con una tasa de mortalidad del 17%³.

El estudio de las neoplasias se ha dificultado debido a la gran heterogeneidad histológica y clínica que presentan. La identificación y el entendimiento de los genes involucrados en el CaM, sus interacciones génicas, así como las alteraciones bioquímicas y genéticas resultan de trascendental importancia no sólo para la comprensión del proceso etiológico, sino también para comenzar a formular estrategias terapéuticas, pero principalmente preventivas que nos orillen a limitar cada vez más la progresión de la patología y la mortalidad ocasionada por la misma.

El conocimiento en el ámbito molecular de los cambios necesarios para el desarrollo del CaM de forma esporádica, es una de las áreas de mayor desarrollo en la investigación biomédica actual a nivel internacional debido al gran impacto que desde hace alrededor de tres décadas ha tenido en el mundo, presentando en México el mismo efecto de impacto, posicionándose como uno de los principales problemas de salud en nuestro país.

En México, no existen estudios de asociación entre el SNP p.V660L en el gen *PGR* y el CaM; a nivel mundial, existen algunos estudios que reportan asociación entre el ser portador del SNP ya mencionado, y un incremento en el riesgo para desarrollar este tipo de cáncer. Sin embargo, también existen diversos reportes en la literatura, aparentemente contradictorios, donde no se ha podido establecer dicha asociación. Por lo anterior, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la asociación entre el SNP p.V660L en el gen *PGR* y el diagnóstico de CaM de presentación esporádica en mujeres mexicanas?

III. JUSTIFICACIÓN

El CaM es un problema de salud a nivel nacional, por lo que su estudio es un tema prioritario de investigación en salud en nuestro país. Además, las pacientes con esta patología en su mayoría siguen un curso crónico debido a que no son diagnosticadas en etapas tempranas, lo que conlleva a una morbilidad y mortalidad elevadas.

El presente estudio de investigación, se orientó a la búsqueda una variante genética que al interactuar con el ambiente fuera capaz de incrementar el riesgo para el desarrollo de CaM. Aun cuando se conocen algunos genes y proteínas asociados a este cáncer con predisposición hereditaria, el origen y el desarrollo de las formas de presentación esporádica son poco conocidas y estudiadas en nuestro país. Por lo cual, el estudio que aquí planteamos tendrá un beneficio para la sociedad mexicana, ya que brindará información científica y generará conocimiento acerca del desarrollo del CaM en nuestra población, lo que en un futuro abrirá nuevos horizontes que brinden posibles alternativas tanto preventivas como de manejos terapéuticos específicos e individualizados. De forma secundaria, las conclusiones que nosotros obtuvimos también beneficiarán a la sociedad mundial, puesto que estaremos contribuyendo con información acerca de cambios polimórficos en relación con el CaM en nuestra población, lo cual podrá servir como un punto más de referencia y comparación con otras poblaciones a nivel internacional.

IV. HIPÓTESIS

1. El polimorfismo de nucleótido único p.V660L, en el gen *PGR*, se encontrará asociado con el diagnóstico de cáncer de mama de presentación esporádica en mujeres mexicanas.

V. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre el polimorfismo de nucleótido único p.V660L, en el gen *PGR*, y el diagnóstico de cáncer de mama de presentación esporádica en mujeres mexicanas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la frecuencia alélica del alelo silvestre y del alelo polimórfico (p.V660L) en mujeres mexicanas.
2. Identificar la frecuencia genotípica de la forma homocigota para el alelo silvestre; la forma heterocigota para alelo silvestre/alelo polimórfico, y la forma homocigota para el alelo polimórfico (p.V660L) en mujeres mexicanas.
3. Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre mujeres con cáncer de mama y mujeres sin cáncer.

VI. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO:

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana (UIMGH), perteneciente a la UMAE Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los hospitales de donde se obtuvieron las pacientes (Hospital de Gineco Obstetricia No.4 “Dr. Luis Castelazo Ayala”, UMAE Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI y Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social) son centros de atención hospitalaria de tercer nivel que atienden población principalmente del Distrito Federal y el estado de México, así como pacientes foráneos de los estados de Guerrero, Chiapas, Morelos y Oaxaca, mismos que son referidos de sus hospitales generales de zona (segundo nivel de atención).

2. DISEÑO

Casos y controles.

2.1 TIPO DE ESTUDIO

- A) Por el control de la maniobra experimental por el investigador: Observacional
- B) Por la captación de la información: Prolectivo
- C) Por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal
- D) Por la presencia de un grupo control: Comparativo
- E) Por la dirección del análisis: Estudio de casos y controles

2.2 GRUPOS DE ESTUDIO

- A. **CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS:** Mujeres de edad igual o mayor a 35 años con diagnóstico de cáncer de mama esporádico, en cualquier estadio, confirmado mediante reporte histopatológico.

B. CARACTERÍSTICAS DE LOS CONTROLES: Mujeres de edad igual o mayor a 35 años sin diagnóstico de cáncer de mama al momento de su inclusión en el estudio, con mastografía sin evidencia de lesiones sospechosas de malignidad o con estudio sin datos de malignidad.

A) CRITERIOS DE SELECCIÓN

a. Criterios de inclusión

1. Mujeres 35 años o más de edad, con diagnóstico de cáncer de mama (cualquier estadio de progresión) de presentación esporádica confirmado mediante estudio histopatológico.
2. Mujeres mayores de 35 años de edad, controles voluntarias.
3. Que tengan al menos 3 generaciones previas en México.
4. Que acepten ingresar al estudio mediante firma de la carta de consentimiento informado.

b. Criterios de exclusión

1. Mujeres con antecedentes de cáncer de mama en dos generaciones familiares previas o posteriores a ella.
2. Mujeres con antecedente de síndromes de cáncer familiar (síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, síndrome de Li- Fraumeni, síndrome de Lynch, síndrome de Cowden, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario, Ataxia-telangiectasia).

c. Criterios de eliminación

1. Mujeres en las cuales la extracción de DNA no sea suficiente para llevar a cabo el estudio molecular.

2.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Muestreo no probabilístico consecutivo de las pacientes que acudieron a la consulta externa de cáncer de mama del Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala” del IMSS y mujeres control procedentes de la Unidad de

Investigación Médica en Endocrinología, Diabetes y Metabolismo, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, y que cumplieron los criterios de inclusión.

Debido a que no se conoce en la población mexicana la frecuencia alélica del polimorfismo de nucleótido único a estudiar, se estimó de forma conveniente con base en los reportes internacionales para estudios de asociación con polimorfismos de nucleótido único una muestra de 100 pacientes con cáncer de mama de presentación esporádica y 100 mujeres controles voluntarias. Es necesario comentar, que este estudio se continuará hasta completar un tamaño de muestra mayor.

2.4 DEFINICIÓN DE LA VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medición
Variable dependiente					
Cáncer de mama	Enfermedad neoplásica maligna del tejido de la mama.	Enfermedad neoplásica maligna del tejido de la mama, diagnosticada mediante estudio histopatológico llevado a cabo por el servicio de Patología del hospital respectivo en el que se atendió a la paciente.	Cualitativa	Nominal, dicotómica	Presente/Ausente
Variables independientes					
Polimorfismo de nucleótido único (SNP) p.V660L en el gen PGR	Variación en la secuencia genómica que involucra a un solo nucleótido y que presenta una frecuencia de más de 1% de la población en estudio (población mexicana) sin que dicha variación genere un fenotipo patológico específico e invariable.	Variación en la secuencia del gen <i>PGR</i> que involucra el cambio de una timina por guanina en la posición 3432 del gen (c.3432G>T) que lleva a un cambio de leucina por valina en el aminoácido 660 de la proteína (p.V660L).	Cualitativa	Nominal, politómica	GG (Homocigoto para el alelo silvestre) GT (Heterocigoto para el alelo polimórfico) TT (Homocigoto para el alelo polimórfico)
Tabaquismo	Consumo de tabaco de forma habitual.	Número de paquetes-año de cigarrillos.	Cuantitativa	Numérica continua	Número de Paquetes-año

Menarca	Se refiere a la primera menstruación en una mujer.	Edad de inicio de la menarca.	Cuantitativa	Numérica discreta	Número de años (edad)
Paridad	Que la paciente haya cursado por lo menos con un embarazo.	Número de veces en que la paciente estuvo embarazada.	Cuantitativa	Numérica discreta	Número de embarazos.
Tiempo de uso de anticonceptivos	Periodo en el cual una paciente usó algún método anticonceptivo hormonal.	Número de años que la paciente utilizó algún método anticonceptivo hormonal.	Cuantitativa	Numérica continua	Número de años
Lactancia	Otorgar alimentación al lactante con leche materna.	Número de meses total que la paciente otorgó lactancia materna al conjuntar todos sus embarazos.	Cuantitativa	Numérica continua	Número de meses
Índice de masa corporal	Medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo.	Medida que se obtiene de dividir el peso de un individuo entre la talla elevada al cuadrado.	Cuantitativa	Numérica discreta	Kg/m^2
Terapia de reemplazo hormonal	Tratamiento hormonal utilizado para aliviar síntomas por menopausia quirúrgica, perimenopausia y menopausia.	Que la paciente haya llevado tratamiento o terapia de reemplazo hormonal.	Cualitativa	Nominal dicotómica	Sí/No
Tiempo de uso TRH	Tiempo durante el cual se utiliza el tratamiento hormonal para aliviar síntomas por menopausia quirúrgica, perimenopausia y menopausia.	Periodo de tiempo durante el cual la paciente llevó tratamiento o terapia de reemplazo hormonal.	Cuantitativa	Numérica continua	Número de años

2.5 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana de la UMAE Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, en colaboración con el Hospital de Oncología del mismo

complejo hospitalario, así como con el Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 “Dr. Luis Castelazo Ayala” y el Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI, también del IMSS.

En las citas subsecuentes de la consulta externa de las clínicas de Cáncer de Mama de los dos primeros hospitales antes mencionados, se explicó detalladamente el protocolo de estudio a las pacientes con diagnóstico reciente de cáncer de mama, confirmado mediante estudio histopatológico de biopsia de la tumoración mamaria por parte del Servicio de Patología del Hospital respectivo, y posterior a la firma de consentimiento informado, se les aplicó un cuestionario en el cual se recabaron datos sociodemográficos, antecedentes heredofamiliares, antecedentes ginecoobstétricos y sobre su padecimiento actual. Se revisó el expediente clínico de dichas pacientes para obtener el estadio clínico de acuerdo a la clasificación TNM, el tipo de tumor, el grado histológico y el estado de los receptores hormonales y HER2 (obtenidos mediante inmunohistoquímica llevada a cabo por el Servicio de Patología del hospital correspondiente). Todo lo anteriormente mencionado con respecto a la obtención de las muestras tumorales y la aplicación del cuestionario, se llevó a cabo en colaboración con la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, la cual forma parte también del Hospital de Pediatría “Silvestre Frenk Freund” de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

En el caso del grupo control, se invitó a participar a mujeres sin cáncer de mama, que contaban por lo menos con mastografía reciente en la que no se observaron lesiones sospechosas de malignidad. Cuando el estudio de mastografía no fue suficiente para descartar alguna lesión como sospechosa de malignidad, se realizó a las mujeres estudios complementarios como ultrasonido de mama o tomografía axial computarizada como parte del abordaje diagnóstico. Dichas mujeres sin cáncer de mama, fueron procedentes de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI, donde habían formado parte de un protocolo sobre densidad mamaria llevado a cabo en esa unidad. A dichas pacientes, posterior a firma de carta de consentimiento informado, también se les aplicó un cuestionario para recabar datos sociodemográficos, antecedentes heredofamiliares y antecedentes ginecoobstétricos.

Una vez llenado el cuestionario, se procedió a tomar a cada paciente una muestra de 5 ml de sangre periférica utilizando tubos Vacutainer™ con EDTA, con la cual se realizó extracción de DNA de leucocitos y posteriormente se realizó PCR en tiempo real para la búsqueda del SNP p.V660L del gen *PGR*. Este mismo procedimiento se siguió tanto para las pacientes del grupo control como para los casos.

Transporte y resguardo de las muestras.

Para el traslado de las muestras de sangre periférica desde las Unidades Médicas al laboratorio, se almacenó el tubo con sangre en refrigerantes portátiles a una temperatura de 4°C y finalmente se resguardó en el laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica del Hospital de Pediatría, de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, CMN SXXI en un refrigerador con temperatura de 4°C hasta el momento de realizar la extracción de DNA.

Obtención de DNA.

Antes de llevar a cabo la extracción de DNA a partir de sangre periférica, primero se realizó lavado de leucocitos. Para esto, se centrifugó la muestra de sangre a 2500xg por 15 minutos para separar el plasma, los leucocitos y los eritrocitos. Con una pipeta Pasteur se tomó la capa de leucocitos y se pasó a un tubo de ensayo, al cual posteriormente se le adicionó solución para lisis de glóbulos rojos (RBCL), se agitó y se centrifugó a 2500xg durante 7 minutos, siendo desechado el sobrenadante. Estos pasos se repitieron hasta obtener un botón de leucocitos lo más limpio posible. Una vez hecho esto, se agregaron 118 µl de NaCl 5mM (solución salina al 0.9%), se resuspendió el botón de leucocitos y con una pipeta Pasteur se transfirió todo el contenido del tubo de ensayo a un tubo de 1.5 ml.

Para la extracción de DNA, se agregaron 61.3 µl de SDS al 10%, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se agregaron 410.6 µl de NaCl saturado, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente 5 minutos. Se agitó durante 1 minuto para terminar de disolver completamente. Se centrifugó durante 15 minutos a 15,000xg. Una vez hecho lo anterior, se recuperó el sobrenadante y se

eliminó el precipitado (proteínas). Al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de etanol para precipitar el DNA y se dejó a -70°C durante 5 minutos, agitando gentilmente para compactar el precipitado. Se lavó el DNA con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó por 10 minutos a $15,000\times g$, repitiéndolo hasta 4 veces. Finalmente, se agregó al DNA genómico 100 μl de agua inyectable y se resuspendió suavemente durante 1 minuto. Se verificaron las concentraciones e integridad de las muestras de DNA, mediante espectrofotometría (*Nanodrop1000, ThermoScientific*) y electroforesis en geles de agarosa al 2%. Las muestras de DNA se almacenaron a -70°C , hasta su uso.

Genotipificación.

La determinación del SNP se realizó en el DNA genómico mediante PCR en tiempo real (*StepOne™ Real-Time PCR System, AppliedBiosystems*). Mediante este sistema se realizó un ensayo de discriminación alélica, el cual es un ensayo que utiliza más de una sonda/oligonucleótido por reacción y es de punto final (los datos son recolectados al final del proceso de PCR), que detecta variantes en una secuencia de nucleótidos. La presencia de dos oligonucleótidos/sondas en una reacción, permite genotipificar las dos posibles variantes de un SNP en una determinada secuencia. Por cada muestra en un ensayo de discriminación alélica, se utiliza un par de detectores fluorescentes. Uno de ellos es complementario del alelo silvestre (alelo 1) y el otro es complementario del alelo polimórfico (alelo 2). Esto permite detectar estado homocigoto (muestras que sólo tienen alelo 1 o sólo alelo 2) y estado heterocigoto (muestras que tienen tanto alelo 1 como alelo 2).

Para la realización del ensayo de discriminación alélica, se utilizó una sonda Taqman® para genotipificación de SNPs (*AppliedBiosystems*). Específicamente, se trabajó con una sonda ya prediseñada por la casa comercial antes mencionada, con número de identificación rs1042838 y con la siguiente secuencia contexto [VIC/FAM]:

GCTTGGCTTTCATTTGGAACGCCCA[A/C]TGGCTGTGGGAGAGCAACAGCATCC

Para la mezcla de reacción, se utilizaron 12.5 μl por reacción de *2xTaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase No UNG*, 1.25 ml por reacción de *20x SNP Genotyping Assay Mix* y 5ng de DNA genómico

diluidos en un volumen de 11.25 µl de agua libre de nucleasas. Todas las muestras se corrieron por duplicado, incluido el control negativo. Para la PCR en tiempo real, se utilizaron las siguientes condiciones:

Tiempos y temperaturas		
Paso inicial	PCR (cada uno de los 40 ciclos)	
Activación de AmpliTaq Gold® DNA polimerasa	Desnaturalización	Alineamiento/extensión
Mantener	Ciclo	
10 minutos a 95°C	15 segundos a 92°C	1 minuto a 60°C

En cada ensayo, se obtuvo una gráfica de discriminación alélica en la cual se observa una distribución específica de las muestras, de acuerdo al genotipo que el programa del equipo les había asignado. Dicha asignación, se corroboró manualmente al observar en la gráfica de amplificación las señales de fluorescencia emitidas. En la Figura 2 se muestra un ejemplo de la distribución que se debe observar en una gráfica de discriminación alélica.

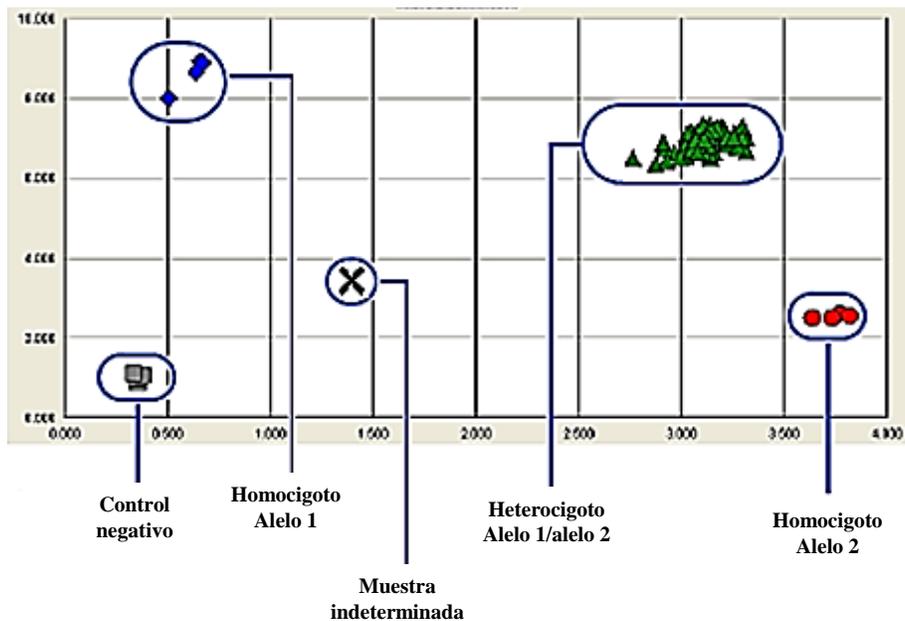


Figura 2. Gráfica de discriminación alélica. Se observa en la imagen la agrupación de los resultados dependiendo del estado homocigoto o heterocigoto de las muestras y el alelo correspondiente. En cuadro gris están representados los controles negativos, los rombos azules corresponden a las muestras heterocigotas para el alelo 1 o silvestre, en triángulos verdes se observan las muestras heterocigotas y en círculos rojos las muestras homocigotas al alelo 2 o polimórfico. Cuando una muestra no logra ser catalogada por el equipo en alguno de los grupos antes mencionados, queda representada como una X o muestra indeterminada.

Para conjuntar cada uno de los ensayos llevados a cabo en un mismo análisis, se utilizó el software *TaqManGenotyper*, *AppliedBiosystems*, el cual permite observar en una misma gráfica de discriminación alélica los experimentos de genotipificación realizados individualmente y realiza cálculo de frecuencias alélicas y genotípicas.

2.6 ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó un análisis estadístico descriptivo con frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas, y para las variables cuantitativas se aplicaron medidas de tendencia central (media o mediana) y dispersión (desviación estándar o mínimos y máximos). Las variables cuantitativas edad, tiempo de tabaquismo y tiempo de lactancia fueron convertidas a variables cualitativas, nominales dicotómicas para el análisis de datos. Las pacientes quedaron agrupadas por edad igual o menor a 50 años y edad mayor a 50 años, para la variable edad; por tiempo de tabaquismo igual o menor a 20 años y tabaquismo durante más de 20 años y por tiempo de lactancia total durante menos de 12 meses y tiempo de lactancia durante 12 meses o más. Para evaluar la asociación entre la presencia del polimorfismo del gen *PGR* (p.V660L) y el riesgo para desarrollar CaM esporádico, se realizó una prueba de chi cuadrada. Para evaluar la asociación entre las otras variables cualitativas y el riesgo para desarrollar este tipo de cáncer se utilizó prueba de chi cuadrada o prueba exacta de Fisher, en los casos en que alguna de las casillas de la tabla de 2x2 contuviera un número menor a 5. La fuerza de asociación entre las variables, se estimó mediante la razón de momios con intervalos de confianza del 95%. Para la comparación de medias, entre las variables cuantitativas con distribución normal, se utilizó la prueba de T de Student; para las variables cuantitativas, con distribución libre, se compararon las medianas mediante la prueba de U de Mann Whitney. Con el objeto de determinar el impacto de cada una de las variables sobre la presencia de CaM esporádico, se utilizó un modelo de regresión logística con el método de Wald, utilizando como variable dependiente la presencia de CaM esporádico y como variables independientes el polimorfismo del *PGR*, y obesidad, el uso de anticonceptivos, la terapia de reemplazo hormonal y el tabaquismo. Se consideró un valor significativo de p menor o igual a 0.05. El análisis se llevó a cabo mediante el paquete estadístico SPSS 22.0 (IBM®).

VIII. ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación el presente estudio presenta un riesgo mínimo ya que solo se tomó una muestra de sangre periférica correspondiente a 5 ml en una sola ocasión a cada sujeto del estudio. Así mismo, la biopsia de tumoración mamaria utilizada para el estudio histopatológico forma parte del abordaje diagnóstico de pacientes con sospecha de cáncer de mama. Además, los procedimientos de este estudio se apegaron a las normas éticas vigentes en materia de investigación en seres humanos y específicamente con respecto al genoma humano descrito en el título quinto bis, artículo 103 bis de la Ley General de Salud en el que se señala que todo estudio sobre el genoma humano deberá contar con la aceptación expresa de la persona sujeta al mismo.

Debido a lo anterior, para ingresar al estudio las pacientes tuvieron que haber firmado una carta de consentimiento informado, una vez que refirieron haber entendido en qué consistiría su participación y de haberseles explicado que con los resultados de este estudio no existiría un beneficio inmediato en el manejo y/o tratamiento de las pacientes con cáncer de mama ni en las mujeres controles voluntarias sanas, sino que el impacto se vería a nivel social puesto que se generaría conocimiento acerca de la patología neoplásica de la mama en nuestro país al contar con conclusiones que ayuden a entender más los aspectos genéticos y/o genómicos que se relacionan con el desarrollo del cáncer de mama en mujeres mexicanas, repercutiendo en el avance del conocimiento en genética para los seres humanos de forma global y de forma particular para nuestra población. Se incluye la carta de consentimiento informado en los anexos del presente documento.

Para garantizar la confidencialidad de la información se asignó un número progresivo a cada muestra recibida, con lo cual los datos de cada paciente quedaron únicamente registrados en la carta de consentimiento informado y en la hoja de recolección de datos mismas que fueron resguardadas por el titular del proyecto de investigación.

El presente estudio cuenta con la aprobación de la Comisión de Ética y Comisión Nacional de Investigación Científica, con número de registro: R-2011-785-066 y financiamiento como proyecto prioritario con número: FIS/IMSS/PROT/PRIO/12/20.

IX. RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 101 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama esporádico (casos) y 99 mujeres controles sanas. La edad promedio de los casos fue de 57.9 años (± 11.02), mientras que para el grupo control la edad promedio fue de 49.1 (± 7.61).

Resultó que 73 pacientes (72.3%) del grupo de estudio y 74 mujeres (74.7%) del grupo control tenían antecedente personal de tabaquismo, con un tiempo de tabaquismo de 24.1 (± 14.57) años para los casos y 23.79 (± 8.63) años para los controles.

En cuanto al peso, las mujeres del grupo control tuvieron un peso promedio de 67.6 (± 12.98) kilogramos, mientras que las pacientes con cáncer de mama tuvieron un peso promedio de 68.8 (± 10.01) kilogramos, con un índice de masa corporal de 29.0 (± 5.72) kg/m² y de 28.3 (± 4.46) kg/m², respectivamente. Con respecto al grado de obesidad, en el grupo de estudio 17 (16.8%) mujeres tuvieron peso normal, 52 (51.5%) tuvieron sobrepeso y 32 (31.7%), obesidad. En el grupo control, 18 (18.2%) tuvieron peso normal, 40 (40.4%) presentaban sobrepeso y 41 (41.4%) tenía obesidad.

Con respecto a los antecedentes ginecoobstétricos, las pacientes en el grupo de estudio tuvieron una edad promedio de 13.6 (± 8.77) años al momento de la menarca y las mujeres del grupo control, una edad promedio de 12.3 (± 1.56) años. En relación al número de gestas, las mujeres de ambos grupos tuvieron una mediana de 3 embarazos. El 78.8% de las mujeres del grupo control dieron lactancia materna, comparado con el 74.3% de los casos, con un tiempo de lactancia de 15.4 (± 19.06) meses y 6.4 (± 6.23) meses, respectivamente. El 35.6% de las mujeres del grupo de estudio refirió haber utilizado anticonceptivos hormonales comparado con el 38.4% de las mujeres del grupo control, con un tiempo de uso de anticonceptivos de 19.7 (± 39.51) meses y de 14.63 (± 32.88) meses, respectivamente.

En relación al estado menopáusico, en el grupo control 39.4% de las mujeres estaban en la premenopausia, 12.1% en la perimenopausia y 48.5% en la postmenopausia. Por su parte, 13.9% de las mujeres del grupo de casos se encontraban en la premenopausia, 32.7% en la perimenopausia y 31.7% en la postmenopausia.

El 10.9% de las mujeres del grupo de estudio refirió haber utilizado terapia de reemplazo hormonal comparado con el 26.3% de las pacientes del grupo control (Tabla 1).

Tabla 1. Variables demográficas y ginecoobstétricas.

	Casos n=101*	Controles n=99*	Valor de p	OR	IC (95%)
Edad	57.9 (DE=11.02)	49.1 (DE=7.61)	p<0.0001 **	-----	-----
Tabaquismo ☒					
Positivo	28 (27.7%)	25 (25.3%)	p=0.692	1.13	0.60-2.12
Negativo	73 (72.3%)	74 (74.7%)			
Tiempo de tabaquismo (en años)	24.1 (DE=14.57)	3.79 (DE=8.63)	p<0.0001 **	-----	-----
Peso	68.8 (DE=10.01)	67.6 (DE=12.98)	p=0.477	-----	-----
Índice de masa corporal	28.3 (DE=4.46)	29.0 (DE=5.72)	p=0.306	-----	-----
Obesidad ☒					
Peso normal	17 (16.8%)	18 (18.2%)	p=0.421	1.37	0.63-3.00
Sobrepeso	52 (51.5%)	40 (40.4%)			
Obesidad grado I	25 (24.7%)	29 (29.3%)	p=0.643	0.82	0.36-1.85
Obesidad grado II	5 (5.0%)	9 (9.1%)			
Obesidad mórbida	2 (2.0%)	3 (3.0%)			
Menarca (en años)	13.6 (DE=8.77)	12.3 (DE=1.56)	p=0.023**	-----	-----
Número de gestas	\tilde{x} = 3 (0-15)	\tilde{x} = 3 (0-10)	p=0.305	-----	-----
Lactancia ☒					
Positivo	75 (74.3%)	78 (78.8%)	p=0.450	0.77	0.40-1.49
Negativo	26 (25.7%)	21 (21.2%)			
Tiempo de lactancia (en meses)	6.4 (DE=6.23)	15.4 (DE=19.06)	p=0.025**	-----	-----
Uso de Anticonceptivos ☒					
Positivo	36 (35.6%)	38 (38.4%)	p=0.686	0.88	0.49-1.58
Negativo	64 (64.4%)	61 (61.6%)			
Tiempo de uso de anticonceptivos (en meses)	19.7 (DE=39.51)	14.63 (DE=32.88)	p=0.436	-----	-----
Estado menopáusico ☒					
Premenopausia	14 (13.9%) °	39 (39.4%)	p=0.0001**	-----	-----
Perimenopausia	33 (32.7%) °	12 (12.1%)			
Postmenopausia	32 (31.7%) °	48 (48.5%)			
Uso de terapia de reemplazo hormonal ☒					
Positivo	11 (10.9%)	26 (26.3%)	p=0.005**	0.33	0.15-0.73
Negativo	90 (89.1%)	73 (73.7%)			

*Se muestran las medias (\bar{x}) de las variables a las que se hace referencia, excepto en donde está indicado con el símbolo \tilde{x} que el valor que se muestra es la mediana con sus respectivos mínimos y máximos, y señalado con el símbolo ☒ las variables de tipo cualitativo para las cuales se muestra la frecuencia y entre paréntesis sus porcentajes.

DE: desviación estándar.

° En base a una n=79.

** Se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a estas variables, debido a que tienen una p<0.05.

† Se agruparon los grados de obesidad para el análisis respectivo.

Con el objetivo de determinar si los grupos eran homogéneos se compararon sus características, encontrando que había diferencia estadísticamente significativa entre la media de edad de los casos (57.9 años \pm 11.02) comparado con los controles (49.1 \pm 7.61) ($p < 0.0001$). Agrupando a las pacientes con CaM y a las mujeres del grupo control por edad de 35 a 50 años y en mayores de 50 años, se encontró que el tener una edad mayor a 50 años se asocia a un riesgo aumentado para el desarrollo de este tipo de cáncer (OR=4.79, IC 95%: 2.628-8.753; $p < 0.0001$).

De igual forma, se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar el número de años de tabaquismo de las mujeres del grupo de estudio con el tiempo de tabaquismo de las mujeres del grupo control ($p < 0.0001$), estableciéndose una asociación entre un tiempo de tabaquismo mayor a 20 años y riesgo incrementado para el desarrollo de CaM (OR=11.41, IC 95%: 4.153-31.351). Con respecto a la edad de la menarca se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar las medias del grupo de pacientes con CaM (13.6 años \pm 8.77) contra el grupo control (12.3 años \pm 1.56) con una $p = 0.023$. Sin embargo, al agrupar a las pacientes por edad de menarca de menor a 12 años y edad mayor o igual a 12 años, no se pudo establecer asociación entre la edad de inicio de la menarca y el riesgo de desarrollar CaM (OR=0.715, IC 95%: 0.406-1.258; $p = 0.244$). Al comparar las medias entre los casos y el grupo control en relación al tiempo de lactancia, se observó diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.025$) entre éstas; al agrupar a las pacientes por el tiempo de lactancia en meses, resultó que el dar lactancia durante 12 meses o más es un factor protector para el desarrollo de este tipo de cáncer (OR=0.208, IC 95%: 0.114-0.380; $p = 0.0001$). También se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar el estado menopáusico ($p = 0.0001$) y el uso de terapia de reemplazo hormonal ($p = 0.005$) entre el grupo de casos y el de controles (Tabla 1).

En la tabla 2 se muestran las características histopatológicas e inmunohistoquímicas de los tumores de mama, de lo cual lo más relevante es que el 73.3% de las pacientes con cáncer de mama esporádico presentó el tipo ductal infiltrante, que el 75% de los tumores de mama fueron moderadamente diferenciados (Grado 2) de acuerdo a la escala de Scarff-Bloom-Richardson modificada y que el 33% de las pacientes se encontraba en un estadio clínico IIA. Con base en los receptores hormonales y HER2

Tabla 2. Características histopatológicas e inmunohistoquímicas de los tumores de mama

	Casos n=101
Tipo de cáncer de mama	
Ductal <i>in situ</i>	7 (6.9%)
Ductal infiltrante	74 (73.3%)
Mucinoso	1 (1.0%)
Lobulillar	6 (5.9%)
Mixto (ductal y lobulillar infiltrante)	8 (7.9%)
Papilar	2 (2.0%)
Mixto (ductal infiltrante y micropapilar)	1 (1%)
Phylloides	1 (1%)
Mixto (ductal y mucinoso)	1(1%)
Clasificación Scarff-Bloom-Richardson modificada (SBR) *	
Bien diferenciados (grado 1)	3 (9.4%)
Moderadamente diferenciados (grado 2)	24 (75.0%)
Poco diferenciados (grado 3)	5 (15.6%)
Estadio clínico **	
EC 0	3 (6.25%)
EC IA	8 (16.6%)
EC IB	1 (2.1%)
EC IIA	16 (33.3%)
EC IIB	10 (20.9%)
EC IIIA	4 (8.3%)
EC IIIB	3 (6.25%)
EC IIIC	2 (4.2%)
EC IV	1 (2.1%)
Clasificación subtipo moleculares (basado en inmunohistoquímica)	

Luminal A/B (RE+, RP+, Her2-)	34 (75.5%)
Basal (triple negativo) (RE-, RP-, Her2-)	3 (6.7%)
Her2 neu (RE- o bajo, RP- o bajo, Her2+)	8 (17.8%)

*Para esta variable, se consideró una n=32; **Considerando una n=48 para esta variable;***Considerando una n=45 para esta variable.

Tabla 3. Polimorfismo p.V660L de PGR

	Casos n=101	Controles n=99	Valor de p	OR
Frecuencias genotípicas				
Homocigoto TT	2 (2.0%)	2 (2.0%)	p=0.97	OR=1.02 IC 95%: (0.14-7.49)
Heterocigoto GT	27 (26.7%)	23 (23.2%)	p=0.56	OR=1.20 IC 95%: (0.63-2.29)
Homocigoto GG	72 (71.3%)	74 (74.7%)		
Frecuencias alélicas				
Frecuencia alélica T *	31 (15.35%)	27 (13.63%)	p=0.62	OR=1.14 IC 95%: (0.65-2.00)
Frecuencia alélica G *	171 (84.65%)	171 (86.34%)		

**Las frecuencias alélicas están en base a 2n de los casos y de los controles, respectivamente.

obtenidos del expediente clínico, se subclasificó molecularmente los tumores encontrando que el 75.5% correspondió al subtipo Luminal A o B (RE+, RP+, HER2-), el 17.8% a HER2 enriquecido (RE- o bajo, RP- o bajo, HER2+) y el 6.7% al subtipo basal o triple negativo (RE-, RP-, HER2-).

Con respecto al polimorfismo p.V660L del gen *PGR*, se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas referidas en la tabla 3. Nuestros datos indican que no hay diferencia estadísticamente significativa al comparar las frecuencias genotípicas de las pacientes heterocigotas entre el grupo de estudio (27; 26.7%) y el grupo control (23; 23.2%) y tampoco en las homocigotas al alelo silvestre o genotipo GG, siendo de 71.3% para los casos y 74.7% para los controles (p=0.56). Tampoco se observaron diferencias al comparar las frecuencias genotípicas de las pacientes homocigotas al alelo polimórfico o genotipo TT (2% tanto para los casos como para los controles) y quienes fueron homocigotas al alelo silvestre (p=0.97), por lo que no se pudo establecer una asociación entre el polimorfismo p.V660L y riesgo incrementado para desarrollar CaM esporádico.

Con el objeto de determinar el impacto de cada una de las variables sobre la presencia de CaM esporádico, se realizó un análisis multivariado (Tabla 4), en el cual la edad mayor a 50 años y el tiempo de tabaquismo mayor a 20 años se mantuvieron asociados con el riesgo de desarrollar CaM esporádico con valores de OR de 17.43 (IC 95%: 2.71-112.11; p=0.003) y OR de 9.63 (IC 95%: 2.55-36.38; p=0.001), respectivamente; mientras que la lactancia durante 12 meses o más se encontró asociada como factor protector con un valor de OR de 0.95 IC 95%: 0.91-0.99; p=0.03).

Tabla 4. Resultados posteriores a regresión logística múltiple

	Valor de p	OR	IC 95%
Edad mayor a 50 años	0.003	17.43	2.71-112.11
Tiempo de tabaquismo >20 años	0.001	9.63	2.55-36.38
Lactancia durante 12 meses o más	0.03	0.95	0.91-0.99

Sólo se incluyen las variables que mantuvieron significancia estadística y cuyos intervalos de confianza no pasan por la unidad.

De forma adicional, se realizó prueba de Fisher para buscar asociación entre el ser portador del alelo polimórfico y expresión a la alta del receptor de estrógenos, receptor de progesterona y HER2, encontrando únicamente asociación entre tener el genotipo GT y expresión a la alta de HER2 ($p=0.04$; OR:6.22, IC 95%: 1.09-35.35). Al comparar el genotipo de las pacientes con los subgrupos moleculares del CaM, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre tener genotipo GT y presentar el tipo Luminal, comparado con tener el genotipo GG ($p=0.05$), con un OR de 4.45 (IC 95%:1.04-19.01); por lo que tener el genotipo GT resultó ser un factor de riesgo para no presentar el tipo Luminal. De igual forma encontramos que tener el genotipo GT es un factor de riesgo para presentar el subgrupo molecular HER2 sobreexpresado ($p=0.05$; OR:5.71, IC 95%:1.03-31.53).

X. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el polimorfismo p.V660L en el gen *PGR* y su asociación con el cáncer de mama esporádico. Molecularmente se ha podido demostrar que esta sustitución de aminoácido en el exón 4 de este gen le confiere una mayor estabilidad a las isoformas A y B del receptor de progesterona y una mayor actividad transcripcional, lo que implica que actuaría de forma más eficiente sobre sus genes blanco, los cuales están a su vez implicados en proliferación celular. Un ejemplo de esto, sería la interacción del receptor de progesterona con la proteína c-SRC, la cual es una cinasa de tirosina que una vez activada, inicia la cascada de la vía MAPK/ERK (Proteína cinasa activada por mitógenos) implicada no sólo en proliferación y crecimiento celular, sino también en la diferenciación y supervivencia celular. Adicionalmente, dado que este polimorfismo en el exón 4 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo de nucleótido único en el exón5 (p.H770H) que resulta en una mutación silenciosa y una inserción Alu en el intrón G, es necesario considerar que las consecuencias funcionales de estas otras alteraciones, al estar siempre en conjunto, influirían también en el fenotipo. Con respecto a la mutación silenciosa, no se conoce exactamente por qué, pero se ha visto que algunos codones son utilizados con más frecuencia que otros dependiendo de la abundancia de las moléculas de tRNA isoceptoras, permitiendo optimizar la eficiencia de la traducción; por lo que al producirse un polimorfismo que genere un codón de uso poco frecuente, podría afectarse la traducción. Además, la inserciones Alu se ha indicado que son de relevancia funcional en la metilación del DNA en las islas CpG, la transcripción y maduración del pre-Mrna. Esta inserción Alu en el intrón G, específicamente se ha reportado que incrementa la estabilidad de mRNA y la cantidad de proteína, así como la actividad transcripcional. Dichos efectos se verían añadidos a los ya mencionados previamente en relación al polimorfismo p.V660L, lo cual sustentaría que la presencia del polimorfismo y las otras alteraciones estuvieran asociadas con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama; sin embargo, esta asociación no pudo ser demostrada en nuestro estudio.

En cuanto a las frecuencias alélicas, en el presente estudio encontramos tanto frecuencias alélicas para el alelo polimórfico (T), como frecuencias alélicas para el alelo silvestre (G), en el grupo control y el grupo de estudio similares a las reportadas por Wang-Gohrke y colaboradores ³⁵; sin embargo, ellos sí encontraron una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias alélicas para el alelo polimórfico entre sus grupos, lo cual no se observó en nuestro estudio. Lo anterior puede deberse a que ellos tuvieron una muestra de mayor tamaño que les permitió observar dicha diferencia estadística. Al comparar nuestros resultados con los reportados en la población de la India, por Govindan y colaboradores ³⁷, encontramos que difieren bastante, ya que ellos reportan frecuencias alélicas más altas para el alelo polimórfico (T) para sus pacientes con cáncer de mama en comparación con el grupo control. Estas diferencias creemos que pueden ir en relación al diferente origen étnico de las pacientes incluidas en los dos estudios.

Con respecto a las frecuencias genotípicas que nosotros reportamos (tabla 3), observamos que son muy parecidas a las reportadas en varios estudios llevados a cabo en población caucásica; sin embargo, al comparar nuestros resultados con los de Govindan y colaboradores, cuyo estudio fue realizado en la India³⁷, encontramos que ellos tienen una frecuencia genotípica más elevada tanto en su grupo de pacientes con CaM y como en el grupo control con respecto al genotipo GG. Para el genotipo heterocigoto (GT) ellos reportan frecuencias genotípicas más bajas tanto en su grupo de estudio como en el grupo control, en comparación con nuestros resultados. Para el genotipo TT nosotros encontramos una frecuencia de 2% tanto en los casos como en los controles, mientras que Govindan y colaboradores no encontraron este genotipo en sus pacientes. Al igual que las diferencias observadas en las frecuencias alélicas, consideramos que las diferencias observadas entre nuestro estudio y el de Govindan y colaboradores con respecto a las frecuencias genotípicas puede estar explicado por el diferente origen étnico de las poblaciones estudiadas.

En relación a las características antropométricas y ginecoobstétricas de las pacientes incluidas en nuestro estudio, nosotros encontramos que la edad mayor a 50 años y el tiempo de tabaquismo mayor a 20 años, se encuentran asociados a un riesgo incrementado para el desarrollo de CaM. Las pacientes en el grupo de

estudio y los controles fueron agrupadas en esos rangos de edad con la finalidad de comparar nuestros resultados con los de otros autores, como el llevado por Wang-Gorhke y cols. en el que encontraron que ser portador del polimorfismo confería protección para el desarrollo de cáncer de mama en mujeres menores de 50 años de edad; aunque nosotros no encontramos diferencia significativa entre el grupo de estudio y el grupo control con respecto al polimorfismo p.V660L, si encontramos diferencia estadísticamente significativa entre la edad de las pacientes y riesgo para desarrollar cáncer de mama.

Sin embargo, es necesario mencionar que esta diferencia significativa entre las edades del grupo control y el grupo de estudio son una limitante del estudio, ya que hace que los grupos no sean del todo comparables. Sobre la diferencia estadísticamente significativa del tiempo de tabaquismo que encontramos entre el grupo de estudio y los controles, la mayoría de los estudios sobre este polimorfismo reportados en la literatura no consideraron esta variable dentro de su estudio por lo que no es posible comparar nuestros resultados con los de ellos, excepto por el estudio llevado a cabo por Dieergarde y cols en 2008 ³³, en el que no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre sus grupos con respecto al tabaquismo.

También observamos que un tiempo de lactancia igual o mayor a 12 meses se encontró asociado a un riesgo disminuido para desarrollar CaM. Con respecto al estado menopáusico de nuestras pacientes, encontramos que había una diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo de pacientes con CaM y el grupo control, lo cual consideramos puede ir en relación a que las pacientes del grupo de estudio eran de mayor edad que las pacientes control, lo que implicaría que un mayor número de pacientes del grupo con CaM ya estuvieran en la menopausia y postmenopausia comparado con el grupo control.

Al comparar los resultados mencionados anteriormente con otros estudios encontrados en la literatura, se observó que en el estudio llevado a cabo por Spurdle y colaboradores en Australia ³⁰, no encontraron una asociación entre estado premenopáusico y postmenopáusico y el riesgo de desarrollar cáncer de mama, al igual que Diergaarde y colaboradores ³³. Sin embargo, en este último estudio sí se encontró una asociación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama con respecto a la paridad y el uso de anticonceptivos entre el grupo control y el de estudio, lo cual no pudimos observar en nuestro estudio. Consideramos que el hecho

de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el hábito tabáquico, la edad de la menarca, la paridad y el uso de anticonceptivos, todos ya bien identificados como factores de riesgo para el desarrollo del CaM puede ir en relación al tamaño de muestra de nuestro estudio. Es importante mencionar que en una gran parte de los estudios reportados en la literatura sobre el polimorfismo en estudio y riesgo para desarrollar cáncer de mama, no se contemplan algunas variables como índice de masa corporal, paridad, edad de menarca, uso de anticonceptivos, uso de terapia de reemplazo hormonal, entre otros, que si fueron tomadas en cuenta para nuestro estudio y que es importante considerarlas, ya que son variables confusoras que pueden influir en los resultados, por lo que consideramos que esta es una fortaleza de nuestro estudio. De igual forma, el contar con esa información en los estudios previamente publicados nos hubiera permitido conocer los factores ambientales que están influyendo sobre el desarrollo del cáncer de mama específicamente en esos grupos de pacientes que fueron estudiadas con respecto al polimorfismo p.V660L en el receptor de progesterona, y que además son de población caucásica y de países desarrollados y contrastarlos con los encontrados en nuestras pacientes, que a diferencia de las pacientes incluidas en otros estudios, son de un país en vías de desarrollo, por lo que se esperaba que hubiera diferencias entre el hábito tabáquico, el número de hijos o la edad de la mujer en su primera gesta.

Por último, no logramos establecer una asociación entre ser homocigoto para el alelo polimórfico (TT) o ser heterocigoto para éste (GT) y el riesgo para desarrollar CaM esporádico. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Spurdle y colaboradores³⁰ y Fabjani y colaboradores³¹ quienes no encontraron asociación entre ser portador del alelo polimórfico y un riesgo aumentado o disminuidos de desarrollar este cáncer. Sin embargo, nuestros resultados y los de los dos estudios mencionados previamente difieren de lo reportado por el estudio llevado a cabo por el Consorcio de la Asociación de Cáncer de Mama²⁰ y lo reportado por Govindan y colaboradores³⁷ y Pooley y colaboradores³⁶ quienes sí encontraron una asociación entre el ser portador del polimorfismo p.V660L en el gen *PGR* y el riesgo para desarrollar CaM. Con respecto a estas diferencias, consideramos que pueden deberse a que el estudio desarrollado por el Consorcio incluyó un número muy grande de pacientes, lo cual permitió encontrar diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos aunque éstos fueron limítrofes y con OR de 1.07. También, debe mencionarse que si en otros estudios con un tamaño de muestra modesto se observaron diferencias estadísticamente significativas pudiera deberse a que hubo sesgos o error aleatorio en su metodología que llevaron a cometer un error tipo I al no rechazar la hipótesis nula cuando era verdadera. Por otro lado, en cuanto al estudio llevado a cabo por Govindan y colaboradores ³⁷, creemos que esta diferencia en los resultados pudo deberse no al tamaño de la muestra, que de hecho fue similar a nuestro tamaño de muestra, si no al origen étnico de su población de estudio, ya que como mencionamos en párrafos anteriores, también hubo diferencias marcadas en cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas.

Creemos que en el caso de nuestro estudio, el no haber encontrado asociación entre el polimorfismo p.V600L del gen *PGR* y un riesgo ya fuera aumentado o disminuido de desarrollar CaM podría deberse al tamaño de la muestra pequeño para este tipo de estudios de asociación de búsqueda de polimorfismos, o al hecho de que la población que incluimos en el estudio se trata de población mexicana con un origen étnico diverso debido al mestizaje. Es por esta última razón que consideramos importante el haber realizado este estudio, ya que no existen reportes previos en la literatura sobre este polimorfismo en población mexicana, ni siquiera con respecto a frecuencias alélicas o genotípicas. El contar con estos datos con respecto a nuestra población, puede ser un paso inicial para posteriormente realizar estudios de asociación de búsqueda de éste y otros polimorfismos con tamaños de muestra más grandes, que incluyan el estudio de las interacciones gen-gen y gen-ambiente, con la finalidad de comprender mejor el proceso de desarrollo del CaM al identificar estas variantes de susceptibilidad.

XI. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que no existe una asociación entre el SNP p.V660L del gen *PGR* y un incremento en el riesgo para el desarrollo de CaM esporádico en mujeres mexicanas.

El tener una edad mayor a 50 años y el tiempo de tabaquismo mayor a 20 años son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama esporádico.

El dar lactancia materna durante un tiempo igual o mayor a 12 meses es un factor protector para el desarrollo de cáncer de mama esporádico.

XII. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Consideramos que este estudio muestra algunas debilidades en su diseño que impidieron refutar la hipótesis nula. Entre esas debilidades creemos que se encuentra un tamaño de muestra pequeño por tratarse de un estudio de asociación sobre polimorfismos, ya que suele ser necesario incluir un mayor número de sujetos para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos debido a que muchas variantes genéticas tienen un efecto menor con $OR < 1.10$. Es por eso también, que de haber incluido un mayor número de controles con una proporción 2:1 respecto a los casos, podríamos haber encontrado diferencias estadísticamente significativas entre nuestros grupos; ya que aunque lo habitual es seleccionar casos y controles en proporción 1:1, cuando el número de casos es pequeño puede aumentarse la potencia del estudio seleccionando más de un control por caso, aunque esta ventaja se pierde con razones superiores a 4:1. De igual forma, consideramos que el estudio tiene un sesgo de selección (de Berkson), ya que los sujetos de estudio fueron obtenidos de fuentes hospitalarias, por lo que la muestra de pacientes no sería representativa de la población. Otra limitante del estudio, es que las mujeres del grupo estudio tuvieron una edad ligeramente mayor a las mujeres del grupo control, pero que resultó estadísticamente significativa, lo que hace que los grupos no sean del todo comparables; además que, aunque las pacientes del grupo control estaban libres de enfermedad al momento de ser incluidas en el estudio, no es posible garantizar que a una edad mayor no puedan presentar cáncer de mama.

Sin embargo, a pesar de las limitaciones que puede tener el presente estudio y otros llevados a cabo en la búsqueda de polimorfismos asociados a cáncer, consideramos que una fortaleza de nuestro estudio es que se incluyeron variables potencialmente confusoras que fueron controladas mediante el análisis estadístico con regresión logística múltiple, que en la mayoría de los estudios llevados a cabo en relación al polimorfismo p.V660L en el receptor de progesterona no han sido consideradas. Además consideramos que este tipo de estudios de asociación son importantes, ya que intentan identificar factores de riesgo para enfermedades complejas o multifactoriales como el cáncer, que a la larga puedan tener aplicación clínica.

Actualmente, gracias a los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) existe la posibilidad de estudiar al mismo tiempo múltiples polimorfismos en relación al CaM, lo que permitirá que más adelante se puedan establecer asociaciones entre múltiples variantes genéticas y que posteriormente se logre conocer la interacción que existe entre este conjunto de genes, y de esa forma se logre caracterizar mejor la compleja arquitectura genética de las enfermedades poligénicas como el cáncer.

XIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Jul-Ago 2013	Sep-Oct 2013	Nov-Dic 2013	Ene 2014	Feb 2014	Mar 2014	Abr 2014	May 2014	Jun 2014
Delimitación del tema a estudiar									
Revisión de la bibliografía									
Elaboración del protocolo									
Recolección de la información									
Análisis de los resultados									
Redacción del informe final									

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69–90.
2. De Santis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(6):409–18.
3. SINAIS: Sistema Nacional de Información en Salud [Internet]. México: SINAIS; 2010 [citado: 28abr 2014]. Base de datos de egresos hospitalarios por morbilidad en Instituciones Públicas, 2010-2012; [aprox. 3 pantallas]. Disponible en: http://www.sinais.salud.gob.mx/basesdedatos/std_egresoshospitalarios.html
4. INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía [Internet]. México: INEGI; 2000 [citado: 4 jun 2014]. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer(4 de febrero) Datos nacionales; 1-11. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
5. Meaney-Delman D, Bellcross C. Hereditary breast/ovarian cancer syndrome: a primer for obstetricians/gynecologists. *ObstetGynecolClin North Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2013 Sep [citado 28 may 2014];40(3):475–512. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021253>
6. Graña B, Lastra E, Llord G, Brunet J, Isla D. SEOM clinical guidelines for hereditary cancer. *ClinTranslOncol* [Internet]. 2011 Ago [citado 4 jun 2014];13(8):580–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821494>
7. Tice J, Kerlikowske K. Screening and prevention of breast cancer in primary care. *Prim Care Clin Office Pract* [Internet]. 2009 Sep [citado 4 jun 2014];36(3):533–58. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616154>
8. Turkoz FP, Solak M, Petekkaya I, Keskin O, Kertmen N, Sarici F, et al. Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients. *Breast* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jun [citado 30 may 2014];22(3):344–50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981738>
9. Shulman LP. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. *ObstetGynecolClin North Am* [Internet]. 2010 Mar [citado 4 jun 2014];37(1):109–33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20494261>
10. Singletary E, Allred C, Ashley P, Bassett L, Berry D, Bland K, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3628-36.
11. Vuong D, Simpson P, Green B, Cummings M, Lakhani S. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 2014;465:1–14.

12. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo A, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* 2012;38:698–707.
13. McCafferty M, Healy N, Kerin M. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic histopathology* 2009;15(10):485-9.
14. Park S, Koo J, Kim M, Park H, Lee J, Lee J, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *The Breast* 2012;21:50-7.
15. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* [Internet]. Elsevier B.V; 2010 Jun [citado 4 jun 2014];4(3):174–91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542480>
16. Brookes AJ. Single Nucleotide Polymorphism (SNP). *eLS*. 2007;3–6.
17. Kwok P, Francisco S. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs): Identification and Scoring. *eLS*. 2005;1–3.
18. Stadler ZK, Vijai J, Thom P, Kirchhoff T, Hansen N a L, Kauff ND, et al. Genome-wide association studies of cancer predisposition. *HematolOncolClin North Am* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 Oct [citado 4 jun 2014];24(5):973–96. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816582>
19. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. *Science* [Internet]. 2014 Mar [cited 26 May 2014];343(6178):1466–70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675953>
20. Pharoah P, Causeway W, Permissions F. Commonly studied single-nucleotide polymorphisms and breast cancer: results from the Breast Cancer Association Consortium. *J NatlCancerInst* [Internet]. 2006 Oct [citado 4 jun 2014];98(19):1382–96. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018785>
21. Obr AE, Edwards DP. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Jun [citado 30 may 2014];357(1-2):4–17. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3318965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
22. Hill KK, Roemer SC, Churchill ME a, Edwards DP. Structural and functional analysis of domains of the progesterone receptor. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Jan [citado 4 jun 2014];348(2):418–29. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803119>

23. Misrahi M, Venencie PY, Saugier-Veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. Structure of the human progesterone receptor gene. *BiochimBiophys Acta* [Internet]. 1993 Nov [citado 28 abr 2014];1216(2):289–92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11697142>
24. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *HumReprodUpdate* [Internet]. 2000 [citado 28 abr 2014];6(3):225–36. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874567>
25. Li X, O'Malley BW. Unfolding the action of progesterone receptors. *J BiolChem* [Internet]. 2003 Oct [citado 4 jun 2014];278(41):39261–4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12893816>
26. Rowe SM, Coughlan SJ, Mckenna NJ, Coughlan SJ, Headon DR, Garrett E, et al. Ovarian Carcinoma-associated Taq I Restriction Fragment Length Polymorphism in Intron G of the Progesterone Receptor Gene Is Due to an Alu Sequence Insertion Ovarian Carcinoma-associated TaqI Restriction Fragment Length Polymorphism in Intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Res.* 1995;55:2743–5.
27. AgoulNIK IU, Tong X-W, Fischer D-C, Körner K, Atkinson NE, Edwards DP, et al. A germline variation in the progesterone receptor gene increases transcriptional activity and may modify ovarian cancer risk. *J ClinEndocrinolMetab* [Internet]. 2004 Dic [citado 4 jun 2014];89(12):6340–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579801>
28. Angov E. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol. J.* 2011;6:650-9.
29. Deininger PL, Batzer M a. Alu repeats and human disease. *Mol GenetMetab* [Internet]. 1999 Jul [citado 4 jun 2014];67(3):183–93. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381326>
30. Spurdle A, Hopper J, Chen X. The Progesterone Receptor Exon 4 Val660Leu G/TPolymorphism and Risk of Breast Cancer in Australian Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*2002;11:439-43.
31. Fabjani G, Tong D, Czerwenka K, Schuster E, Speiser P, Leodolter S, et al. Human progesterone receptor gene polymorphism PROGINS and risk for breast cancer in Austrian women. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;72:131–7.
32. Johnatty SE, et al. Progesterone receptor polymorphisms and risk of breast cancer: results from two Australian breast cancer studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;109:91-9.

33. Diergaarde B, Potter J, Jupe E. Polymorphisms in Genes Involved in Sex Hormone Metabolism, Estrogen Plus Progestin Hormone Therapy Use, and Risk of Postmenopausal Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*2008;17:1751-9.
34. Romano A, Lindsey P, Fischer D, Delvoux B, Paulussen A, Janssen R, et al. Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene (+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer. *GynecolOncol.* 2006; 101:287–95.
35. Wang-Gohrke S, Chang-Claude J, Becher H. Progesterone Receptor Gene Polymorphism Is Associated with Decreased Risk for Breast Cancer by Age 50. *Cancer Res.*2000;60:2348-50.
36. Pooley K, Healey C, Smith P. Association of the Progesterone Receptor Gene with Breast Cancer Risk: A Single-Nucleotide Polymorphism Tagging Approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*2006;15:675-82.
37. Govindan S, Ahmad SN, Vedicherla B, Kodati V, Jahan P, Rao K, et al. Association of progesterone receptor gene polymorphism (PROGINS) with endometriosis, uterine fibroids and breast cancer. *Cancer Biomark.* 2007;73(3):–73-8.
38. Slattery ML, Baumgartner KB, Giuliano AR, Byers T, Herrick JS, Wolff RK. Replication of five GWAS-identified loci and breast cancer risk among Hispanic and non-Hispanic white women living in the Southwestern United States. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129(2):531-9.
39. Cerliani JP, Guillardoy T, Giulianelli S, Vaque JP, Gutkind JS, Vanzulli SI, et al. Interaction between FGFR-2, STAT5, and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer Res [Internet].* 2011 May [citado 4 jun 2014];71(10):3720–31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464042>

XV. ANEXOS

Anexo 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Nombre del estudio: **Estudio de asociación entre los Polimorfismos de Nucleótido Único *CASP8* (D302H), *IGFBP3* (202c>a), *PGR* (V660L), *SOD2* (V16A) y *TGFBI* (L10P) y riesgo para cáncer de mama de presentación esporádica en mujeres mexicanas.**

Por medio de esta carta de consentimiento informado, le estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

El propósito de este estudio es conocer ciertos cambios en el material genético, es decir variaciones que se pueden presentar entre poblaciones e individuos y que pueden estar relacionadas con el desarrollo de enfermedades, como el cáncer de mama. En el estudio participarán dos grupos de mujeres: el primer grupo corresponderá a mujeres con diagnóstico de cáncer de mama de presentación esporádica, es decir, mujeres con diagnóstico de cáncer de mama sin antecedentes familiares de cáncer de mama, y el segundo grupo corresponderá a mujeres sin diagnóstico de cáncer de mama.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria, y consistirá en lo siguiente: se le aplicará un cuestionario en el que le preguntaremos sobre: edad, número de hijos, antecedentes familiares, historial médico, antecedentes de cáncer en la familia, diagnóstico de cáncer de mama. Todas las entrevistas se llevarán a cabo en forma individual y confidencial; en caso de sentirse incómoda, usted tendrá todo el derecho de no responder a determinada pregunta o de no seguir respondiendo el cuestionario. Si usted cumple los criterios suficientes para formar parte del grupo de mujeres sin cáncer de mama y decide participar en este estudio, se tomarán únicamente 5 ml de sangre venosa de uno de sus brazos. Los estudios que realizaremos de las muestras obtenidas tienen la finalidad de identificar en su material genético secuencias específicas que puedan estar o no, relacionadas al desarrollo de cáncer de mama esporádico.

La información resultante de este estudio será utilizada para el entendimiento y mejor comprensión del desarrollo de cáncer de mama de presentación esporádica. Todos los datos que deriven de esta investigación serán estudiados de forma tal que no se afectará la confidencialidad de la información puesto que no se revelarán los nombres de las pacientes participantes así como tampoco las características de su información

genética. El sitio donde serán resguardadas las muestras será en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social y el responsable del resguardo será el Dr. Carlos Alberto Yam Ontiveros (alumno de Doctorado en Ciencias Médicas quien desarrollará el estudio). Es importante mencionar que si usted decide salir del estudio en cualquier momento del desarrollo del mismo, las muestras que nos haya otorgado serán destruidas. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla (como su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial y por separado al igual que sus respuestas a los cuestionarios y los resultados de los estudios a realizar, para garantizar su privacidad. Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, por ejemplo, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos.

Las molestias durante la toma de muestra de sangre son mínimas. En algunas ocasiones el procedimiento para la toma de muestra de sangre puede causar un poco de dolor o molestia, y es posible que se le pueda formar un moretón el cual desaparecerá a los pocos días. Sin embargo, si usted llegara a sufrir alguna complicación derivada de su participación en este estudio, recibirá el tratamiento y seguimiento necesario en el IMSS.

Usted no recibirá pago por su participación en este estudio, ni este estudio implica gasto alguno para usted. Usted no recibirá ningún beneficio directo al participar en este estudio. Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento acerca del desarrollo de cáncer de mama de presentación esporádica en mujeres.

Si usted decide no participar, usted y su familia no se verá afectada la atención médica que le es brindada por el IMSS como derechohabiente.

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 14:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Carlos Alberto Yam Ontiveros, que es el investigador responsable del estudio, a los teléfonos: 56 27 69 41, en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana ubicada en el Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS (Dirección: AV. Cuauhtémoc 330, Col Doctores, CP 06720,

Del. Cuauhtémoc, México DF). En caso de presentarse una emergencia derivada del estudio, usted puede dirigirse a su clínica de adscripción en cualquier momento del día y en cualquier día de la semana. Si usted tiene dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación, puede comunicarse con los responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel.56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av.Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído el contenido de este formato de consentimiento. De igual forma, se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas, las cuales han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato. Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Para el estudio de genes: por favor marque con una X una de las opciones que se presentan abajo (únicamente debe indicar la opción que corresponda)

No autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas

Sí autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas de este estudio
Únicamente

Sí autorizo que se tome la muestra para las pruebas genéticas de este estudio
y su empleo para estudios futuros

Nombre y firma del Participante

Fecha _____

Nombre y firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Nombre y firma de los testigos:

Testigo 1 _____

Testigo 2 _____

Anexo 2

Estudio de asociación entre los Polimorfismos de Nucleótido Único *CASP8* (D302H), *IGFBP3* (202c>a), *PGR* (V660L), *SOD2* (V16A) y *TGFBI* (L10P) y riesgo para cáncer de mama de presentación esporádica en mujeres mexicanas.

DATOS GENERALES

Nombre _____ Apellido paterno _____ Apellido materno _____
Edad _____ Fecha de nacimiento _____
Lugar de nacimiento _____ Estado civil _____
Domicilio: _____
Calle _____ No. Exterior _____ No. Interior _____ Colonia _____
Municipio/Delegación _____ Estado _____ Código Postal _____
NSS _____
UMF _____ HGZ/HGR _____
Teléfono _____

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

Número de generaciones familiares que han vivido en México: (marcar con una X)

Una generación _____ Dos generaciones _____ Tres generaciones _____

Origen padres: Padre _____ Madre _____

Origen abuelos maternos: Abuelo _____ Abuela _____

Origen abuelos paternos: Abuelo _____ Abuela _____

Antecedentes de cáncer en la familia: Si _____ No _____

Familiar con cáncer	Tipo de cáncer

Antecedentes personales no patológicos

Tabaquismo _____ Alcoholismo _____

Antecedentes ginecoobstétricos

Menarca _____ No. embarazos _____ Edad 1° gesta _____ No. Partos _____

No. Cesáreas _____ No. Abortos _____ Lactancia _____ Tiempo lactancia _____ Anticonceptivos _____

_____ Tiempo uso anticonceptivos _____ TRH _____

Tiempo TRH _____

Características antropométricas

Peso _____ Talla _____ IMC _____

Antecedentes personales patológicos:

Antecedente personal de cáncer: (marcar con una X) Sí _____ No _____

Tipo de cáncer _____ Estadio de cáncer _____

Fecha de diagnóstico _____