



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

EVALUACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS EN *MIC B* Y SU
RELACIÓN CON EL RIESGO A DESARROLLAR CÁNCER DE
MAMA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

LUIS FERNANDO LÓPEZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS: DR. EN C. JULIÁN RAMÍREZ
BELLO

ASESOR: DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCON



Unidad de Investigación en Enfermedades
Metabólicas y Endócrinas.
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
CDMX. 2016.



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre apoyaron mis pasos, fueron parte fundamental para poder concluir este logro.

A mis hermanas que siempre están ahí cuando las necesito.

A mis amigos y maestros por el apoyo y experiencias, hicieron de mi estancia en FES Zaragoza una de las mejores etapas de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio del Hospital Juárez de México, por su ayuda y amistad, hicieron que el día a día fuera más ameno

- Al Hospital Juárez de México por prestar las instalaciones, el material y equipo, necesarios para la realización de esta tesis.
- Al personal del Hospital Juárez de México por su hospitalidad y apoyo para la realización de esta tesis.
- Al Dr. en C. Julián Ramírez Bello. Por su asesoría para la realización de esta tesis.
- Al Dr. en C. Jorge Flavio Mendoza Rincón. Por dar las facilidades necesarias para que se pudiera llevar a cabo este proyecto.
- A la M. en C. Mónica Sierra Martínez. Por darme la oportunidad de unirme al equipo de trabajo del Hospital Juárez de México.
- Al Dr. en C. Octavio Daniel Reyes Hernández Por su asesoría y ayuda para el muestreo de este proyecto.
- A la Dra. Sonia Chávez Ocaña. Por su asesoría y ayuda a la captación de pacientes, necesarios para la realización de esta tesis.



INDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Epidemiología del cáncer de mama.....	8
Mortalidad en México.....	8
Biología del cáncer.....	9
El cáncer, una enfermedad del ciclo celular.....	11
Importancia de los puntos de control en el ciclo celular.....	14
El cáncer una enfermedad genética-genómica.....	16
Genes supresores de tumores:.....	18
Tipos de mutaciones en los proto-oncogenes y genes supresores de tumor en cáncer...	18
El cáncer como enfermedad multifactorial.....	21
Factores ambientales en cáncer.....	21
Factores hereditarios en cáncer. Ejemplos de genes Mendelianos.....	22
Variabilidad genética e importancia de los polimorfismos en la susceptibilidad a desarrollar CaMa (genes de baja penetrancia).....	24
Generalidades de los SNPs.....	24
Clasificación de los SNPs.....	25
Ejemplo de polimorfismo genéticos y su asociación con diversas enfermedades multifactoriales.....	27
Fisiopatología del CaMa.....	28
Clasificación del cáncer de mama.....	29
Genes Mendelianos en CaMa.....	31
Genes <i>BRCA1</i> y <i>BRCA2</i>	31
Genes de baja penetrancia en CaMa.....	32
La familia de genes <i>MIC</i>	35
Variabilidad genética en <i>MIC B</i> y su relación con diversos tipos de cáncer.....	37

Función de las proteínas MIC A y MIC B en las células del sistema inmunológico	39
Señalización de las proteínas MIC A y MIC B	40
MIC A / B y el receptor activador NKG2D	40
Importancia de MIC A/B en los tumores.....	41
JUSTIFICACIÓN	43
OBJETIVOS	44
Objetivo general.....	44
Objetivos particulares	44
HIPÓTESIS	45
Diseño de estudio	46
METODOLOGÍA	49
Extracción de DNA a partir de sangre venosa periférica	49
Extracción de material genético	49
Cuantificación del DNA	51
Diluciones del DNA nuclear	52
Colocación de las muestras de DNA de los casos y controles en placas de 96 pozos.....	52
Condiciones del PCR en tiempo real	54
Análisis de discriminación alélica de SNPs en el gen MIC B mediante el ensayo 5' exonucleasa.	54
Análisis estadístico.	58
Evaluación <i>in silico</i> de la función de los 4 SNP de MIC B	58
RESULTADOS	59
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	66
Perspectivas a futuro	67
BIBLOGRAFÍA	68

Índice de Figuras

FIGURA 1. MORTALIDAD POR TUMORES MALIGNOS EN MÉXICO POR GRUPO DE EDAD.	9
FIGURA 2. REPRESENTACIÓN DEL CICLO CELULAR JUNTO CON FASES DEL DESARROLLO CELULAR.	13
FIGURA 3. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LOS SNPs LOCALIZADOS EN GENES QUE CODIFICAN PROTEÍNAS.	26
FIGURA 4. TEJIDO MAMARIO NORMAL.	28
FIGURA 5. PROPORCIONES ESTIMADAS DEL FRR ATRIBUIBLES A LOS DISTINTOS TIPOS DE VARIACIÓN GENÉTICA.	35
FIGURA 6. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES MIC.	36
FIGURA 7. LAS DOS FAMILIAS GENÉTICAS DE LIGANDOS PARA NKG2D.	40
FIGURA 8. PAPEL DEL SISTEMA MIC A/B-NKG2D EN LA INMUNOVIGILANCIA Y EN EL ESCAPE TUMORAL.	42
FIGURA 9. TÉCNICA DE GENOTIPIFICACIÓN CON SONDAS TAQMAN Y PCR EN TIEMPO REAL.	55
FIGURA 10- PLOT DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA.	57
FIGURA 11. EJEMPLO DE GRÁFICA DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA.	57

Índice de tablas

TABLA 1. FACTORES AMBIENTALES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.....	22
TABLA 2. GENES CON ALTA PENETRANCIA INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE DIVERSOS TUMORES MALIGNOS Y SÍNDROMES.....	23
TABLA 3. IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LOS SNPs Y SU IMPACTO CON SUSCEPTIBILIDAD PARA DESARROLLAR DIVERSAS ENFERMEDADES MULTIFACTORIALES.	27
TABLA 4. CONDICIONES DEL PCR EN TIEMPO REAL	54
TABLA 5. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS, ALÉLICAS Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 2844498 EN EL GEN <i>MIC B</i> EN CASOS Y CONTROLES	59
TABLA 6. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 2516498 EN EL GEN <i>MIC B</i> EN CASOS Y CONTROLES	60
TABLA 7. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 3132468 EN EL GEN <i>MIC B</i> EN CASOS Y CONTROLES	60
TABLA 8. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 3828916 EN EL GEN <i>MIC B</i> EN CASOS Y CONTROLES	61

RESUMEN

En nuestro país, el cáncer de mama (**CaMa**) representa desde el 2006, la primer causa de muerte en mujeres debido a tumores malignos. El desarrollo de esta patología es influenciada tanto por factores genéticos como ambientales. El gen *MIC B*, que codifica para la proteína MIC B, tiene un papel importante en la inmuno-vigilancia tumoral, dado que permite el reconocimiento de diversos antígenos tumorales y la posterior eliminación de estas células. Diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) han sido identificados en *MIC B*, sin embargo, no han sido evaluados en muestras de CaMa. De esta manera, en este protocolo se evaluaron algunos SNPs en *MIC B* y se determinó si confieren riesgo para desarrollar CaMa. **Objetivo.** Determinar si los SNPs (rs284449, rs2516498, rs3132468, rs3828916) localizados en *MICB* están involucrados con susceptibilidad a desarrollar CaMa en una muestra de pacientes mexicanas. **Muestras y método.** Este estudio incluyó DNA (Deoxyribonucleic acid) de 223 pacientes mexicanas con CaMa y 233 mujeres controles del Hospital Juárez de México. La genotipificación de los 4 SNPs se realizó mediante sondas TaqMan. El Equilibrio de Hardy-Weinberg (E-HW), OR, IC 95% y el valor de p se obtuvieron mediante el programa Finetti, y Epidat versión 3.1., respectivamente. **Resultados.** Los genotipos de los casos y controles estuvieron en E-HW. Las frecuencias de los genotipos de los 4 SNPs en *MIC B* fueron similares en casos y controles. Ningún SNP de *MIC B* mostró asociación con CaMa. **Conclusión.** Nuestros datos sugieren que los SNPs rs284449, rs2516498, rs3132468, rs3828916 del gen *MIC B* no tienen una participación directa en la susceptibilidad a desarrollar CaMa.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama (CaMa), es una grave amenaza para la salud de la mujer a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer más frecuente entre las mujeres es el de mama, el cual representa a nivel mundial el 16% de todos los cánceres malignos femeninos.¹ Se estima que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos. Este padecimiento se presenta con más frecuencia en países desarrollados, pero tiene mayor impacto de mortalidad en países de bajos y medianos ingresos, como México.²

Mortalidad en México

Las tasas de mortalidad por CaMa en México muestran un aumento notorio en las últimas cinco décadas. Entre 1955 y 1960, con los primeros datos confiables, la tasa era de alrededor de 2 a 4 muertes por cada 100 mil mujeres. Para la mitad de la década de 1990, los reportes indican una elevación de muertes de manera sostenida en mujeres adultas de todas las edades hasta alcanzar una cifra cercana a 9 por cada 100 mil mujeres (**Figura 1**).¹

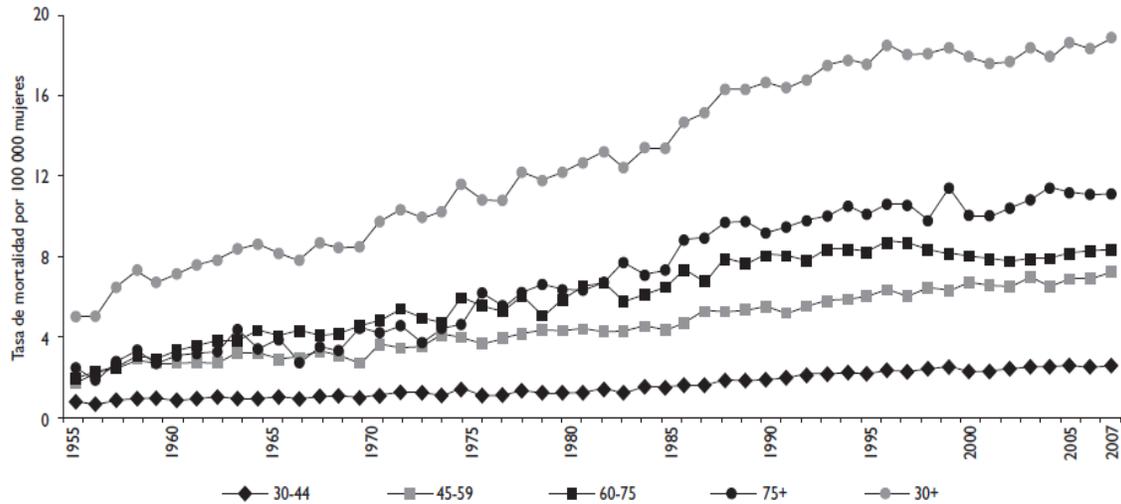


Figura 1. Mortalidad por tumores malignos en México por grupo de edad. Para el año 2006, el CaMa se convirtió en la segunda causa de muerte más común entre las mujeres de 30 a 54 años (después de la diabetes y las cardiopatías). Actualmente, el CaMa en México, representa la primera causa de mortalidad en mujeres². (Figura tomada de Salud Pública de México ²)

Biología del cáncer

El cáncer se define como un fenómeno biológico anormal caracterizado por un crecimiento descontrolado de diferentes células (con diversas alteraciones genéticas, epigenéticas e inestabilidad cromosómica y genómica) en un determinado organismo o sistema, las cuales además, se dividen de manera autónoma e inducen la generación de nuevos vasos, pudiendo llegar a invadir localmente algunas partes del mismo tejido u otro tejido u órgano, a través del fenómeno denominado metástasis.³

Los eventos tumorales antes mencionados, son causados por alteraciones ocurridas en el material genético, por lo cual, estas células pierden el control de la proliferación celular, de modo que se dividen en un mayor número de células y con

mayor velocidad que el resto del tejido al que pertenecen, este crecimiento anormal puede llegar a formar masas de tejido maligno llamadas tumores o neoplasias.⁴ Las células tumorales pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el torrente sanguíneo y linfa, lo que da lugar a metástasis.⁵

Esta característica es la que hace considerar al cáncer avanzado como una enfermedad sistémica; la metástasis es responsable de la mayoría de muertes ocasionada por las neoplasias malignas.

Así, el cáncer resulta de dos procesos sucesivos: a) Incremento de la división y proliferación de un grupo de células genéticamente y genómicamente inestables y anormales que dan lugar a la génesis del tumor, y b) La adquisición de la capacidad invasiva que permite a las células tumorales migrar por el organismo.⁶

Las células cancerosas presentan cuatro características esenciales:⁷

- **Clonalidad:** Los tumores malignos se originan en una única célula que se divide y prolifera descontroladamente, dando lugar a un clon de células malignas.

- **Autonomía:** El crecimiento y desarrollo de la célula cancerosa no es regulado de forma correcta por los reguladores hormonales y bioquímicos normales.

- **Anaplasia:** Las células tumorales tienen una pérdida de diferenciación celular. En cuanto mayor sea el grado de anaplasia de un tumor, mayor será su potencial metastásico, así como mayor será su diseminación.
- **Metástasis:** Las células cancerosas tienen la capacidad de invadir otros tejidos a distancia de su lugar de origen.

El cáncer, una enfermedad del ciclo celular

El ciclo celular se define como la suma total de eventos relacionados con la división de las células, la cual ocurre entre el tiempo en el que una célula termina una división celular y el tiempo en el que completa la siguiente.

El ciclo celular tiene dos procesos biológicos básicos:

Primero: el material genético en el núcleo y organelos deben replicarse completamente, una copia del material genético, como de los organelos debe quedar en cada una de las nuevas células que se forman.

Segundo: El citoplasma y las membranas deben organizarse, de manera que habrá dos células completas para recibir este DNA recién sintetizado. Mecanismos celulares-moleculares complejos que aseguran que estos dos objetivos se cumplan.⁸

Con base en las actividades celulares visibles en un microscopio óptico, el ciclo celular puede dividirse en dos fases principales: la fase de mitosis (M) y la

interfase. La M incluye el proceso de mitosis y citocinesis. En el proceso de mitosis, los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos, en la citocinesis, la célula se divide en dos células hijas. La interfase es el periodo entre las divisiones celulares, un intervalo donde la célula crece y efectúa diversas actividades metabólicas.⁹

La fase M del ciclo se divide en cinco etapas -profase, prometafase, metafase, anafase y telofase- y tienen lugar en un orden secuencial estricto, posteriormente a esto sigue la citocinesis.

1. **Profase.** La cromatina se condensa lentamente formando cromosomas bien definidos; cada cromosoma consta de dos cromátidas hermanas, cada una con un centrómero; en esta etapa comienza a formarse el huso mitótico.
2. **Prometafase.** Inicia con la desintegración de la envoltura nuclear, en cada centrómero maduran complejos proteicos llamados cinetócoros que se unen a algunos de los microtúbulos del huso.
3. **Metafase.** Los microtúbulos alinean los cromosomas en un plano situado a medio camino de los polos del huso.
4. **Anafase.** Los cinetocoros apareados se separan, permitiendo que cada cromátida (ahora denominada cromosoma) sea llevada lentamente hacia un polo del huso.

5. **Telofase.** Los nuevos cromosomas son llevados a los polos y los microtúbulos desaparecen, se vuelve a formar la envoltura nuclear. La cromatina condensada se expande de nuevo.
6. **Citocinesis.** Se produce mediante un anillo contráctil de filamentos de actina y miosina que se forma debajo de la membrana plasmática. Conforme los filamentos de actina y miosina se contraen, estos tiran de la membrana plasmática, lo que hace que la célula se estrangule y quede dividida en dos. Finalmente, se rompe la unión entre las dos células hijas, y la membrana plasmática se vuelve a sellar (**Figura 2**).

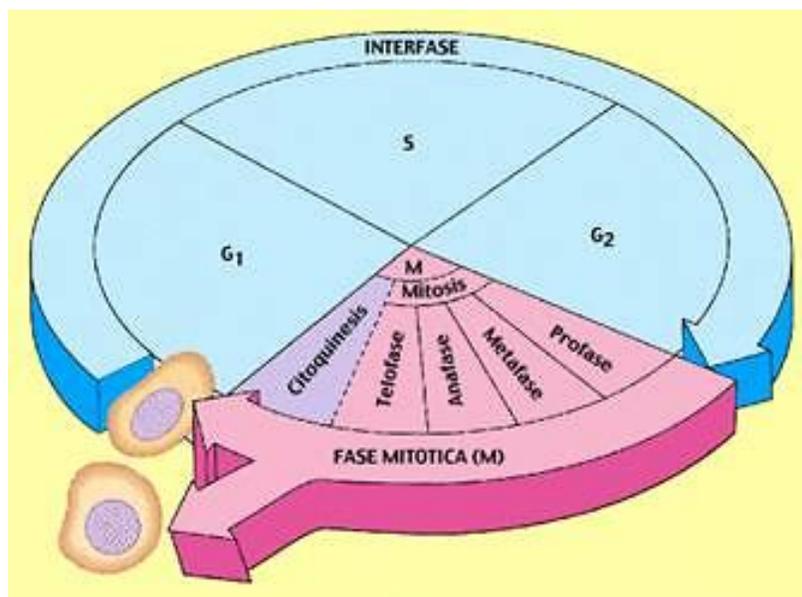


Figura 2. Representación del ciclo celular junto con fases del desarrollo celular. El ciclo celular en células somáticas se divide en interfase y mitosis. El objetivo es duplicar la información genética, finalmente esta molécula se lleva a una nueva célula. (Figura obtenida de <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio6.php9>)

Finalmente, en la interfase del ciclo celular los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que este presenta un aspecto uniforme.

La interfase se subdivide a su vez en:

1. La fase G1 (gap 1): Corresponde al intervalo (gap) entre la mitosis y el inicio de la replicación del DNA. La célula en esta fase es metabólicamente activa y está creciendo, el DNA a su vez no se duplica.

2. La fase S (síntesis): En esta etapa de la interfase, la célula replica su DNA nuclear, un requisito esencial para la división celular.

3. La fase G2: Tras finalizar la síntesis del DNA, en la fase G2, las células siguen creciendo y hay síntesis activa de proteínas necesarias para la mitosis.⁹

Importancia de los puntos de control en el ciclo celular

Existen algunos puntos de control (checkpoints) en el ciclo celular que aseguran la progresión sin que haya fallas en la replicación del DNA o la segregación de los cromosomas, estos puntos regulan el correcto avance de procesos críticos en el ciclo.¹⁰ Estas rutas de verificación transitorias desaparecen una vez resuelto el problema que la puso en marcha.

Los puntos de control son los siguientes:

- Punto de control de DNA no replicado. Se ubica al final de la fase G1, antes de iniciar la fase S. Actúa inhibiendo a la proteína Cdc25, la cual es un activador de la ciclina A/B y Cdk1.
- Punto de control de ensamblaje del huso (checkpoint de mitosis). Se encuentra antes de la anafase. En esta parte del ciclo celular se activa la proteína Mad2, la cual impide la segregación de las cromátidas hermanas hasta que todas se hayan unido al huso.

La ciclina B se une a la cinasa dependiente de ciclina (Cdk1) para formar el complejo ciclina B/Cdk1 también conocida como factor promotor de la maduración o factor promotor de la mitosis. La cantidad de ciclina B y la actividad del complejo ciclina B/Cdk1 aumentan a lo largo del ciclo celular hasta la mitosis, donde se reducen abruptamente debido a la degradación que sufren. Cuando la ciclina B no es degradada arresta a las células en anafase y no se procede a la citocinesis, marcando el final del ciclo celular.

- Punto de control del daño del DNA en la transición de G1 a S y G2 a M. El daño celular activa a p53, proteína supresora de tumor que induce la reparación del ADN; detiene el ciclo celular promoviendo la transcripción génica de p21, inhibidor de Cdk, y, en el caso de que todo falle, induce apoptosis.¹¹

Cuando las células normales presentan lesiones o envejecen, mueren por apoptosis, sin embargo, las células cancerosas evitan este fenómeno.

Diversas evidencias experimentales han mostrado que las neoplasias malignas son el resultado de múltiples alteraciones genéticas del DNA, las cuales pueden ser el primer paso para la génesis de los tumores. Las alteraciones iniciales y las posteriores hacen que las células neoplásicas malignas inicien un proceso de proliferación descontrolada, pierdan los mecanismos normales de apoptosis, formen nuevos vasos sanguíneos e invadan tejidos normales. El desarrollo de un tumor maligno requiere de muchas transformaciones genéticas e incluye la no activación de los checkpoints. Las alteraciones genéticas conllevan al desarrollo tumoral, reduciendo cada vez más la capacidad de respuesta de las células al mecanismo normal regulador del ciclo.¹²

Los genes patogénicos involucrados en la carcinogénesis resultan de genes normalmente implicados en el control del ciclo celular, la reparación de daño en el DNA y de la unión entre células. Para que la célula se transforme en neoplásica se requieren, al menos 2 mutaciones: una en un gen supresor de tumores y otra en un proto-oncogén, el cual da lugar a un oncogén.¹³

El cáncer una enfermedad genética-genómica

La transformación maligna de una célula se da por acumulación de mutaciones en genes específicos, los cuales son la clave para entender las raíces del cáncer. Estos genes están agrupados en 2 familias. La primera la forman los proto-oncogenes e incluye a ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas, factores de

crecimiento, receptores, etcétera, los cuales estimulan la proliferación celular. Cuando éstos mutan, se transforman en oncogenes, capaces de afectar la multiplicación de células de forma descontrolada, de modo que algunos de ellos inducen la maquinaria celular para que sintetice de forma masiva determinados factores de crecimiento.¹³

La segunda familia está integrada por genes denominados supresores de tumores, los cuales en un organismo sano controlan de manera negativa la proliferación celular. Por tanto, los genes supresores de tumores son reguladores negativos de crecimiento y cuando sufren diversas alteraciones o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, metilación, etcétera, las células dejan de crecer normalmente y adquieren propiedades proliferativas anormales, características de las células tumorales.¹⁴

Oncogenes

Los oncogenes -versiones mutadas de los protooncogenes- actúan induciendo el ciclo celular. Las mutaciones en los oncogenes resultan en una ganancia de función, entre ellos se encuentran ciclinas, factores de crecimiento o sus receptores inducen la división celular alterando la señalización celular.¹⁵

Una célula tumoral puede presentar alteraciones en los niveles de expresión de factores de crecimiento o de sus receptores.¹⁶ La susceptibilidad para formar tales tumores puede ser heredado a través de la línea germinal, aunque también puede ocurrir como resultado de cambios en las células somáticas en el individuo.¹⁷

Genes supresores de tumores:

Viceversa, algunos tumores son consecuencia de un mecanismo diferente, como la pérdida de ambos alelos en un locus, generando mutaciones de pérdida de función en genes supresores de tumores. Los 2 genes mejor caracterizados de esta clase codifican para las proteínas p53 y pRB, aunque hay una lista grande de este tipo de genes que son fundamentales para regular negativamente la división-proliferación celular descontrolada.¹⁸ Algunos de los genes supresores de tumor mejor caracterizados son: APC, el cual codifica para la proteína APC, involucrada en cánceres de colon y estómago; pRB, el cual codifica para la proteína del retinoblastoma, una proteína que controla el ciclo celular, alteraciones en su gen se relacionan con retinoblastoma y cánceres de hueso, vejiga, células pequeñas de pulmón y CaMa; TP53, otro gen comúnmente alterado en cáncer, este *locus* codifica para la proteína p53, la cual puede detener la división celular e inducir a las células anormales a matarse ellas mismas, alteraciones en este gen se relacionan con una gran cantidad de cánceres y finalmente, BRCA1, codifica para la proteína BRCA1, alteraciones en este gen se involucran con CaMa, ovario, mientras que alteraciones en BRCA2, causa CaMa.⁹

Tipos de mutaciones en los proto-oncogenes y genes supresores de tumor en cáncer

Determinados cambios estructurales y/o funcionales en los protooncogenes contribuyen a convertirlos en oncogenes. Las alteraciones más comúnmente encontradas en los proto-oncogenes son los siguientes:²⁰

- **Translocación:** cuando una parte de un cromosoma se une a otra región de otro cromosoma. El resultado es un híbrido de cromosoma detectable en el cariotipo.

- **Mutaciones puntuales:** sustitución de un par de bases por otro par en una secuencia de DNA, por ejemplo G:C por A:T.

- **Amplificación:** las células eucariotas están formadas por un genoma diploide, es decir, tienen dos copias de cada gen. En determinadas circunstancias una de las copias puede multiplicarse varias veces, aumentando su tasa de expresión, dando lugar a la amplificación del gen. Es uno de los mecanismos más habitualmente implicados en la carcinogénesis.

- **Mutagénesis por inserción:** producida por la inserción del DNA del virus en el genoma del huésped.

Entre los virus que pueden provocar mutaciones que lleven al desarrollo del cáncer, se encuentran los retrovirus, los virus de la leucemia humana 1 y 2 (HTLV-1 y HTLV-2) y los papilomavirus (HPV) y el carcinoma de cérvix, anorrectales y esófago.²¹

Respecto a los genes supresores de tumor, estos *loci* también sufren diversas alteraciones estructurales y funcionales que derivan en una no funcionalidad, evitando regular la proliferación, diferenciación, etc. Las alteraciones más comunes se describen abajo.²²

Polimosfirmos: Hay un cambio de una de las bases de DNA, este cambio puede afectar la expresión génica, el corte y empalme, la estabilidad de los RNAm,

cambiar ciertos aminoácidos, estos últimos tienen mayor impacto en la estructura y/o función de la proteína.

Mutación puntual: Las mutaciones puntuales son uno de los mecanismos de inactivación de genes supresores de tumores. Diversas mutaciones puntuales pueden inactivar genes supresores de tumores, produciendo codones de paro o cambios en marco de lectura.

Delección: En este tipo de mutación se pierde una o más bases, es decir, se pierde un trozo de DNA alterando la cadena proteica que debería formarse, así como su función. En ocasiones las delecciones son tan largas que pueden comprometer un gen entero o varios genes contiguos.

Cambio de marco de lectura: Este tipo de mutación se da cuando por inserción o pérdida de pares de bases afecta y cambia el marco de lectura. Si cambia el marco de lectura, cambia la forma de agrupar esas tres bases y se colocarán aminoácidos erróneos, con posibilidad de tener un triplete de paro prematuro. Las inserciones, duplicaciones y delecciones pueden dar lugar a este tipo de mutaciones.

Inactivación funcional: La inactivación funcional es el mecanismo utilizado por diversos virus DNA, incluidos los papilomavirus, adenovirus y SV40, para producir transformación. Esta transformación está relacionada con la integración del genoma viral al DNA de la célula infectada y es acompañada de una sobreexpresión de los genes virales. Luego, estas proteínas virales interactúan con

proteínas celulares que regulan en forma negativa la progresión del ciclo celular (p53, pRb) anulando su función.²²

El cáncer como enfermedad multifactorial

Actualmente sabemos que el cáncer no es una sola enfermedad, sino un conjunto de por lo menos 100 enfermedades distintas que se caracterizan por un crecimiento anormal y descontrolado de diversos tipos celulares del cuerpo.²³

Excepto las neoplasias malignas mendelianas, donde un solo gen alterado genera el tumor, en general, las neoplasias malignas no tienen este comportamiento, más bien, tienen un origen multifactorial, entre los factores de riesgo involucrados en su génesis se encuentran los genéticos, epigenéticos, y ambientales (químicos, físicos o biológicos).²⁴

Factores ambientales en cáncer

Los factores ambientales son los responsables del 95 al 99% de todos los cánceres en adultos y del 90 al 96% de los cánceres durante la infancia.^{25, 26} Los agentes cancerígenos medioambientales implicados en su desarrollo se clasifican en químicos, físicos y biológicos (**Tabla 1**).²⁵

Tabla 1. Factores ambientales implicados en el desarrollo de cáncer. Los principales factores implicados en el desarrollo de esta enfermedad son tanto los químicos, físicos y biológicos. (Obtenida del Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud)

Físicos	Químicos	Biológicos
Radiación ionizante	Benzopireno, nitrosaminas (encontradas en el humo del cigarrillo)	Virus y bacterias
Radiación ultravioleta	Nitritos (aditivos alimenticios en carnes frías)	Papiloma humano
Fibras minerales	Metales pesados (plomo, mercurio, cadmio)	Epstein-Barr
Radiografías	Hormonas.	Hepatitis B y C
Luz solar		Helicobacter pylori
Asbesto		

Factores hereditarios en cáncer. Ejemplos de genes Mendelianos

Diversas mutaciones (cambios que se producen en el material hereditario) germinales (gametos óvulos y espermatozoides) localizadas en genes específicos que regulan la división celular, proliferación, diferenciación, reparación de mutaciones, estabilidad del DNA, entre otros, han sido involucradas en la génesis de los diversos tipos de tumores malignos mendelianos (o monogénicos).²⁷ Se estima que alrededor del 5% de todos los tumores malignos tienen un carácter hereditario mendeliano. Este tipo de herencia está bien definido. Una mutación de

alta penetrancia (es aquella en la que un porcentaje elevado de los individuos que han heredado una mutación presentan la enfermedad) en un gen causa generalmente el desarrollo de una neoplasia maligna. Esto se observa comúnmente entre los miembros de una familia de acuerdo a distintos patrones de herencia.²⁸ En los últimos años, se han identificado alrededor de 50 genes implicados en la predisposición hereditaria al cáncer y se han desarrollado técnicas para caracterizar las diversas mutaciones.²⁹ Algunos tumores mendelianos se identifican en la tabla 2.

Tabla 2. Genes con alta penetrancia involucrados en el desarrollo de diversos tumores malignos y síndromes. Mutaciones que afectan la expresión de corte y empalme. El cambio de un aminoácido por otro en los genes arriba descritos están involucrados con el desarrollo de tumores malignos monogénicos (Obtenida de American Cancer Society).

Patología	Incidencia por cada 100 mil vivos.	Gen	Locus
Síndrome de Lynch	1/200-1.000	MSH2MLH1MSH6PMS2	2p21-p223p21.
Cáncer de mama / ovario hereditario (CMOH)	1/500-2.500	BRCA1BRCA2	17q21.113q12.3
Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 1 (MEN 1)	2-10/100.000	MEN1	11q13
Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 (MEN 2)	1/25.000	RET	10q11.2
Poliposis adenomatosa de colon familiar (PAF)	1/6.000-13.000	APC	5q21-q22
Síndrome de PTEN-hamartomas	1/200.000	PTEN	10q23.31
Síndrome de von Hippel-Lindau	1/36.000-45.000	VHL	3p25-p26

Variabilidad genética e importancia de los polimorfismos en la susceptibilidad a desarrollar CaMa (genes de baja penetrancia).

El genoma humano contiene millones de variantes genéticas denominados polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) distribuidos a través de todos los cromosomas, estos polimorfismos son las variantes genéticas más comúnmente encontradas en este genoma, su participación en la susceptibilidad a desarrollar diversas enfermedades complejas varía de persona a persona. Los diversos tipos de tumores se caracterizan por presentar alteraciones genéticas estructurales grandes o pequeñas, tales como inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos, sin embargo, hay otro tipo de anormalidades genéticas que implican cambios de apenas unos cuantos o de un solo nucleótido, los cuales también son importantes en el desarrollo de la enfermedad.³⁰

Se considera un polimorfismo cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población general es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas) comunes en el genoma humano, sin embargo, los más frecuentes son los SNPs.³¹

Generalidades de los SNPs

Estos polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Las diferentes formas de los polimorfismos (llamados alelos) son más frecuentes que las mutaciones (las mutaciones tienen una frecuencia menor al 1%

en la población general). La gran mayoría de los SNPs son bialélicos (tienen dos alelos), esto significa que estas variantes pueden presentar una base nitrogenada por otra. Actualmente, en el “dbSNP” (base pública de datos de SNP: dbSNP’s por sus siglas en inglés) se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de DNA. Los SNPs se presentan en uno de cada 200 pares de bases en el genoma humano. Basados en estos datos, se esperaría que existieran aproximadamente 6 millones de ellos, en la actualidad se conoce un número mayor a lo propuesto.³²

Clasificación de los SNPs

Los SNPs se clasifican en neutros y funcionales. Los primeros no tienen relevancia biológica en la susceptibilidad para desarrollar enfermedades, mientras que los segundos tienen un efecto biológico, y de acuerdo a su localización en la estructura del gen (ya sea en genes que codifican proteínas y no codificantes), estos pueden afectar la expresión génica, la traducción, la codificación, la estabilidad, la génesis de isoformas en los RNAm y proteínas, en la interacción entre microRNAs (miRNAs) y RNAm y causar susceptibilidad para diversas patologías multifactoriales humanas.^{33,34}

Los SNPs localizados en la secuencia codificante se denominan SNPs codificantes sinónimos y no sinónimos, los primeros, cambian un nucleótido pero no un aminoácido, mientras los segundos cambian nucleótido y aminoácido. Estos últimos afectan directamente la estructura y función de la proteína.³³

Los SNPs localizados en la región promotora de los genes influyen en la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción) y dado que estos SNPs afectan la expresión de genes codificantes de proteínas (como de los no codificantes) se denominan SNPs reguladores o rSNP. Los localizados en los intrones, exones y regiones 5' y 3'UTR (regiones no traducidas) se denominan iSNPs. Los ubicados en los intrones modulan las síntesis de isoformas de los RNAm (por lo tanto de proteínas) debido a que pueden localizarse en la unión intrón/intrón y afectar la eliminación/inclusión de intrones o exones, además pueden afectar la eficiencia de corte o empalme, finalmente los srSNPs encontrados en las regiones 5' y 3' UTR pueden afectar la unión de diversas proteínas involucradas en la regulación de la traducción, y dada la cercanía con el promotor, a nivel de DNA, puede influir en la expresión génica, mientras los segundos afectan la estabilidad de los RNAm y la unión entre miRNAs/RNAm (Figura 3)³⁴.

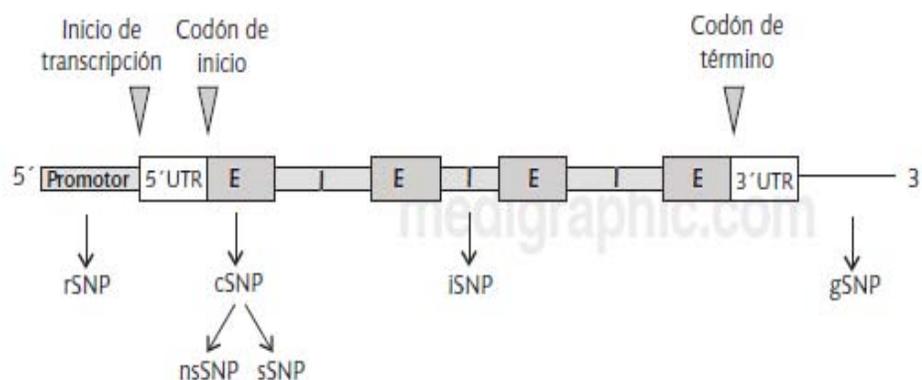


Figura 3. Clasificación funcional de los SNPs localizados en genes que codifican proteínas. Los SNPs funcionales afectan la expresión génica, la traducción de las proteínas, la estructura y función de las proteínas, la vida media de los mRNAs y la unión de diversos microRNAs a sus genes blanco. (Figura obtenida de la revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias).

Ejemplo de polimorfismo genéticos y su asociación con diversas enfermedades multifactoriales

Los rSNPs, srSNPs o SNPs codificantes afectan la expresión, estructura y/o función de las proteínas, la tabla 3 muestra el efecto de los alelos de frecuencia menor (MAF) que alteran diversos procesos biológicos del gen y causan riesgo para desarrollar diversas enfermedades multifactoriales debido a que pueden afectar la función correcta del gen y/o proteína.³⁴⁻³⁹

Tabla 3. Implicaciones funcionales de los SNPs y su impacto con susceptibilidad para desarrollar diversas enfermedades multifactoriales. Los SNPs funcionales localizados en diversos genes confieren riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades multifactoriales dado que alteran la expresión génica, la regulación de la traducción de las proteínas, la estructura y función de las proteínas, la vida media de los mRNAs, y la unión de diversos micro RNAs con sus genes blanco.³⁴

Gen	Localización	Sitio polimórfico	Alelo o haplotipo	Efecto funcional del rSNP o srSNP	Patología asociada
<i>FCRL3</i>	Promotor	-169T/C	C	Crea una mayor afinidad de unión al factor de transcripción NF- κ B, conlleva una sobreexpresión del gen	AR, LEG, AITD ²⁸
<i>TNF-α</i>	Promotor	-376G/A	A	Crea un sitio de unión para el factor de transcripción Oct1, conlleva una sobreexpresión del gen	MC ²⁹
		-308G/A	A	Sin función conocida, pero está relacionado con mayores niveles de expresión génica y de proteína en suero y respuesta a tratamiento	AR, ARJ, LEG, asma, enfermedades infecciosas, etc. ³¹⁻⁴¹
<i>MIF</i>	Promotor	-173G/C	C	Sin función conocida, pero está relacionado con mayores niveles de expresión génica y de proteína en suero	ARJ, cáncer ⁴²
<i>CRTN2</i>	3'UTR	1544G/C 1651G/A	GG	Aumenta la vida media del ARNm del gen <i>CRTN2</i>	Asma ⁵¹
<i>TNFR2</i>	3'UTR	593A/G 598T/G 620 T/C	ATC	Aumenta la degradación del ARNm de <i>TNFR2</i>	Obesidad ⁵²⁻⁵³
<i>HMGCR</i>	Intrón 13	*rs3846662A/G	G	Afecta a la eficiencia del corte y empalme y genera un transcrito que carece del exón 13	Dislipemia ⁵¹
<i>CR2</i>	5'UTR Exón 10 Exón 11	+21A/G L592L G/A S639N G/A S663P A/G	A GGA	Aumenta la actividad transcripcional de <i>CR2</i> Disminuye la eficiencia del corte y empalme y genera un transcrito que incluye al exón 11 de <i>CR2</i>	LEG ⁵²

*rs = referencia del SNP.
AITD: enfermedad tiroidea autoinmune; MC: malaria cerebral.

Fisiopatología del CaMa

El seno femenino consiste principalmente en lobulillos (glándulas productoras de leche), conductos (tubos diminutos que llevan la leche desde los lobulillos al pezón) y estroma (el tejido adiposo y el tejido conectivo que rodean los conductos, los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos). En la mayoría de las pacientes con CaMa, las células afectadas son las que recubren los conductos (cánceres ductuales). Algunos CaMa se originan en las células que recubren los lobulillos (cáncer lobulillar), mientras en un pequeño número de pacientes se origina en otros tejidos de la mama (**Figura 4**).⁴⁰

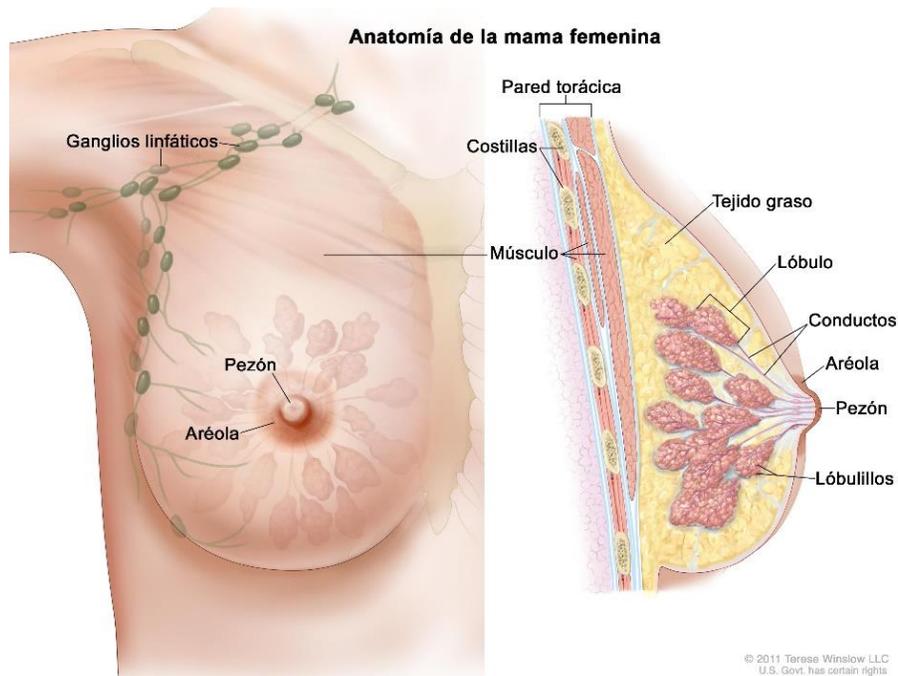


Figura 4. Tejido mamario normal. En la imagen se puede observar con detalle los diferentes tipos de tejido mamario e incluye los conductos y lobulillos, la alteración de estos es la principal causa del desarrollo de CaMa. (Obtenida de American Cancer Society).

Al igual que otras neoplasias malignas, el CaMa inicia cuando una célula normal escapa del control habitual de replicación, división y multiplicación celular. Este fenómeno requiere de una acumulación de mutaciones en genes que regulan la división celular, proliferación, entre otros, dichas alteraciones además aseguran la síntesis y replicación del DNA de manera descontrolada. Ciertas hormonas y algunas sustancias tóxicas pueden promover también el crecimiento celular anómalo hasta lograr el crecimiento del tumor en la mama.⁴¹

Clasificación del cáncer de mama

En general el CaMa se clasifica utilizando los criterios del Comité Americano del Cáncer (American Joint Committee on Cancer o AJCC por sus siglas), conocido como TNM. El sistema TNM se basa en el tamaño o extensión (alcance) del tumor primario (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N) cercanos, y la presencia de metástasis (M).⁴²

1. Tumor primario (T)

- TX. El tumor primario no puede ser evaluado.
- T0. No hay evidencia de tumor primario. Carcinoma in situ (cáncer inicial que no se ha diseminado a tejidos vecinos).
- T1, T2, T3, T4 Tamaño y/o extensión del tumor primario.

2. Ganglios linfáticos regionales (N)

- NX. No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales.
- N0. No existe complicación de ganglios linfáticos regionales (no se encontró cáncer allí).
- N1, N2, N3. Complicación de ganglios linfáticos regionales (número y/o extensión de diseminación).

3. Metástasis distante (M)

- MX. No es posible evaluar una metástasis distante.
- M0. No existe metástasis distante (el cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo).
- M1. Metástasis distante (el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo).

El CaMa se clasifica en cinco estadios (0 a IV). En el estadio I el tumor se encuentra en la mama, mide menos de 2 centímetros y no se ha diseminado fuera de la misma. A partir del estadio II se ubica en ganglios linfáticos axilares, estos ganglios son de pronóstico relevante, ya que de las lesiones, se determina la evolución y supervivencia de la paciente.⁴² Los índices de supervivencia relativa a cinco años, según el estadio del cáncer son los siguientes: I-98%, IIA-88%, IIB-76%, IIIA-56%, IIIB-49% y IV-16%.⁴³

Genes Mendelianos en CaMa

Como se ha mencionado anteriormente, en el desarrollo del CaMa intervienen numerosos factores, entre ellos los SNPs. Cerca de un 5% de todos los CaMa se deben a herencia mendeliana⁴⁴

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 se asocian con el desarrollo de CaMa hereditario y con un 10% de los casos de cáncer de ovario. Las mutaciones en ambos genes son de alta penetrancia, es decir, un porcentaje elevado de los individuos que heredan una mutación en estos genes presentan la enfermedad.⁴⁴

Genes *BRCA1* y *BRCA2*

El gen BRCA1 se localiza en el cromosoma 17 (17q21), mientras que el gen BRCA2 se ubica en el cromosoma 13 (13q12)⁴⁵. El gen BRCA1 está formado por 24 exones, extendiéndose a lo largo de 100 kb de DNA genómico, y su RNAm consta de 5,592 nucleótidos. El gen BRCA2 es de mayor tamaño, su transcrito es de 11,385 nucleótidos distribuidos a lo largo de 70 kb de DNA genómico y está compuesto de 27 exones. El transcrito se expresa en mama, ovario y otros tejidos⁴⁶. El rol que juega el gen BRCA1 en la reparación del DNA es muy importante, también se ha reportado que regula la transcripción del DNA, regulación de ciclo celular y apoptosis. La proteína BRCA2 presenta dominios de activación transcripcional y de remodelado de la cromatina, además ha sido implicada en la reparación del DNA y regulación de la actividad de RAD51, proteína necesaria para la recombinación homóloga que conduce a la reparación de las roturas de doble cadena del DNA.⁴⁷

Las proteínas de ambos genes aunque muestran escasa homología entre sí, actúan en la reparación del DNA, su inactivación origina inestabilidad genética, lo que conlleva a la aparición del tumor por acumulación de mutaciones en otros genes. Debido a sus funciones de mantenimiento de la integridad del genoma, BRCA1 y BRCA2 se consideran genes supresores de tumor.

Diversos estudios epidemiológicos estiman que sólo entre el 15 y el 20% del aumento de riesgo de CaMa se debe a mutaciones en BRCA1 y BRCA2⁴⁸⁻⁴⁹. Otros datos muestran que la mayoría de la agregación familiar está causada también por otros genes mutados, cada uno de ellos asociados con riesgos menores y su interacción con factores medioambientales o del estilo de vida terminan por desencadenar esta patología.

Se estima que la fracción de pacientes con Cáncer de Mama causada por mutaciones en BRCA1 y BRCA2 es de apenas 1 a 2% para cada gen⁵⁰ y que las frecuencias poblacionales totales de los alelos mutados en poblaciones anglosajonas son 0,05-0,26% para BRCA1, y 0,08-0,34%, para BRCA2.^{51,52}

Genes de baja penetrancia en CaMa

Aunque entre un 5 y un 10% de todos los CaMa se originan por mutaciones de alta penetrancia en BRCA1 y BRCA2, el porcentaje restante se desencadena por la combinación del factor ambiental y genes de baja penetrancia, es decir, la combinación de polimorfismos de mediano riesgo y el medioambiente adverso son los factores involucrados en su desarrollo.⁵³⁻⁵⁶

El análisis de estas variantes polimórficas ha sido y sigue siendo la única estrategia viable para identificar estos genes de baja penetrancia.⁵⁷ Así, mediante diferentes tipos de estudios de asociación de genes candidato o estudios del genoma completo GWAS, por sus siglas en inglés (Genome-Wide Association Study) y en menor medida mediante estudios de ligamiento, han sido empleados para identificar una gran cantidad de polimorfismos, principalmente en genes que intervienen en funciones celulares como la reparación del DNA o el metabolismo de carcinógenos (tanto endógenos como exógenos), aunque también en genes supresores de tumores y oncogenes.⁵⁸ Cada una de estos genes con alteraciones de baja penetrancia confieren un riesgo pequeño para el desarrollo de este tipo de tumor⁵⁹.

Estudios recientes, utilizando el microarreglo de Illumina iCOGS (Collaborative Oncological Gene-environment Study), específicamente diseñado para genotipificar un gran número de individuos, detectaron 41 nuevos *loci* relacionados con el riesgo a padecer CaMa. SNPs localizados en 4 *loci* (rs4245739 en 1q32.1, rs6678914 en 1q32.1, rs12710696 en 2p24.1, rs11075995 en 16q12.2) han sido involucrados con CaMa, ER-negativo en poblaciones europeas.⁶⁰

Por otro lado, otra variante localizada en la misma región (rs2290854) 1q32 también fue identificada asociada con riesgo para desarrollar CaMa en portadores de mutaciones en BRCA1⁶¹, y la variante (rs9348512) identificada en la región 6p24 también fue encontrada asociada con CaMa mediante análisis de genes candidatos, específicamente, en pacientes con CaMa portadores de mutaciones en BRCA2.⁶²

El proyecto COGS incluyó el mapeo fino de más de 10 regiones genómicas fuertemente asociadas con CaMa, así como variantes asociadas adicionales que pudieran influir en la heredabilidad. Dichos estudios identificaron tres *loci* independientes en la región previamente reportada 11q13 y dos *loci* de susceptibilidad en la región 5p15. Estos hallazgos aumentaron el número de genes identificados asociados con CaMa.⁶³

En la figura 5 se resumen los *loci* de susceptibilidad en CaMa y las proporciones estimadas de riesgo familiar relativo (FRR) atribuibles a las diferentes variaciones genéticas dentro del CaMa familiar. Otros SNPs localizados en diversos genes han sido asociados con CaMa, estos genes han sido identificados mediante estudios de gen candidato y GWAS, entre ellos se encuentran *TOX3*, *NRBF2*, *SETBP1*, *RNF115*, *PDZK1*, entre otros.⁶⁴

Pocos estudios de genes candidato relacionados con el sistema inmunológico han sido evaluados en CaMa. Debido a que el sistema inmunológico es determinante para el desarrollo de este tipo de tumor, es necesario evaluar genes del sistema y determinar el impacto de variantes genéticas y su relación con la patología multifactorial.

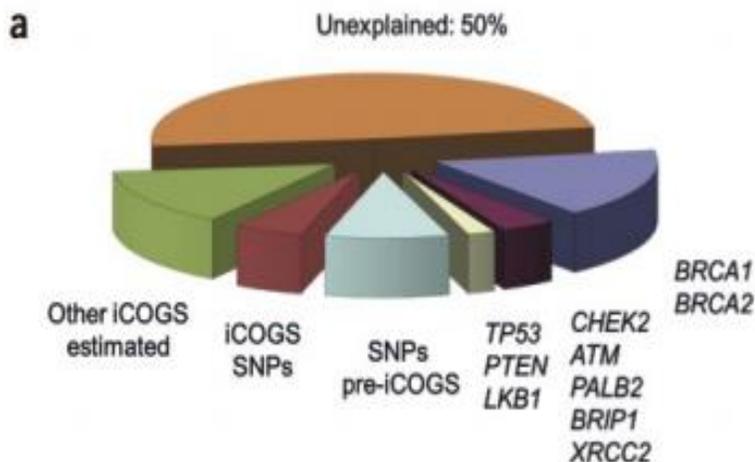


Figura 5. Proporciones estimadas del FRR atribuibles a los distintos tipos de variación genética. Los genes listados se refieren a: genes con mutaciones conocidas causantes de la enfermedad (*BRCA1* y *BRCA2*), otros genes que confieren alto riesgo (*TP53*, *PTEN* y *LKB1*), y genes de riesgo moderado (*CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *BRIP1*, *XRCC2*). Pre-iCOGS SNPs se refiere a la contribución de todos los SNPs asociados con este tipo de cáncer. (Obtenida de Biblioteca digital FCEN-UBA.)

La familia de genes MIC

La familia de genes MIC (class I-Chain-related) se compone de dos genes funcionales: *MICA* y *MICB*, además de cinco pseudogenes adicionales: *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF* y *MICG*, los cuales no codifican para alguna proteína.⁶⁵

El descubrimiento de esta familia de genes se debió a dos grupos de trabajo distintos; uno encabezado por Bahram en 1994, quien les da el nombre de genes MHC class I-Chain-related genes (MIC) y el tutelado por Leelayuwat, que en 1994 descubren la familia de genes, pero les dan el nombre de PERB2. Posteriormente, por convención internacional se acuerda nombrarlos de manera genérica como genes *MIC*.^{66, 67}

Los genes MICA y MICB se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano, cerca de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) o antígeno leucocitario humano HLA clase B (*HLA-B*). El gen MIC A codifica para un transcrito de 1,382 bases, mientras, MIC B codifica para un RNAm de 2,376 nucleotidos, ambos producen las proteínas MIC A y B, respectivamente. **(Figura 6)**⁶⁸

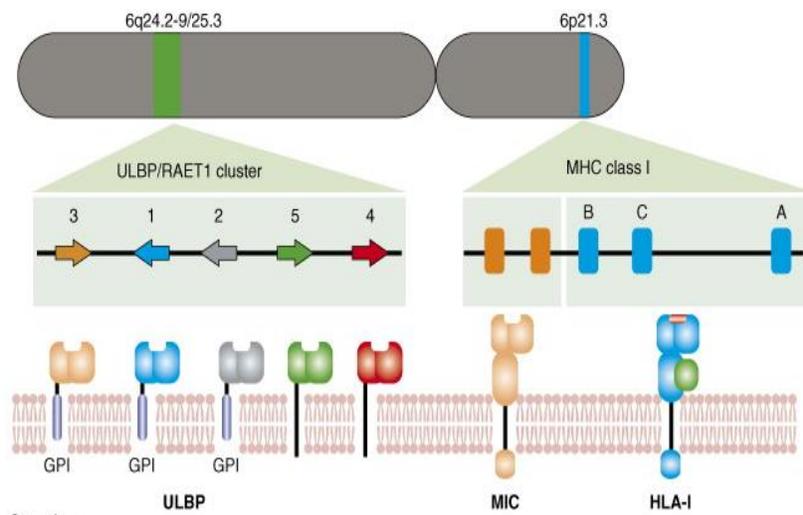


Figura 6. Localización cromosómica de los genes MIC. Localización de los genes MIC en el cromosoma 6. Se pueden observar ambas proteínas de MIC en la membrana celular y la familia ULB. (Obtenida de la Biblioteca digital FCEN-UBA)

Variabilidad genética en *MIC B* y su relación con diversos tipos de cáncer

Se han reportado diversos SNPs y otros tipos de polimorfismos en estos genes; Por ejemplo *MIC A* cuenta con 68 polimorfismos distintos, mientras, *MIC B* tiene 28 SNPs reportados, el significado de estos polimorfismos aún no es del todo claro,⁶⁹ sin embargo, hay estudios que han evaluado el papel de estos polimorfismos en diferentes tipos de tumor, principalmente en tumores epiteliales. Actualmente, se han identificado nuevos hallazgos del papel que juegan estos genes en el desarrollo de diferentes tumores, como el de cáncer cérvico-uterino, un estudio realizado por Jumnainsong, y Cols., con 100 mujeres sanas y 99 pacientes diagnosticadas con cáncer cérvico-uterino, determinó el impacto de 15 polimorfismos en el gen *MIC B* y su asociación con el desarrollo de esta enfermedad. Uno de ellos *MICB* * 00502, se asoció con protección a desarrollar cáncer cervical.⁷⁰

Koop y Cols., también evaluaron el rol de diferentes alelos en *MIC A* y *MIC B*, y la progresión tumoral en pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal. Los estudios mostraron dos alelos en *MIC A* asociados con esta enfermedad.⁷¹ La supervivencia relacionada con el tumor en pacientes con cáncer colorrectal fue reducido significativamente en presencia del alelo *MICA*-TM A4 ($p = 0,015$). Por tanto, con este trabajo se puede sugerir que *MIC A* influye en la progresión del tumor y supervivencia a mediano plazo en los pacientes con cáncer colorrectal, lo que indica un papel importante en la predisposición inmunológica innata del paciente (*MIC A/ B*)⁷¹

Por último, Cho y Cols., evaluaron la importancia del papel de los ligandos de NKG2D (MIC A/B, ULBP) en el desarrollo del cáncer cervical, una base de datos de más de 600 cortes histológicos de este tipo de tumor en diferentes estadios determinaron que la expresión de MIC A/B y ULBP1 son mayores en pacientes con un alto grado de desarrollo tumoral, que en pacientes con bajo grado ($p < 0,001$, $p = 0,012$, $p = 0,013$). Entre estos marcadores, la expresión de ULBP1 era significativamente diferente dependiendo de la etapa del tumor ($p = 0,010$) y el tamaño del tumor ($p = 0,045$).⁷²

Algo notable fue que la expresión de ULBP1 correlacionó con MIC A / B ($p < 0,001$) y ULBP2 ($p = 0,002$) lo que indica que la alta expresión de cualquiera de estos marcadores (ULBP1 o MIC A / B y ULBP1) o combinados, son un indicador en cáncer de cuello uterino, lo que sugiere su utilidad potencial como pruebas de pronóstico en evaluación clínica.⁷²

Como se puede observar, es importante el estudio de los genes *MIC* ya que diversas publicaciones indican que los polimorfismos en *MIC A/B*, podrían ser un factor importante para el desarrollo tumoral. Además, MIC A /B muestran una expresión alta en diversos tipos de cáncer, como de ovario, colorrectal y mama.^{73, 74}

Función de las proteínas MIC A y MIC B en las células del sistema inmunológico

La expresión de MIC A y MIC B en condiciones normales está restringida al epitelio intestinal con limitada expresión a nivel membranar.⁷⁵ En condiciones patológicas como cáncer, infección, hipoxia, daño del DNA y por expresión de proteínas de choque térmico, MIC A y MIC B son inducidos por mecanismos aún poco comprendidos.⁷⁶ La expresión aumentada de MIC A y MIC B en respuesta al estrés fisiológico es reconocida por los receptores activadores NKG2D presentes en células NK y linfocitos T, que actúan como un mecanismo de vigilancia inmunológica.⁷⁷

Sin embargo, a pesar de estas condiciones, el receptor activador NKG2D por sí mismo puede estimular respuestas efectoras por parte de células NK y linfocitos T de manera no dependiente del receptor TCR en las células con estrés fisiológico que expresan las proteínas MIC A/MIC B ⁷⁸.

Las evidencias experimentales muestran que la interacción de las proteínas de estrés fisiológico MIC B con su receptor activador NKG2D representa un mecanismo muy importante en la vigilancia inmunológica que permite el reconocimiento y la posterior eliminación de las células tumorales, así como reversión del desarrollo de los tumores si se encuentran en estadio temprano.⁷⁹

Señalización de las proteínas MIC A y MIC B

MIC A / B y el receptor activador NKG2D

El receptor NKG2D es un homodimero de proteína activadora presente en células NK y células T, con receptores alfa-beta y también en ciertas subpoblaciones de linfocitos T con receptores gama-delta en asociación con la molécula adaptadora DAP10.⁸⁰

En humanos, los ligandos que se unen al receptor activador NKG2D son principalmente miembros de la familia MIC (MHC class I Chain related genes) que incluye a las proteínas MIC A y MIC B y a 6 miembros de otra familia que se unen a la proteína UL16 (ULBP; por sus siglas en inglés). Figura 7.⁸¹

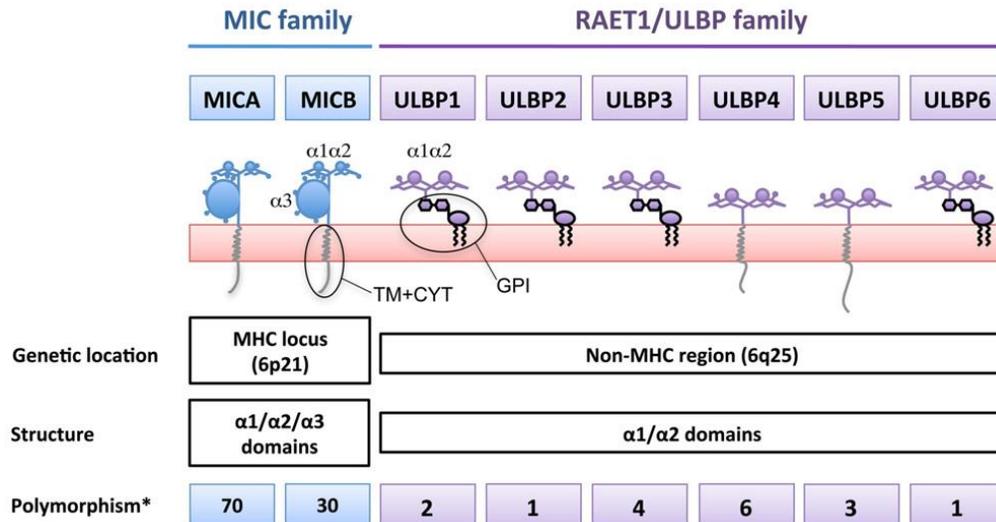


Figura 7. Las dos familias genéticas de ligandos para NKG2D. Las dos familias genéticas de ligandos para NKG2D se localizan en diferentes brazos del cromosoma 6. (Obtenida de Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México, 2008)

Los ligandos de NKG2D son casi indetectable en tejido normal, pero son inducidos en la superficie de la célula por varios tipos de estrés, como infección viral. También se ha detectado que este ligando se expresa en diversas tipos celulares neoplásicos, como el de colon, hígado, ovario, mama y neoplasias hematológicas.⁸²

Como se sabe, durante la carcinogénesis ciertas células desarrollan la capacidad de evadir la inmunidad antitumoral provocando que algunas de ellas evadan la respuesta inmunológica y por consiguiente no se eliminen. El escape a la vigilancia inmunológica antitumoral mediada por el reconocimiento del receptor NKG2D puede darse por el silenciamiento de este receptor.

Importancia de MIC A/B en los tumores

Los productos de los genes MIC A y MIC B tienen una función muy importante en la respuesta inmunológica ya que participan en la señal de alerta ante un proceso infeccioso, un proceso inflamatorio provocado por agentes patógenos como bacterias y virus, así como por daño al DNA causado por radiación ultravioleta o por agentes genotóxicos y por transformación tumoral.⁸³

La unión entre el receptor NKG2D y las proteínas MIC A/B desencadena respuestas citolíticas, además de secretoras de citocinas por parte de células NK y células T CD8 citotóxicas, aún bajo condiciones de estimulación no óptimas del receptor TCR. Asimismo, se ha observado en células tumorales una disminución

de las proteínas de clase I del HLA, fenómeno por medio del cual las células transformadas evitan ser reconocidas y eliminadas por células NK y linfocitos T citotóxicos (**Figura 8**).⁸⁴

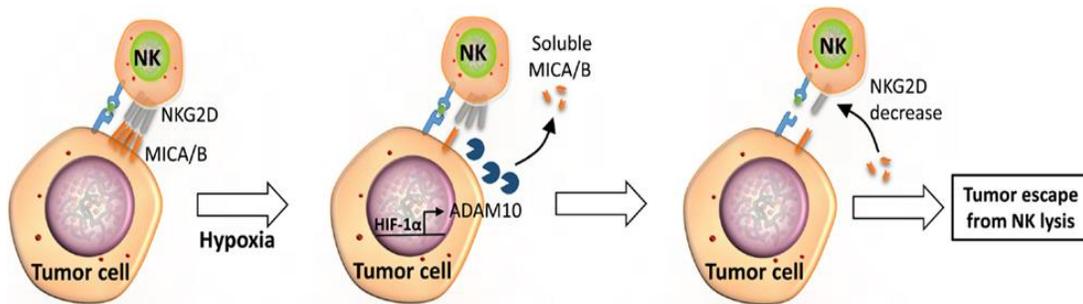


Figura 8. Papel del sistema MIC A/B-NKG2D en la inmunovigilancia y en el escape tumoral. La unión de MIC A/B con su receptor NKG2D da como resultado una respuesta efectora por parte de células NK y linfocitos T, desencadenando efectos antitumorales y citotóxicos característicos de estas células y la eliminación tumoral. (Obtenida de Biblioteca digital FCEN-UBA).

Una vez que se da la interacción MIC A/B con el receptor NKG2D en las células efectoras se desencadenan los efectos antitumorales y citotóxicos característicos de estas células encaminados a la eliminación tumoral.^{85,86} Por otra parte, la secreción de formas solubles de MIC A/B por células tumorales ha sido propuesto como un mecanismo de escape inmunológico ya que se ha demostrado que este proceso inhibe el reconocimiento entre célula tumoral-célula efectora por la saturación de los receptores NKG2D en células NK y linfocitos T citotóxicos.⁸⁷

JUSTIFICACIÓN

El CaMa representa la primera causa de muerte por tumores malignos en nuestro país. La etiología del CaMa no se conoce del todo. Diversas evidencias experimentales indican la participación de factores de riesgo ambientales y genéticos involucrados en su desarrollo. El factor genético tiene un papel fundamental en el desarrollo de esta patología multifactorial. Hasta el momento no se ha publicado ningún artículo acerca del papel de diversos polimorfismos en muestras de CaMa a nivel mundial, por lo cual, este proyecto buscó determinar si existe una asociación entre los polimorfismos en el gen MICB) y el riesgo a la a desarrollar CaMa. Con lo cual este proyecto ayudará a generar conocimiento básico importante que permitirá probablemente utilizarse para identificar individuos genéticamente susceptibles para CaMa.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si los SNPs, (rs3828916 C/G y rs2516498 C/G ubicados en la región 5'UTR, rs2844498 C/T ubicado en el intrón 1 y, el rs3132468 C/T ubicado en el intrón 4) en el gen MIC B, confieren riesgo para desarrollar cáncer de mama.

Objetivos particulares

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs (rs3132468 C/T, rs3828916 C/G, rs2844498 C/T, rs2516498 C/G) del gen MIC B en una muestra de casos con CaMa y controles.
- Determinar si los polimorfismos evaluados en este gen confieren riesgo o protección a desarrollar CaMa.

HIPÓTESIS

- Los polimorfismos (rs3132468 C/T, rs3828916 C/G, rs2844498 C/T, rs2516498 C/G) del gen MIC B están asociados con susceptibilidad a desarrollar CaMa en un grupo de pacientes Mexicanas.

Diseño de estudio

Observacional, comparativo, transversal y ambispectivo.

Muestras

Población de estudio

Este estudio incluyó 300 pacientes con CaMa tomadas del servicio de oncología del Hospital Juárez de México (HJM). Las pacientes con CaMa fueron diagnosticadas histopatológicamente por oncólogos del HJM. Antes de la toma de muestra se les explicó el proyecto y sus objetivos, estuvieron de acuerdo con los objetivos, se procedió a firmar la carta de consentimiento informado.

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

A su vez los controles se obtuvieron del servicio de banco del Hospital Juárez de México (240 controles). Los individuos elegidos para el estudio como controles fueron mujeres con un rango de edad de 35 a 64 años sin antecedentes heredofamiliares al menos en tres generaciones de CaMa.

Criterios de inclusión de casos

- Tener diagnóstico histopatológico de CaMa sin importar el estadio.
- Mujeres mayores de 18 años de edad.
- No tener relación consanguínea con ningún paciente seleccionado previamente.
- Haber nacido en México.
- Pacientes con cualquier otra enfermedad crónica.

Criterio de exclusión

- Pacientes que no quisieron participar en el estudio.
- Pacientes que presentan algún tipo de infección, como hepatitis, VIH, etc.

Criterios de eliminación

- Muestras coaguladas, mal procesadas o perdidas.
- Pacientes que decidieron retirar su muestra del estudio.

Criterios de inclusión para controles

- Mujeres de entre 35 a 65 años de edad.
- No padecer o haber padecido CaMa o cualquier otro tumor sólido maligno en tres generaciones (abuelas y madres).
- No tener relación consanguínea con ningún paciente u otro control seleccionado previamente.
- Haber nacido en México.
- Mujeres no obesas, o que tuvieran otra enfermedad con algunos rasgos de tumor, como angiogénesis, hiperproliferación, etcétera e incluyó no tener artritis reumatoide, retinopatía diabética, etcétera.

Criterio de exclusión

- Controles que no quisieron participar en el estudio.
- Controles que presentaron algún tipo de infección como hepatitis, VIH, etc.
- Individuos que hayan presentado algún tumor maligno en algún momento de su vida.
- No cumplir con los criterios de inclusión.

Criterios de eliminación

- Muestras coaguladas, mal procesadas o perdidas.
- Controles que decidieron retirar su muestra del estudio.

METODOLOGÍA

Extracción de DNA a partir de sangre venosa periférica

Tanto a los casos como a los controles se les tomó una muestra de 5 micro Litros (mL) de sangre periférica mediante venopunción. A partir de su muestra se extrajo el DNA nuclear. La colección de la muestra se hizo en tubos que contuvieron EDTA como anticoagulante. El kit empleado para la extracción de DNA fue el Invisorb Blood Universal kit; Stratec molecular. El procedimiento realizado fue el sugerido por el proveedor, con pequeños cambios. Se describe brevemente:

Extracción de material genético

1. El tubo con 5 mL de sangre periférica fue centrifugado a 2500 r.p.m., durante 10 minutos para obtener la capa de leucocitos
2. La capa de leucocitos fue removida y depositada en un tubo nuevo, limpio, de 15mL, posteriormente se agregaron 13 mL de buffer EL de lavado (el cual siempre estuvo a 4°C), la mezcla se homogenizó y el tubo se centrifugó durante 10 minutos a 3500 r.p.m, este paso se realizó de 2 a 3 veces según la contaminación con células rojas.

3. Una vez obtenido el botón limpio de leucocitos se agregaron 3 ml de buffer HL y 30 µl de proteínas K, posteriormente se incubó durante 10 minutos en baño maría a 60°C. Después de la incubación, se agregó alcohol isopropílico a la mezcla y se agitó vigorosamente en vórtex con la finalidad de precipitar el DNA obtenido de la lisis de glóbulos blancos.

4. El tubo con el DNA se centrifugó a 3500 r.p.m durante 10 minutos, posteriormente, se procedió a eliminar el sobrenadante, y se agregaron 1.5 ml de etanol al 70% (proveniente de reactivo grado biología molecular).

5. Posteriormente, se dejó deshidratar el DNA de cada muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente.

6. Hecho esto, se procedió a colocar el DNA en tubos eppendorf de 1.6 mL con 600 microlitros de buffer U (buffer que mantiene al DNA estable durante varios meses e incluso años).

7. Posteriormente, el tubo con el DNA se incubó durante una hora a 60°C en un termo shaker con agitación constante.

Cuantificación del DNA

Una vez que se obtuvo la disolución del DNA en Buffer U, se procedió a cuantificar la cantidad de DNA de cada muestra, tanto de casos como de controles. Para lograr esto se procedió a hacer lecturas de la densidad óptica (DO) o absorbancia mediante un espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm.

El cociente de la DO 260/D.O.280, se utilizó para determinar el grado de pureza, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.7 y 2.0. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación de los productos de DNA de las muestras.

La muestra stock de DNA se almacenó en tubos Eppendorf a -20 °C con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA, como su posible contaminación por microorganismos.

Diluciones del DNA nuclear

Una vez que conocimos el valor relativo de DNA en cada muestra (caso-control), se procedió a hacer diluciones con agua libre de DNAsas a $5\text{ng}/\mu\text{l}$ en un volumen final de $200\ \mu\text{L}$, por medio de la siguiente formula:

Concentración de muestra ηg		$1\mu\text{l}$
$5\eta\text{g}$		$X\ \mu\text{l}$

Las diluciones de DNA se almacenaron en tubos Eppendorf a $-20\ ^\circ\text{C}$ con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación por microorganismos.

Colocación de las muestras de DNA de los casos y controles en placas de 96 pozos

Una vez que se hicieron las diluciones de DNA a $5\text{ng}/\mu\text{l}$, se procedió a colocar en una placa maestra de 96 pozos las diluciones de cada caso-control.

La placa maestra contuvo 4 veces la concentración necesaria de DNA para una reacción, el objetivo fue dividir esta placa maestra en 4 placas adicionales para realizar el análisis de las 4 sondas en cada paciente.

Una vez colocadas las muestras (caso-control) en cada placa se procedió a colocar los reactivos necesarios para una reacción de PCR en tiempo real.

Cada pozo en las placas contuvo lo siguiente:

REACTIVO	VOLUMEN
Muestra de DNA	2 μ L previamente colocado en los pozos y deshidratado
Sondas, primer	0.065 μ L
Agua	2.435 μ L
Master mix 2X	2.5 μ L
	Volumen final: 5 ml

Las placas de los pacientes fueron colocadas en el PCR de tiempo real BioRad CFX96 Real Time System (C1000 Thermal Cycler).

Condiciones del PCR en tiempo real

Los amplicones y liberación de la fluorescencia de las sondas TaqMan que evaluaron los 4 SNPs (rs3132468 A/G, rs3828916 C/A, rs2844498 A/G, rs2516498 C/G) se obtuvieron bajo las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones del PCR en tiempo real

	Temperatura °C	Tiempo
Pre-PCR	50	2 minutos
	95	8 minutos
PCR	94	35 segundos
	60	60 segundos
	4	5 minutos
Post-PCR	4	∞

Análisis de discriminación alélica de SNPs en el gen MIC B mediante el ensayo 5' exonucleasa.

La técnica que se empleó para el análisis de SNPs fue la 5' exonucleasa, la cual analiza variantes bialélicas de los SNP (rs3132468 A/G, rs3828916 C/A, rs2844498 A/G, rs2516498 C/G) de MIC B mediante un par de sondas fluorescentes TaqMan. El vial incluye dos sondas, una para cada alelo de los SNPs. Cuando las sondas son 100% complementarias al lugar donde se encuentra los dos alelos de los SNPs entonces se unen, posteriormente a esto, la

actividad 5' exonucleasa de la Ampliqa Gold comienza a degradar el extremo 5' donde se encuentra los fluoróforos Vic o Fam (fluoróforos de las sondas localizadas en los extremos 5' de las sondas) (**Figura 9**). La cuantificación de la fluorescencia de los alelos se puede observar mediante un plot de discriminación alélica en tiempo real (**Figura 10**). El par de sondas contiene en sus extremos 5' y 3' lo siguiente:

- Una de ellas, en el extremo 5' contiene el fluoróforo Vic y en el 3'MGB (Quancher).
- La segunda contiene en su extremo 5' el fluoróforo Fam y en el extremo 3'MGB.

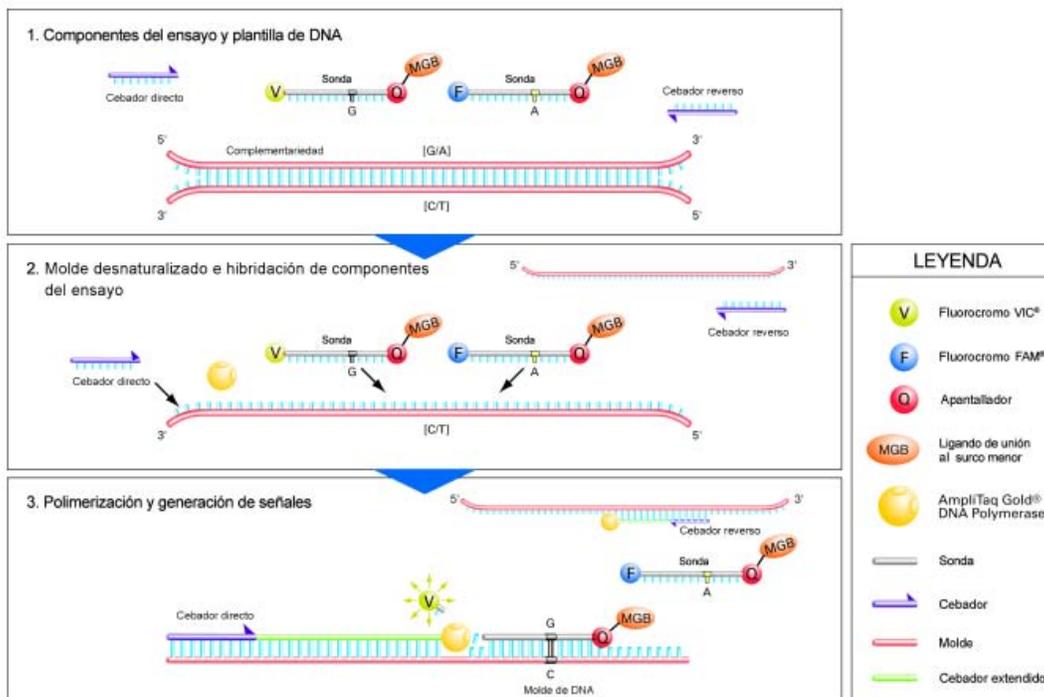


Figura 9. Técnica de genotificación con sondas TaqMan y PCR en tiempo real. Las sondas contienen los fluoróforos (Vic y Fam) en el extremo 5', a su vez cada sonda identifica un alelo, cuando las sondas son 100% complementarias a lugar donde se encuentra los alelos de los SNPs, entonces se unen, posteriormente a esto, la actividad de 5' exonucleasa de la Ampliqa Gold comienza a degradar el extremo 5' donde se encuentra Vic o Fam. (Tomada de Applied Biosystems StepOne™).

La fluorescencia de cada una de las sondas fue detectada mediante el programa Bio-Rad CFX Manager. Los datos obtenidos se analizaron con un software especializado, este trazó las intensidades normalizadas (R_n) de los fluoróforos respecto al control sin DNA (NTC; control negativo) en cada pozo en una gráfica de discriminación alélica, lo que contrasta las intensidades de ambas sondas específicas de alelo.

Por último, el software de Bio-Rad agrupa de manera algorítmica los datos de las muestras y asigna un genotipo para cada DNA de casos-controles con el fin de hacer una discriminación alélica en cada muestra (Ver figura 10). La agrupación de datos puede variar a lo largo del eje horizontal (alelo 1), el eje vertical (alelo 2) o diagonal (alelo 1/alelo 2). Esta variación se produce a raíz de las diferencias en la intensidad de fluorescencia respectiva de ambos fluoróforos después de la amplificación de PCR.

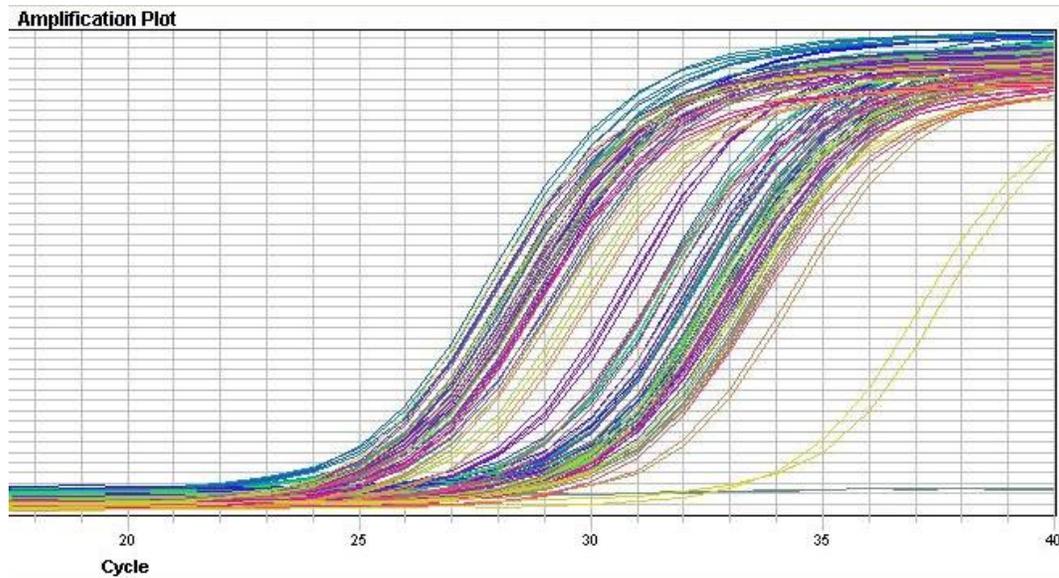


Figura 10-. Plot de Discriminación alélica. En esta imagen se muestran las intensidades normalizadas (R_n) de los fluoróforos de cada caso-control.

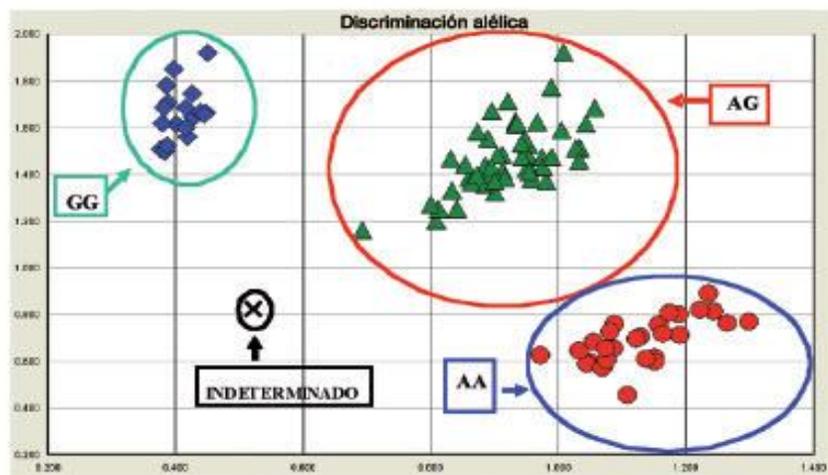


Figura 11. Ejemplo de gráfica de discriminación alélica. En el eje de las Y se observan los individuos homocigotos (GG), heterocigotos (GA) en la parte media del plot, y en el eje X se observan los homocigotos para el genotipo AA.

Análisis estadístico.

El programa Finetti se empleó para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg (E-HW) entre genotipos de casos y controles. Los genotipos de los 4 SNPs de MIC B se obtuvieron por conteo directo. Se empleó la prueba estadística de X^2 para obtener los valores de OR, IC 95% y p . Se emplearon tablas de contingencia de 2X2 (para alelos) o 2X3 (para genotipos) para obtener los valores antes mencionados. Los programas que evaluaron fueron EpiDat y Epi-Info.

Evaluación *in silico* de la función de los 4 SNP de MIC B

Dado que los 4 SNPs evaluados en este trabajo se encuentran distribuidos a través del gen MIC B, se utilizó el programa SNP Function Prediction (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.htm>) para evaluar su posible función y determinar si pueden tener alguna relevancia funcional y afectar la estructura del gen, RNAm o proteína.

RESULTADOS

La evaluación del E-HW de los genotipos de los 4 SNPs en el gen MIC B mostraron que: Los SNPs rs284449 y rs2516498 estuvieron en E-HW ($p>0.05$), mientras los SNPs rs3132468 y rs3828916 estuvieron en desequilibrio de HW ($p<0.05$). Los resultados de frecuencias genotípicas y alélicas de los 4 SNPs de MIC B, así como los estudios de asociación genética de estos mismos polimorfismos se describen en las tablas 5 a la 8. Nuestros resultados indican que las frecuencias genotípicas y alélicas en casos con CaMa y controles son similares. De modo que no hay diferencias estadísticamente entre la enfermedad oncológica y los controles, sugiriendo que los SNPs de MIC B no contribuyen al desarrollo de CaMa en nuestra población de estudio.

TABLA 5. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS, Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 2844498 EN EL GEN MIC B EN CASOS Y CONTROLES

GENOTIPOS DE SNP 2844498 C/T EN MIC B	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)	OR	IC 95%	P
TT	110(50.9)	100 (49)			
CT	88(40)	80 (39)	1.0	0.66-1.50	1.0
CC	19(9.1)	24 (12)	0.7	0.37-1.39	0.33
ALELOS					
T	308(70.6)	280 (68)			
C	126(29.3)	128 (31)	0.89	0.67-1.20	0.46

TABLA 6. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS, Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 2516498 EN EL GEN MIC B EN CASOS Y CONTROLES

GENOTIPOS DE SNP 2516498 C/G EN MIC B	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)	OR	IC 95%	P
GG	101(47.6)	103 (50)			
CG	92(43.3)	88(43)	1.0	0.71-1.59	0.75
CC	19(8.9)	14(7)	1.3	0.65-2.90	0.39
ALELOS					
G	294(69.3)	294 (72)			
C	130(30.6)	116 (28)	1.1	0.83-1.51	0.45

TABLA 7. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS, Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 3132468 EN EL GEN MIC B EN CASOS Y CONTROLES

GENOTIPOS DE SNP 3132468 C/T EN MIC B	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)	OR	IC 95%	P
TT	154(72.3)	137(68)			
CT	48(22.5)	49(24)	0.87	0.55-1.38	0.56
CC	11(5)	16(8)	0.61	0.27-1.36	0.22
ALELOS					
T	356 (83.5)	323 (80)			
C	70 (16.5)	81 (20)	0.78	0.55-1.11	0.18

TABLA 8. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS, Y ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL SNP 3828916 EN EL GEN MIC B EN CASOS Y CONTROLES

GENOTIPOS DE SNP 3828916 C/G EN MIC B	CASOS N (%)	CONTROLES N (%)	OR	IC 95%	P
CC	134 (75)	147 (73.5)			
CG	40 (23)	38 (19)	1.15	0.69-1.90	0.57
GG	4(2)	15 (7.5)	0.29	0.09-0.90	0.02
ALELOS					
C	308(86.5)	332 (83)			
G	48(13.4)	68 (17)	0.76	0.51-1.13	0.18

Los estudios de evaluación *in silico* de los SNPs en MIC B indican que los SNPs rs284449 y rs3132468 no tiene ninguna función relevante en la estructura del gen MIC B ni en la estructura y/o función de RNAm o proteína. Los resultados también revelaron que el alelo C del SNP rs2516498G/C de MIC B, predice crear un sitio de unión para el factor de transcripción ETS (Core Match Score; 0.95, y Matrix Match Score 0.90) y NFAT (Core Match Score; 1.0, y Matrix Match Score; 0.99). El alelo C de este SNP predice crear un sitio de unión para la proteína SF2/ASF2, la cual regula la eficiencia del corte y empalme. Por otro lado, el alelo G del SNP rs3828916C/G de MIC B predice crear sitios de unión para algunos factores de transcripción y proteínas que regulan el corte y empalme alternativo. En el primer caso, el alelo G crea un sitio de unión para el factor de transcripción USF (Core Match Score; 0.86, y Matrix Match Score 0.87) y este mismo alelo crea un sitio de unión para las proteínas SF2/ASF2 y SF2/ASF1 que regulan el corte y empalme.

DISCUSIÓN

El CaMa es una enfermedad multifactorial influenciada por factores genéticos y ambientales de riesgo. El gen MIC B, que codifica para MIC B juega un papel relevante en la inmuno-vigilancia tumoral, ya que representa una señal de alerta ante un ataque infeccioso, un proceso inflamatorio, por daño al DNA o por transformación tumoral.⁸⁸

La evidencia experimental demuestra que la interacción de la proteína de estrés fisiológico MIC B, con su receptor activador NKG2D, permite el reconocimiento y eliminación de células tumorales siempre y cuando se encuentren en un estadio temprano.⁸⁰ Se ha observado que algunas líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer de cérvix y leucemia mieloide, secretan la forma soluble de esta proteína (sMIC B), lo que contribuye al escape del reconocimiento por el sistema inmune.⁸⁹

En nuestro estudio, ninguno de los 4 SNPs de MIC B mostraron una asociación con el desarrollo de CaMa. Dos de ellos (rs3132468 y rs3828916), mostraron un desequilibrio de Hardy-Weinberg, en la prueba de HW. La desviación del equilibrio se ha considerado como un indicador de que: los alelos no segregan de forma independiente, el apareamiento no es al azar, o que los alelos reflejan una mutación reciente que aún no ha alcanzado el equilibrio.⁹⁰

Las desviaciones de E-HW pueden deberse a múltiples razones, la mayoría de las cuales son:

1. Inadecuado tamaño muestra, para diversos o todos los genotipos estudiados en una población.⁹¹
2. Variaciones no aleatorias de estas variantes dentro de la estructura genética de la población estudiada, e incluye endogamia, mezclas de diferentes grupos étnicos con diferentes frecuencias alélicas del marcador estudiado y una inadecuada selección dentro de ella.
3. Presencia no cuantificada de variables de confusión, como por ejemplo la edad, el género, entre otros.
4. Desequilibrio de ligamiento entre marcadores genéticos evaluados en los diversos estudios de polimorfismos.⁹²
5. Errores al momento de la genotipificación o mal asignación de genotipos en los diversos grupos de estudio.

Es bien sabido que si la distribución de genotipos no cumple el equilibrio en la población control, los datos obtenidos deben tratarse con cautela, ya que la distribución de genotipos observada no estaría representando la de una población sana; ^{93,94} y si el E-HW no se cumple en la población de casos, esto puede sugerir una mayor evidencia entre algún genotipo y la enfermedad en estudio, por ello, aunque los genotipos no estén en E-HW en los casos, la información que aporta es de gran utilidad.^{95,96}

Como ya se ha mencionado, el estudio *in silico* de nuestros SNP arrojó diversos resultados, el alelo C del SNP rs2516498G/C de MIC B, predice crear un sitio de unión para los factores de transcripción ETS y NFAT. El factor de transcripción ETS, participa en diversas cascadas de transducción de señales, y junto con otras

familias de factores de transcripción y cofactores actúan como reguladores positivos o negativos de la expresión de genes que están involucrados en diversos procesos biológicos, incluyendo proliferación celular, diferenciación, hematopoyesis, apoptosis, metástasis, remodelación tisular, la angiogénesis y la transformación.^{97,98} Por su parte, el alelo C de este mismo SNP crea un sitio de unión para NFAT, esta proteína juega un papel de suma importancia en la inducción de la transcripción en la respuesta inmune. Dado que diversas citocinas desempeñan un papel central en el control y desarrollo de funciones efectoras y reguladoras del sistema inmune, la inhibición de NFAT y de los genes que regula, tiene efectos en el funcionamiento del sistema inmune, ya que conduce a situaciones de inmunosupresión.⁹⁹

Este mismo alelo predice crear un sitio de unión para las proteínas SF2/ASF2, las cuales son miembros de la familia SR y se sabe que estas proteínas regulan la eficiencia del corte y empalme, lo que podría estar implicado en la formación de isoformas de MIC B, mediante la retención de algún intrón, inserción de algún exón, etc.¹⁰⁰

Por otro lado, el alelo G del SNP rs3828916C/G crea un sitio de unión para el factor de transcripción USF. Un estudio en modelos murinos demuestra que USF-1 es un modulador del metabolismo de lípidos y de carbohidratos, así como de la respuesta inmune, junto con otro factor de transcripción (USF2), los cuales regulan la transcripción de cerca de 40 genes tales como el gen apoAV, apoC-III, ApoA-II, ApoE, entre otros, cuya principal función es regular el metabolismo de lípidos y carbohidratos.¹⁰¹

Como podemos observar, el papel que juegan los SNPs localizados en MIC B no se conoce del todo en el desarrollo de CaMa. Esta es la primera evaluación de estos polimorfismos del gen MIC B en pacientes con CaMa en el mundo. Nuestros resultados indican que las variantes de MIC B no están asociadas con riesgo para desarrollar CaMa. Se deberán integrar datos que fortalezcan una asociación con el desarrollo de esta enfermedad, como estilo de vida y ciertos datos demográficos. Lograr definir a estos polimorfismos como marcadores de susceptibilidad para desarrollar CaMa contribuirá a entender más sobre el desarrollo de la enfermedad y proporcionará un mejor entendimiento de los procesos de la vigilancia inmunológica contra el cáncer.

CONCLUSIONES

1. Los SNPs rs3132468 y rs3828916 estuvieron en E-HW, mientras los SNPs rs3132468 y rs3828916 de MIC B, no están en desequilibrio de HW.
2. Conocimos la frecuencia genotípica y alélica de los 4 SNPs de MIC B en Cáncer de Mama en una muestra de pacientes mexicanas.
3. Ninguno de los SNPs de MIC B, estuvieron asociados con susceptibilidad para desarrollar Cáncer de Mama.
4. El SNP rs2516498G/C de MIC B, puede estar involucrado en la creación de sitios de unión alternativo para factores de transcripción como ETS y NFAT así como para la proteína SF2/ASF2. El SNP rs3828916C/G podría estar involucrado en la creación de sitios de unión alternos para factores de transcripción USF y proteínas como SF2/ASF2 y SF2/ASF1.

Perspectivas a futuro

Los resultados obtenidos en esta investigación son de interés para comprender mejor los procesos de vigilancia inmunológica contra el cáncer.

Este estudio identifica nuevas líneas de investigación que se podrían emprender para mejorar y ampliar el trabajo realizado:

1. Ampliar la N de nuestro estudio. Creemos que al ampliar el número de muestras de este estudio, los datos podrían ser más representativos de la población, lo cual nos conduciría a una mejor caracterización de alelos de riesgo para la población mexicana.
2. Comprobar los sitios de unión alternos para factores de transcripción y proteínas. Como ya se mencionó nuestro estudio arrojó que el gen MIC B podría estar involucrado en sitios de unión altero para factores de transcripción como ETS y NFAT así como para la proteína SF2/ASF2. emprender el desarrollo de estas nuevas líneas de investigación contribuiría a la comprensión de cómo afectan al desarrollo tumoral.

BIBLOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2014). "Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama". Aguascalientes, México. 4:11.
2. Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., et al. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud pública de México*, 51, s335-s344.
3. Organización Mundial de la Salud. (2004). Carga mundial de morbilidad. http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_summary_es.pdf
4. Organización Panamericana de la salud. (2013). Cáncer en las américas perfiles de países, Washington, DC: OPS.
5. Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., et al. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The lancet oncology*, 9(8), 730-756.
6. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta nacional de salud y nutrición 2012. Resultados Nacionales. <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
7. MAMA, D. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama.
8. Sadava, D. E. (1993). *Cell biology: organelle structure and function*. Jones & Bartlett Learning.
9. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., et al. (2013). *Essential cell biology*. Garland Science.

10. Lodish, Berk, Matsudara, et al. (2005). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana. ISBN 950-06-1974-3.
11. Graña, X., & Reddy, E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, 11(2), 211-219.
12. Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F., et al. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular oncology*, 4(3), 174-191.
13. Antoniou AC, Easton DF. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, 25:5898-905
14. Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293), 1672-1677.
15. Marx, J. (1994). How cells cycle toward cancer. *Science*, 263(5145), 319-321.
16. Al-Azawi, D., Mc Ilroy, M., Kelly, et al. (2008). Ets-2 and p160 proteins collaborate to regulate c-Myc in endocrine resistant breast cancer. *Oncogene*, 27(21), 3021-3031.
17. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in genetics*, 9(4), 138-141.
18. Hernández, M. D. L. A. R., & Menéndez, M. H. (2001). Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol*, 17(1), 65-71.
19. Symonds, H., Krall, L., Remington, et al. (1994). P53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78(4), 703-711.

20. Funk, J. O., & Kind, P. (1997). [Cell cycle control, genetic instability and cancer]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 48(3), 157-165.
21. Perry, M. E., & Levine, A. J. (1993). Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. *Current opinion in genetics & development*, 3(1), 50-54.
22. Rennie J, Rusting R. (1996). What you need to know about cancer. *Sci Am*, 169:216.
23. Pedro G. (2006). Cáncer. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 100:55-82.
24. Miguel U. (2006). Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer. *Spanish national cancer research center*, 3:76-92.
25. Greenwald P, Kramer BS, Weed DL. (1995). Interactions between nature and nurture, eds. *Cancer Prevention and Control*. 1ª edición. New York: Marcel Dekker Inc., 181-194.
26. Moller, H., Cardis, E., Krewski, D., Moolgavkar, S., Woodward, A., & Zeise, L. (1995). Quantitative estimation and prediction of human risks for cancer. *International Agency for Research on Cancer (IARC)*. Lyon, France: IARC Sci Publ, (131).
27. Ayala, F. J. K., & John, A. (1984). *Genética moderna* (No. 575.1 A9Y).
28. Miguel U. (2014). El cáncer familiar y hereditario. *Centro Nacional e Investigación Oncológica*, 4:86-92.

29. Goodenough, U. (1978). *Genetics* (2nd edn). Holt, Rinehart and Winston, London.
30. Virgili, R. O., & Taboada, J. M. V. (2006). *Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento* (Vol. 2). Edicions Universitat Barcelona.
31. Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213-221.
32. Sherry, S. T., Ward, M., & Sirotkin, K. (1999). dbSNP—database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome research*, 9(8), 677-679.
33. Botstein, D., & Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature genetics*, 33, 228-237.
34. Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., et al. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta medica de Mexico*, 149(2), 220-228.
35. Duan, J., Wainwright, M. S., Comeron, J. M., et al. (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human molecular genetics*, 12(3), 205-216.
36. Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., et al. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature genetics*, 22(3), 231-238.

37. OGBOURNE, S., & ANTALIS, T. M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochemical Journal*, 331(1), 1-14.
38. Kininis, M., & Kraus, W. L. (2008). A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Recept Signal*, 6(5).
39. Näär, A. M., Lemon, B. D., & Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annual review of biochemistry*, 70(1), 475-501.
40. Smith, R. A., Saslow, D., Sawyer, K. A., et al. (2003). American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA: a cancer journal for clinicians*, 53(3), 141-169.
41. Høyer, A. P., Grandjean, P., Jørgensen, T., et al. (1998). Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *The Lancet*, 352(9143), 1816-1820.
42. Singletary, S. E., Allred, C., Ashley, P., et al. (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 20(17), 3628-3636.
43. Camargo, M. C., Wiesner, C., Díaz, M. C., et al. (2004). El cáncer: Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Colombia: Ministerio de la protección social, Instituto Nacional de Cancerología.
44. Díez, O., Gutiérrez-Enríquez, S., & Cajal, T. R. (2006). Genes de susceptibilidad al cáncer de mama. *Medicina clínica*, 126(8), 304-310.
45. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266:66-71.

46. Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181), 2088-2090.
47. Welsh, P. L., & King, M. C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Human molecular genetics*, 10(7), 705-713.
48. Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., et al. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(11), 943-949.
49. Anglian Breast Cancer Study Group. (2000). Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *British Journal of Cancer*, 83(10), 1301.
50. Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *The American Journal of Human Genetics*, 62(3), 676-689.
51. Ford, D., Easton, D. F., & Peto, J. (1995). Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *American journal of human genetics*, 57(6), 1457.
52. Antoniou, A. C., Gayther, S. A., Stratton, J. F., et al. (2000). Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genetic epidemiology*, 18(2), 173-190.
53. Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., et al. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *The American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117-1130.

54. . Thompson, D., Easton, D. F., & Breast Cancer Linkage Consortium. (2002). Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(18), 1358-1365.
55. Breast Cancer Linkage Consortium. (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(15), 1310-1316.
56. Sigurdsson, S., Thorlacius, S., Tomasson, J., et al. (1997). BRCA2 mutation in Icelandic prostate cancer patients. *Journal of molecular medicine*, 75(10), 758-761.
57. Houlston, R. S., & Tomlinson, I. P. M. (2000). Detecting low penetrance genes in cancer: the way ahead. *Journal of medical genetics*, 37(3), 161-167.
58. Eeles, R. A. (1999). Genetic predisposition to prostate cancer. *Prostate Cancer & Prostatic Diseases*, 2(1).
59. Easton, D. F., Pooley, K. A., Dunning, A. M., et al. (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*, 447(7148), 1087-1093.
60. Garcia-Closas, M., Couch, F. J., Lindstrom, S., et al. (2013). Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nature genetics*, 45(4), 392-398.
61. Couch, F. J., Wang, X., McGuffog, L., et al. (2013). Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk. *PLoS Genet*, 9(3), e1003212.
62. Benzo, L. B. (2014). Análisis de Genes Candidatos en Cáncer de Mama.
63. Gaudet, M. M., Kuchenbaecker, K. B., Vijai, J., et al. (2013). Identification of a BRCA2-specific modifier locus at 6p24 related to breast cancer risk. *PLoS Genet*, 9(3), e1003173.

64. Bahcall, O. G. (2013). Common variation and heritability estimates for breast, ovarian and prostate cancers. *Nat. Genet.*
65. Mendoza Rincón, J. F. (2007). LOS GENES MICA Y MICB: SU POLIMORFISMO E IMPORTANCIA BIOLÓGICA. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 10(1-2).
66. Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D. E., et al. (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6259-6263.
67. Leelayuwat, C., Degli-Esposti, M. A., Abraham, L. et al. (1994). A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics*, 40(5), 339-351.
68. Bahram S, Spies T. (1996). The MIC gene family. Non- polymorphic antigen presentation molecules. *Res Immunol.*, 147:328-332.
69. Ota, M., Bahram, S., Katsuyama, Y., et al. (2000). On the MICA deleted-MICB null, HLA-B* 4801 haplotype. *Tissue antigens*, 56(3), 268-271.
70. Jumnainsong, A., Jearanaikoon, P., Khahmahpahte, S., et al. (2008). Associations of MICB with cervical cancer in north-eastern Thais: identification of major histocompatibility complex class I chain-related gene B motifs influencing natural killer cell activation. *Clinical & Experimental Immunology*, 153(2), 205-213.
71. Kopp, R., Glas, J., Lau-Werner, U., et al. (2009). Association of MICA-TM and MICB C1_2_A microsatellite polymorphisms with tumor progression in patients with colorectal cancer. *Journal of clinical immunology*, 29(4), 545-554.
72. Cho, H., Chung, J. Y., Kim, S., et al. (2014). MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. *BMC cancer*, 14(1), 1.

73. Wang, B., Wang, Q., Wang, Z., et al. (2014). Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells. *Cancer research*, 74(20), 5746-5757.
74. Erichsen, H. C., & Chanock, S. J. (2004). SNPs in cancer research and treatment. *British journal of cancer*, 90(4), 747-751.
75. Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., et al. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12445-12450.
76. Coudert, J. D., & Held, W. (2006). The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 16, No. 5, pp. 333-343). Academic Press.
77. Hayakawa, Y., & Smyth, M. J. (2006, June). NKG2D and cytotoxic effector function in tumor immune surveillance. In *Seminars in immunology* (Vol. 18, No. 3, pp. 176-185). Academic Press.
78. Eagle, R. A., Traherne, J. A., Ashiru, O., et al. (2006). Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Human immunology*, 67(3), 159-169.
79. Weiss-Steider, B., Soto-Cruz, I., Martinez-Campos, C. A., et al (2011). Expression of MICA, MICB and NKG2D in human leukemic myelomonocytic and cervical cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 1.1.
80. Coudert, J. D., & Held, W. (2006, October). The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 16, No. 5, pp. 333-343). Academic Press.
81. Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la Inmunología Humana*. Editorial Médica Panamericana. ISBN 950-06-0797-2.

82. Steinle, A., Li, P., Morris, D. L., Groh, V., et al. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*, 53(4), 279-287.
83. Takada, A., Yoshida, S., Kajikawa, M., et al. (2008). Two novel NKG2D ligands of the mouse H60 family with differential expression patterns and binding affinities to NKG2D. *The Journal of Immunology*, 180(3), 1678-1685.
84. Bahram, S., & Spies, T. (1996). The MIC gene family. *Research in immunology*, 147(5), 328-333.
85. Schrambach, S., Ardizzone, M., Leymarie, V., et al. (2007). In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS one*, 2(6), e518.
86. Jonjic, S., & Polic, B. (2008). Krmptic': The role of NKG2D in immunoevasion by tumors and viruses. *Eur J Immunol*, 38, 2927-2968.
87. Fernández-Messina, L., Reyburn, H. T., & Valés-Gómez, M. (2012). Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Frontiers in immunology*, 3, 299.
88. Mendoza-Rincón, Moreno-Rodríguez, Ramírez-Ortiz et al. (2013). Efecto autócrino de los ligandos de estrés celular MICA y MICB en la proliferación de células de cáncer de cérvix humano. Laboratorio Oncología Molecular, FES-Zaragoza, UNAM.
89. Gómez, A. E. S., Sampayo, M. C. M., & Gutiérrez, J. C. A. (2000). Estudio de regulación de ligandos de NKG2D por interleuquina 10 y su asociación con calreticulina, en trofoblasto y melanoma humano. D-Universidad de Chile.

90. Attia, J., Thakkinstian, A., & D'Este, C. (2003). Meta-analyses of molecular association studies: methodologic lessons for genetic epidemiology. *Journal of clinical epidemiology*, 56(4), 297-303.
91. . Haviland, M. B., Kessler, A. M., Davignon, J., et al. (1991). Estimation of Hardy-Weinberg and pairwise disequilibrium in the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster. *American journal of human genetics*, 49(2), 350.
92. Soriguer, F., & Morcillo, S. (2007). Comparison of genotype frequencies deviating from Hardy-Weinberg equilibrium. *ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICION*, 54(3), 169.
93. Schaid, D. J., & Jacobsen, S. J. (1999). Biased Tests of Association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *American Journal of Epidemiology*, 149(8), 706-711.
94. Tiret, L., Cambien, F., Nakai, K., et al. (1995). Departure from hardy-weinberg equilibrium should be systematically tested in studies of association between genetic markers and disease. *Authors'repl ies. Circulation*, 92(11), 3364-3365.
95. Nielsen, D. M., Ehm, M. G., & Weir, B. S. (1998). Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *The American Journal of Human Genetics*, 63(5), 1531-1540.
96. Lee, W. C. (2003). Searching for disease-susceptibility loci by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals. *American journal of epidemiology*, 158(5), 397-400.
97. Cooper, C. D., Newman, J. A., & Gileadi, O. (2014). Recent advances in the structural molecular biology of Ets transcription factors: interactions, interfaces and inhibition. *Biochemical Society Transactions*, 42(1), 130-138.

98. Vázquez Arias, A. (2015). El papel de los factores transcripcionales en el cáncer. Universidad da Coruña, 4-24.
99. Northrop, J. P., Ho, S. N., Chen, L., Thomas, D. J., et al. (1994). NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature*, 369(6480), 497-502.
100. Wang, Z., Xiao, X., Van Nostrand, E., et al. (2006). General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control. *Molecular cell*, 23(1), 61-70.
101. Plaisier, C. L., Horvath, S., Huertas-Vazquez, A., et al. (2009). A systems genetics approach implicates USF1, FADS3, and other causal candidate genes for familial combined hyperlipidemia. *PLoS Genet*, 5(9), e1000642.

