UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

POLIMORFISMOS DE LOS GENES P53, CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 EN CÁNCER DE SENO FAMILIAR EN UNA POBLACION COLOMBIANA

AUTORES

- **DRA: SANDRA ROCÍO RAMÍREZ CLAVIJO.**
- **DR: NELSON RANGEL .**
- **DRA: SANDRA BEATRIZ ESCOBAR ESPINOSA.**

INTRODUCCION

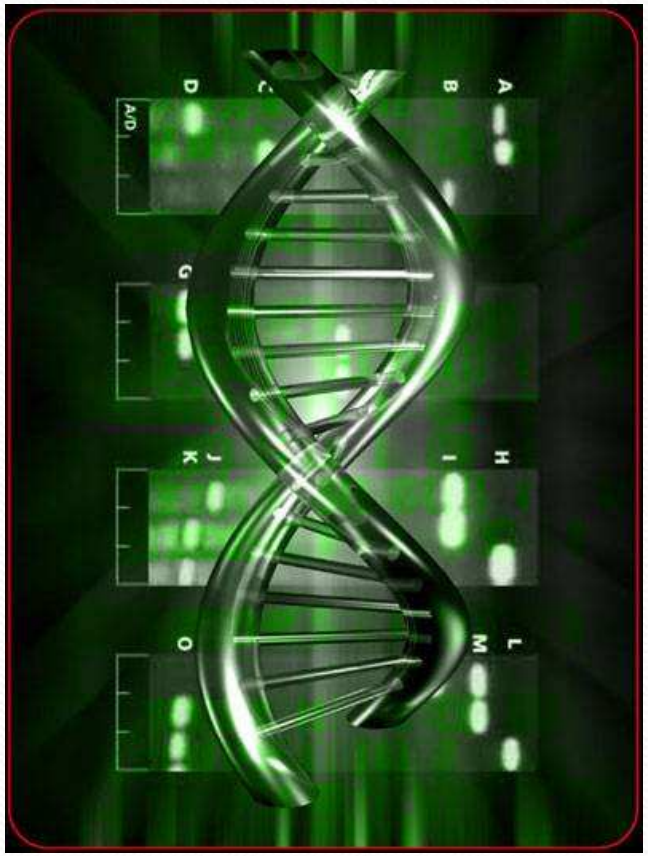
- En el 2007 se diagnosticaron 1,3 millones de casos a nivel mundial, ubicándose en el primer lugar en los tumores malignos que ocurrieron en las mujeres .
- En Colombia, el cáncer de mama constituye un problema de salud pública; se calcula una incidencia de 32 por cada 100000 mujeres por año, convirtiéndose en la segunda neoplasia maligna más frecuente en las mujeres·

- La etiogénesis del cáncer de seno es de carácter incierto, se considera una enfermedad multifactorial; resultado de la interacción entre factores ambientales y genéticos
- En 1990 de las mutaciones de alta penetrancia de los genes del BCRA1 Y BCRA2 fueron identificadas de alto riesgo para el cáncer de seno y otros tumores . Sin embargo estas mutaciones solo explica el 5% casos del cáncer de seno de origen familiar.

- Estudios del linaje genético han fallado en identificar los genes asociados a cáncer de seno. Estas observaciones proponen que la susceptibilidad al cáncer de seno es poligenética; por lo cual se considera necesario estudiar otros factores genéticos, como por ejemplo polimorfismos en genes de baja penetrancia asociados a cáncer de seno . Entre los cuales se tomaron para este estudio los genes p53, CYP1B1, CYP1A1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 .

MARCO TEORICO

- **POLIMORFISMO:**
  Variación en la secuencia del ADN entre los individuos de una población. Los cambios poco frecuentes en las secuencia de bases nitrogenadas del ADN se denominan mutaciones. Para que se considere polimorfismo la variación de estar presente al menos en 1% de la población.



EL CANCER DE SENO

- En el mundo occidental las muertes por cáncer de seno han disminuido un 25% desde las últimas 2 décadas, lo cual muestra una sustancial mejoría en el manejo de esta patología, la incidencia de la enfermedad ha aumentado en las últimas tres décadas lo cual no solo se explica por los cambios demográficos y ambientales sino también por el diagnóstico temprano

EL CANCER DE SENO

- Cáncer seno en Latinoamérica: se ha observado un incremento rápido y progresivo de las tasas de incidencia y de mortalidad en los últimos 20 años, lo que demuestra ausencia de programas de prevención, mínimo control de los casos cánceres tempranos, problemas en el tratamiento y gran proporción de mujeres que se diagnostican en estados avanzados

FACTORES DE RIESGO

- **NO MODIFICABLES**: La edad, la exposición a estrógenos endógenos (menarquía temprana, menopausia tardía), género femenino.
- **MODIFICABLES:** La obesidad post menopáusica, la poca actividad física, no haber lactado, la ingesta de alcohol, el tabaco, la nuliparidad o el ser madre añosa. La exposición prolongada a estrógenos exógenos ha sido confirmada como factor de riesgo en mujeres postmenopaúsicas, la combinación de estrógenos y progesterona dobla el riesgo de cáncer.

POLIMORFISMOS ASOCIADOS A CÁNCER DE SENO

- El gen BRCA1, fue descubierto en 1990 en un estudio que involucró 23 familias con 143 casos de cáncer de seno y ovario de Estados Unidos. El gen BRCA2 fue identificado y secuenciado en 1994, en el Reino Unido.
- Más de 450 mutaciones en el gen BRCA1 y más de 250 en el gen BRCA2 han sido descritas. La mayoría de estas corresponden a inclusiones, sustituciones o delecciones que conducen a la síntesis deficiente de la proteína o a una pérdida total de su actividad

- Dentro de los estudios realizados se han encontrado se han entrado 3 genes: CYP19, GSTP1 y p53, que presentaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas .
- El gen p53 tiene tres polimorfismos asociados a cáncer de seno, un cambio de C por G en el nucleótido 347, produciendo un cambio de aminoácido de Prolina a Arginina en el codón 72 dando origen al sitio de restricción para la enzima BstUI; una duplicación de 16 pb en el intrón 3 y un cambio de A por G en el intrón 6 generando el sitio de restricción para MspI

- La expresión del gen CYP1B1 se ha detectado principalmente en tejidos que forman parte del seno, útero y próstata. Este gen presenta dos polimorfismos: m1 y m2. El m1 es una transversión de G por C produciendo un cambio de aminoácido Valina por Leucina en el codón 432 (Val432Leu) del exón 3 creando el sitio de restricción para la enzima Eco57I, m2 es una transición de T por C produciendo un cambio de aminoácido de Asparagina por Serina en el codón 453 (Asn453Ser) .

- El gen CYP1A1 presenta 3 polimorfismos asociados a cáncer de seno: una sustitución de C por A que determina el cambio de aminoácido en el codón 461 de Asparagina por Treonina (Asn461Thr), una transición de A por G en el nucleótido 4889 del exón 7 que produce un cambio de aminoácido de Isoleucina a Valina (Ile462Val) y una transición de T por C en el extremo 3'de la región no-codificante en el nucleótido 6235 el cual genera un sitio de restricción para la enzima MspI.

- Los fenotipos nulos de los genes (GSTM1*0 GSTT1*0) , se cree que son causados por una delación en el gen conduciendo a una pérdida de su función. Los polimorfismos de GSTM se denominan GSTM1*1 para la versión silvestre y GSTM1*0 para la variante nula. Algunos autores han reportado cerca de un 20-50% de riesgo aumentado a desarrollar cáncer de seno asociado al genotipo nulo GSTM1, así como para el polimorfismo GSTT1*1, mientras que otros no han hallado ningún tipo de asociación

OBJETIVO GENERAL

- Identificar y describir las frecuencias alélicas y genotípicas, de los polimorfismos asociados a cáncer de seno, de los genes P53, CYP1B1, CYP1A1, GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 en una población colombiana con cáncer de seno familiar compararla con un grupo control y determinar si existe una asociación entre los polimorfismos de estos genes y la presencia de cáncer de seno familiar.

METODOLOGIA

MUJERES CON DX CANCER DE SENO: MAYORES DE 18 AÑOS DE LA CLINICA COUNTRY

CASO: MUJERES CON CANCER DE SENO Y ANTECENTES FAMILIARES QUE DE CARÁCTER VOLUNTARIO PARTICIPARON EN EL ESTUDIO

CONTROL: MUJERES SIN ANTECEDENTE FAMILIAR (1ER O 2DO GRADO) O PERSONAL DE CANCER, QUE VOLUNTARIAMENTE ACCEDIERON A PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

1. ENTREVISTA PERSONAL (CUESTIONARIO).

2. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE, PARA ANALISIS DE ADN.

3. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE MUESTRAS BIOLOGICAS.

CASO

CONTROL

TAMAÑO DE MUESTRA

- El tamaño de la muestra se calculó usando el programa Tamaño de Muestra 1.1.
- Con una confiabilidad del 95%, para detectar diferencias significativas entre los 2 grupos con un poder del 80%, el tamaño fue de 294, con una relación de 2:1, 2 controles (196): 1 caso (98).
- Con un ajuste de pérdida del 5% al tamaño de muestra calculado fue de 327 manteniendo la relación 2:1, 218 controles vs 109 casos.
- Al final de la recolección de los datos, la muestra obtenida para el análisis estadístico fue de 360, constituida por 120 casos y 240 controles

VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN	NATURALEZA	TIPO	ESCALA
Gen GSTM1	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen GSTT1	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen GSTP1 Val IIe IIe/Val	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen CYP1B1 Asn453Ser Ser Asn/Ser Asn	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen CYP1B1 Val432Leu Val Val/Leu Leu	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen CYP1A1 Ile462Val lle Val Ile/Val	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal

Gen CYP1A1 Thr461As As Thr/As Thr	**Polimorfismo**	**Cualitativa**	**Discreta**	**Nominal**
Gen CYP1A1 CYP3UTR ww mm Wm	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen P53-Intron 6 wm mm ww	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen P53-exon 4 Arginina Prolina Pro/Arg	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Gen P53-Intron 3 wm mm ww	Polimorfismo	Cualitativa	Discreta	Nominal

Edad	Número de años cumplidos	Cuantitativa	Continua	Razón
IMC	Peso/Estatura al ^{2}	Cuantitativa	Continua	Razón
Medicamentos	Consumo de medicamentos	Cualitativa	Discreta	Nominal
Alergias	Padecimiento de alergias	Cualitativa	Discreta	Nominal
Edad menarquía	Número de años cumplidos en el momento de la menarquía	Cuantitativa	Continua	Razón
Embarazos	Si ha estado en embarazo	Cualitativa	Discreta	Ordinal
Edad_de 1er embarazo	Años cumplidos en el momento del primer embarazo	Cuantitativa	Continua	Razón
Anticonceptivos	Uso de anticonceptivos orales	Cualitativa	Discreta	Nominal
Método planificación	Tipo de método de planificación ha usado	Cualitativa	Discreta	Nominal
Terapia hormonal	Uso de terapia hormonal	Cualitativa	Discreta	Nominal
Fuma	Consumo de cigarrillo	Cualitativa	Discreta	Nominal
Carnes ahumadas	Consumo de carnes ahumadas	Cualitativa	Discreta	Nominal
Enlatados	Consumo de enlatados	Cualitativa	Discreta	Nominal

Café	Consumo de café	Cualitativa	Discreta	Nominal
Embutido	Consumo de embutidos	Cualitativa	Discreta	Nominal
Alcohol	Consumo de alcohol	Cualitativa	Discreta	Nominal
Edad_dx	Años cumplidos en el momento del diagnóstico	Cuantitativa	Continua	Razón
Cual seno	Seno afectado por el tumor	Cualitativa	Discreta	Nominal
Tipo de cáncer	Tipo histologico	Cualitativa	Discreta	Nominal
Grado	Estadío clinico del tumor	Cualitativa	Discreta	Ordinal
Receptores hormonales	Presencia de receptors hormales	Cualitativa	Discreta	Nominal
Ganglios	Número de ganglios afectados por el tumor	Cuantitativa	Discreta	Ordinal
Her2	Presencia de Her2	Cualitativa	Discreta	Nominal
Menopausia	Presencia o no de la menopausia	Cualitativa	Discreta	Nominal
Estrato socio económico	Nivel socio económico	Cualitativa	Discreta	Ordinal
Nivel de educación	Nivel de educación	Cualitativa	Discreta	Ordinal

ANALISIS ESTADISTICO

- La etapa inicial del análisis de manera comprendió la descripción de las características socio demográficas y clínicas de cada grupo de mujeres de manera univariada, se estimaron las frecuencias en la población estudiada de los polimorfismos descritos. Seguidamente, se realizó análisis bivariado del mediante test de X^2 para la identificación de factores asociados con CA de seno.

- Posteriormente a través del análisis de regresión logística se estudió la relación conjunta entre los potenciales factores identificados en el análisis bivariado y el Ca de seno. La regresión logística se realizó incorporando uno a uno cada polimorfismo hasta incluirlos a todos. Posteriormente se realizó la combinación de los OR de los diferentes polimorfismos que reportaron asociaciones estadísticamente significativas en la regresión logística, para este análisis se utilizó la fórmula e $^{(B1+B2....)}$.

VARIABLES DE CONFUSION.

- Nivel educativo y estrato socioeconómico
- Uso de medicamentos
- Se tomo únicamente la variable de terapia hormonal que se consideró de mayor relevancia y se excluyo uso de anticonceptivos y planificación (que dentro de sus categorías incluye uso de hormonas) por considerarse relación

RESULTADOS. Análisis univariado

VARIABLE	CASO	CONTROL
Edad (Media)	53,28	47,03
IMC (Media)	25,21	24,8340
Edad 1er Embarazo (Media)	23,94	22,84
Estrato (Mediana)	4	3
Edad Menarquía (Media)	13,17	13,179
Embarazos (Mediana)	3	3
Partos (Mediana)	2	2
Abortos (Mediana)	0	0

Características clínicas. Grupo caso

EDAD DE DX	**MEDIA: 48.9 (46.82 – 51.08)**
GANGLIOS N =112	POSITIVO 48(40%) NEGATIVO 64(53.3%)
HERB-2 N=43	POSITIVO 18(15%) NEGATIVO 25(20.8%)
CUAL SENO N=120	DERECHO 58 (48.3%) IZQUIERDO 56 (46.7%) AMBOS 6 (5%)
GRADO HISTOLOGICO N = 120	Grado I 34 (28.3%) Grado ll 60 (50%) Grado lll 18 (15%) Perdidos 8 (6.7%)
TIPO DE CA SENO TOTAL 118	CDI 92 (76.7%) CDIn situ 16 (13.3%) Ductal y Lobulillar in situ 1 (0.8%) CLI 4 (3.3%) Ca Coloide 2 (1.7%) Mucinoso 2 (1.7%) Filoides 1 (0.8%)
RECEPTORES HORMONALES	Positivos 73 (60.8%) Negativos 21 (17.5%) ER+PR- 7 (5.8%) ER-PR+ 4 (3.3%)

RESULTADOS
ANALISIS BIVARIADO POLIMORFISMOS

POLIMORFISMO	GENOTIPO	CONTROLES n=240	CASOS n= 120	VALOR DE P
GSTM1	**GSTM1 (+)**	**125 (52.1%)**	**39 (32.5%)**	**0.000**
GSTT1	GSTT1 (+)	179 (74.6%)	88 (73.3%)	0.788
GSTP1	Val IIe IIe/VaL	78 (32.5%) 32 (13.3%) 130(54.2%)	34(28.3%) 17(14.2%) 69(57.5%)	0.723
CYP1B1	Ser Asn/Ser Asn	2(0.8%) 43(17.3%) 195 (81.2%)	3(1.4%) 30(25%) 87(72%)	0.113
CYP1B1	Val Val/Leu Leu	26(10.8%) 89(37.1%) 125(52.1%)	19(15.8%) 46(38.1%) 55(48.8%)	0.323

CYP1A1	**As Thr/As Thr**	**9(3.8%) 35(14.6%) 196(81.7%)**	**6(5%) 20(16.7%) 94(78.3%)**	**0.727**
CYP1A1	ww mm wm	90(37.5%) 47(19.6%) 103(42.9%)	56(46.7%) 14(11.7%) 50(41.7%)	0.098
P53-Intron 6	**wm mm ww**	**36(15%) 6(2.5%) 198(82.5%)**	**27(22.5%) 0(0%) 93(77.5%)**	**0.055**
P53-exon 4	**Arginina Prolina Pro/Arg**	**118(49.2%) 21(8.8%) 101(42.1%)**	**75(62%) 6(5%) 39(32.5%)**	**0.049**
P53-Intron 3	**Wm mm ww**	**1(0.4%) 1(0.4%) 238(99.2%)**	**11(9.2%) 0(0%) 109(90.08%)**	**0.000**
CYP1A1	lle Val Lle/Val	82(34.2%) 37(15.4%) 121(50.4%)	53(44.2%) 14(11.7%) 53(44.2%)	0.167

Polimorfismos de riesgo.

GEN	GENOTIPO	Valor de p	OR	I.C. 95,0%	
				Inferior	Superior
P53-Intron 3	**wm**	**0,002**	**30,887**	**3,709**	**257,209**
	mm	1,000	,728	,000	
P53-Exón 4	**Arginina**	**,018**	**1,923**	**1,117**	**3,309**
	Prolina	,571	,721	,233	2,2311.
P53-Intron 6	**wm**	**,033**	**2,061**	**1,059**	**4,013**
	mm	,999	,000	,000	.
CYP1A1	ww	,530	1,264	,607	2,632
	mm	,333	,645	,265	1,567
CYP1A1	Asparagina	,880	1,097	,330	3,648
	Thr /As	,546	1,236	,622	2,457
GSTT1	GSTT1 +	,826	,939	,535	1,646

GEN	GENOTIPO	Valor de p	OR	I.C. 95,0%)	
				Inferior	Superior
CYP1A1	Val/L	,392			
	Leucina	,200	1,605	,778	3,308
	Valina	,418	1,453	,589	3,585
CYP1B1	Leucina	,103			
	Valina	**,034**	**2,273**	**1,064**	**4,855**
	Val/leu	,625	1,146	,663	1,982
CYP1B1	Serina	,057			
	Asparagina	,274	3,517	,370	33,441
	Asn/Se	**,028**	**1,987**	**1,076**	**3,670**
GSTP1	Valina	,561			
	Leucina	,294	,739	,419	1,301
	Val/leu	,948	,976	,479	1,992
GSTM1R	**GSTM1 +**	**,000**	**,366**	**,219**	**,613**

COMBINACION DE POLIMORFISMOS

POLIMORFISMOS	OR	IC
P53i6wm+p53exon4	3.96	1.19 – 13
Val432+Asn453se	4.48	1.13 – 17.6
P53i6wm+Val432le+Asn453se	9.3	1.21 – 71.4
P53exon4+Val432le+Asn453se	8.68	1.28 - 58.96
P53i3wm+GSTM1R	**11.31**	**0.818 – 157.5**
GSTM1r+P53exon4+Asn453se	**1.4**	**0.26 – 2**
GSTM1+P53i6wm+Val432le+Asn453se	**3.41**	**0.26 – 43.38**
GSTM1+ P53i6wm+Val432le+Asn453se+P53exon4	**6.55**	**0.30 – 144**
P53i6wm+Val432le+Asn453se+P53exon4	17.9	1.35 – 235

OTRAS VARIABLES

VARIABLE	VALOR DE P	OR	I.C. 95,0% para OR	
			Inferior	Superior
EDAD MENARQUIA				
8 – 11 años	0,006	3,076	1,371	6,902
12 -13 años	0,002	3,472	1,584	7,610
EDAD				
>39 años	0,000	0,064	0,017	0,237
40 – 49 años	0,01	0,129	0,039	0,422
EMBUTIDOS	0,012	2,041	1,167	3,569
ALERGIAS	0,013	2,095	1,172	3,746
TERAPIA HORMONAL	0,048	1,958	1,006	3,811
PREMENOPAUSIA	0,003	,309	0,144	0,663

DISCUSION

- En este estudio se encontraron asociaciones significativas para el cáncer de seno en polimorfismos de los genes p53, CYPB1, GSTM1; en los cuales otros estudios epidemiológicos ya habían reportado variaciones polimórficas. Dentro de estas variaciones se encontraron cinco polimorfismos de riesgo y uno protector.

- El gen P53 coincidiendo con otros estudios, reportó diferencias significativas en sus frecuencias genotípicas; los polimorfismos que se encontraron de riesgo en este estudio para este gen fueron en el exón 4, la Arginina OR 1,923 IC 95% (1,117 – 3.309); en el intrón 3 el wm OR 30,887 IC 95% (3,709 – 257,209); y en el intrón 6 el wm OR 2.061 IC 95% (1.059 - 4,013);

- Los polimorfismos del gen CYPB1 (Val432Leu, Asn453Ser) inicialmente no se mostraron diferencias significativas en sus frecuencias genotípicas en el análisis bivariado; sin embargo en el análisis multivariado se identifican como de riesgo los polimorfismos Valina con un OR 2.273 con un IC del 95% (1.084 – 4.855); Asparagina/Serina con un OR 1,987 con IC 95% (1.076 – 3.670); estudios anteriores ha reportado diferencias significativas en las frecuencias genotípicas para este gen.

- Para los genes CYPA1, GSTT1, GSTP1 a diferencia de otros estudios, los polimorfismos estudiados no reportaron diferencias significativas en el análisis bivariado de las frecuencias genotípicas, ni en la regresión logística.
- La versión silvestre del gen GSYM1 (GSTM1*1) se encontró como protectora para el cáncer de seno, OR 0,366 con IC 95% (0,219 – 0,613); lo que coincide con algunos autores han reportado cerca de un 20-50% de riesgo aumentado a desarrollar cáncer de seno asociado al genotipo nulo GSTM1*0

- Al combinar los denominados como de riesgo, se evidencia un aumento en el OR, sin embargo al combinarlos con el polimorfismo reportado como protector (GSTM1P1*1), el riesgo disminuye haciéndose no significativo, aún en presencia de varios polimorfismos de riesgo.
- **FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES**:
- La edad, encontrándose con factor protector en los grupos más jóvenes, OR 0.064 IC 95% (0.017 – 0.237) para menores de 39 años, y OR 0.129 con IC 95% (0.039 -0.422) para pacientes con edades entre 40 -49 años.

- La menarquía temprana con un OR 3.076 con IC 95% (1.371 – 6.902) para el grupo que la presentó entre los 8 - 11 años, y un OR de 3.472 con IC 95% (1.584 -7.610) para el grupo de 12 – 13 años.
- La condición pre menopáusica se encontró como protectora al igual que en otras revisiones , reportando un OR 0.309 con IC 95% (0.144 -0.6363).
- Las alergias mostraron ser de riesgo con OR 2.095 con IC 95% (1.172 – 3.746), dentro de la literatura revisada este factor no ha sido reportado como de riesgo.

- **FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES:**
- Terapia hormonal con un OR 1.985 con IC 95% (1.006 – 3.811)
- El consumo de embutidos con OR 2.041 IC 95% (1.167 – 3.569)
- El consumo de alcohol, el tabaquismo, el índice de masa corporal, la nuliparidad o haber sido madre añosa no fueron significativos en la muestra analizada

En este estudio se establece la presencia de un factor genético de baja penetrancia como de riesgo para el desarrollo de cáncer de seno en la muestra analizada. Se recomienda realizar otros estudios que permitan determinar a futuro, la distribución de los polimorfismos en todo el país y su posible relación con los diferentes grupos étnicos de la población colombiana; así como la interacción de estos factores genéticos con factores modificables. Esto podría permitir a largo plazo, implantar medidas preventivas o de detección temprana en mujeres que por su historia familiar estén en alto riesgo de desarrollar la enfermedad