

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“PREVALENCIA DE LOS POLIMORFISMOS RS2881766 Y RS2987983 EN LOS GENES ESR1 Y ESR2 EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y SU ASOCIACIÓN CON EL RIESGO DE CÁNCER DE MAMA EN POBLACIÓN SANA: ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES”.

Por:

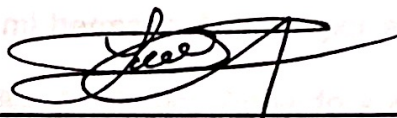
DR. ALAN BURGUETE TORRES

Como requisito parcial para obtener el grado de
ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA

Abril 2018

“Prevalencia de los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2 en pacientes con cáncer de mama y su asociación con el riesgo de cáncer de mama en población sana: Estudio de Casos y Controles”

Aprobación de la tesis:



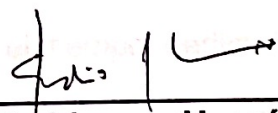
**Dra. en C. Ma. De Lourdes Garza Rodríguez
Director de la tesis**



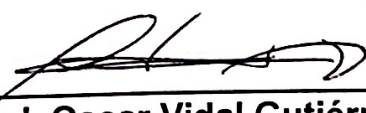
**Dr. José Luis González Vela
Director de la tesis**



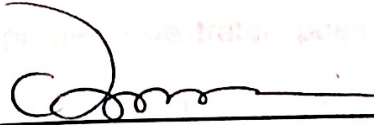
**Dr. David Hernández Barajas
Miembro de la Comisión de Tesis**



**Dr. Edio Llerena Hernández
Miembro de la Comisión de Tesis**



**Dr. Med. Oscar Vidal Gutiérrez
Miembro de la Comisión de Tesis**



**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

CAPITULO I

RESUMEN

Introducción: El cáncer de mama (CM) representa el primer lugar en incidencia y mortalidad por cáncer en México.¹ Es conocido que existen múltiples factores de riesgo ambientales, hormonales y genéticos asociados a esta enfermedad. Si bien se acepta que hasta en el 30% de los casos pudieran existir factores genéticos asociados, solamente alrededor de un 5% de estos se logra demostrar un componente hereditario por mutaciones en genes reconocidos (BRCA1, BRCA2, TP53, etc).⁷ Esto hace suponer que existen algunas alteraciones genéticas aún desconocidas que pudieran asociarse a esta enfermedad. Los polimorfismos de nucleótido único o SNP (*single nucleotide polymorphism*, por sus siglas en inglés) consisten en una variación en la secuencia de ADN de un gen determinado que afecta a una sola base. Los estrógenos y sus receptores (ESR1 y ESR2) se han implicado en procesos patológicos como el cáncer de mama.¹¹ Algunas variaciones en los genes de ESR1 y ESR2 se han relacionado con un aumento en el riesgo de cáncer de mama. Específicamente, los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2, se han asociado a un mayor riesgo de cáncer de mama en otras poblaciones.^{14, 15} El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de dichos polimorfismos en pacientes del noreste de México con cáncer de mama y determinar si confiere mayor riesgo al compararla con una población de controles sanos.

Materiales y métodos: Se diseñó un estudio de casos y controles en el que se se obtuvieron muestras de sangre periférica de 650 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama y 550 controles sanos. Tras la realización de una prueba piloto para determinar el tamaño mínimo de la muestra se determinó una N de 264 para la búsqueda de polimorfismos en ESR1 y de 288 para ESR2. Se realizó la genotipificación mediante qPCR para detectar los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2 en ambas poblaciones y se compararon los resultados.

Resultados: Se analizó un total de 286 y 251 muestras en búsqueda del polimorfismo rs2881766 (ESR1) en la población de casos y controles respectivamente, así como un total de 287 y 268 muestras para el polimorfismo rs2987983 (ESR2) en la población de casos y controles. La media de edad en años fue de 53 y 47 para ambas poblaciones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia del polimorfismo rs2881766 (T→G) en el gen ESR1 entre la población de casos y controles (43.4 vs 48.2%, OR 0.98, $p=0.170$). Así mismo, tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia del polimorfismo rs2987983 en el gen ESR2 (A→G) entre la población de casos y controles (45.5 vs 53.5%, OR 0.75, $p=0.48$). De igual manera, no se identificaron diferencias significativas en los subgrupos por estado menopáusico (pre y post-menopáusicas), así como por edad al primer embarazo (mayor o menor a 30 años). Se identificó una

diferencia significativa en la prevalencia de obesidad (todos los grados) entre los grupos de casos y controles (42.5 vs 29.7%, $p=0.0001$).

Conclusión: Los polimorfismos rs2881766 en el gen ESR1 y rs2987983 en el gen ESR2 no se asocian a un mayor riesgo de cáncer de mama en una población seleccionada del noreste de México.

CAPITULO II

INTRODUCCIÓN

Título: *“Prevalencia de los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2 en pacientes con cáncer de mama y su asociación con el riesgo de cáncer de mama en población sana: Estudio de Casos y Controles”.*

El cáncer de mama (CM) es la segunda neoplasia más frecuente a nivel mundial y es la más frecuente en mujeres. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud, en 2012 se diagnosticaron en el mundo 1.67 millones de nuevos casos, representando esto el 25% de todos los diagnósticos de cáncer. Aproximadamente 883,000 de estos casos ocurrieron en países en desarrollo. Así mismo, a nivel global, el cáncer de mama representa la quinta causa de muerte por cáncer, con aproximadamente 522,000 muertes relacionadas. En países en desarrollo, es la principal causa de muerte por cáncer, con cifras estimadas de 324,000 muertes.¹

En México, el cáncer de mama representa el primer lugar en incidencia, con un aproximado de 20,440 casos nuevos en 2012, con una tasa de incidencia ajustada de 35.4 por cada 100,000 mujeres. De igual manera, en este mismo año se registraron 5,680 muertes (14.2%) con una mortalidad ajustada por edad de 9.7 muertes por cada 100,000 mujeres.¹ Los estados del centro y norte del México concentran las tasas de mortalidad por cáncer de mama más altas con un 21 y 31% respectivamente. Específicamente, Nuevo

León ocupa el quinto lugar en mortalidad por cáncer de mama, con un 6% del total de las muertes relacionadas a esta patología.²

La mayor parte de los diagnósticos se realizan entre los 55 y los 64 años, aunque estas cifras sufren variaciones geográficas importantes. En referencia a las etapas clínicas al diagnóstico, en México, el 14.5, 35.9, 35.4 y 9.6% son etapas clínicas I, II, III y IV respectivamente.³

Respecto a la clasificación de los subtipos de cáncer de mama, se reconocen tres grupos principales; 1) Aquellos en los que existe sobre-expresión de receptores hormonales (estrógenos y progesterona, que representan aproximadamente el 60% de los tumores) 2) Aquellos que sobre-expresan la proteína HER-2 (25% aproximadamente) y 3) Aquellos que no expresan ninguna de estas proteínas, también conocidos como triple negativos (15%).⁴

Existen múltiples factores de riesgo asociados a este padecimiento. Entre ellos se ha correlacionado de forma consistente la asociación de un aumento del riesgo de cáncer de mama con la exposición prolongada a estrógenos y progesterona (factores de riesgo hormonales). La menarca temprana, menopausia tardía y la nuliparidad son factores que incrementan el riesgo de cáncer de mama de forma independiente.⁵ Estos factores se suman a la observación de que la mayor parte de los casos se diagnostican en mujeres

post-menopáusicas que han tenido exposición prolongada a estrógenos endógenos.⁶

Aunque la mayor parte de los cánceres de mama son esporádicos, es decir, sin algún componente hereditario demostrado, menos del 5% de los casos tienen una predisposición genética clara. De estos, la mayoría involucran mutaciones en genes conocidos como BRCA1, BRCA2, PTEN y/o TP53. Sin embargo, algunos estudios indican que la heredabilidad del cáncer de mama es alrededor del 30%,⁷ lo que hace suponer que existen algunos otros genes que pudieran estar involucrados en la etiología del cáncer de mama.

El gen ESR1 (*Estrogen Receptor 1*) está localizado en el brazo largo del cromosoma 6 (6q25.1-q25.2) Este gen, está compuesto por 472,929 bases y codifica para una proteína (receptor de estrógeno). Dicha proteína está compuesta por 595 aminoácidos, tiene un peso de 66.2 kDa y funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando y está compuesto de varios múltiples dominios esenciales para la unión de estrógenos y subsecuente activación de la transcripción.⁸

El gen ESR 2 (*Estrogen Receptor 2*) está localizado en el cromosoma 14 (14q23.3) y está compuesto por 254,319 bases y codifica para una proteína (receptor de estrógeno 2 o beta), miembro de la familia de los receptores de estrógenos y de la superfamilia de factores de transcripción de receptores nucleares. Esta proteína está compuesta por 530 aminoácidos con un peso de

59.2 kDa. Contiene un sitio de unión al ADN N-terminal y un sitio de unión a ligando C-terminal y se localiza al núcleo, citoplasma y mitocondria. Posterior a la unión con el ligando, se forman homo o heterodímeros que interactúan con secuencias específicas del ADN para activar la transcripción. ⁸

Los estrógenos y sus receptores son críticos para el desarrollo sexual y reproductivo, así como también se han implicado en procesos patológicos como el cáncer de mama, endometrio y enfermedades óseas. ⁹ Actualmente, la detección de la presencia de los receptores de estrógenos en los tumores con cáncer de la mama, son rutinarios al momento del diagnóstico y han demostrado ser un factor pronóstico y predictor de respuesta al tratamiento hormonal. ¹⁰ A pesar de ser entidades sensibles al tratamiento con anti-hormonales, un porcentaje importante de pacientes con cáncer de mama, presentan recurrencia o progresión de la enfermedad sobre estos agentes. Aunque se han propuesto múltiples mecanismos de resistencia a estos fármacos, se reconoce que, mutaciones adquiridas en el gen ESR1 y ESR2 se relacionan directamente a este fenómeno. ¹¹

Así mismo, algunas variantes en los genes de ESR1 y ESR2 se han relacionado con un aumento en el riesgo de cáncer de mama. ¹² Entre ellas, destacan los polimorfismos genéticos. Los polimorfismos son variaciones en la secuencia del ADN en un gen determinado. Existen varios tipos de polimorfismos, entre los que destacan los polimorfismos de nucleótido único o SNP (*single nucleotide polymorphism*, por sus siglas en inglés). Estos consisten

en una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (Adenina, Timina, Citosina o Guanina).

Se ha comprobado que algunos polimorfismos en los genes ESR1 y ESR2 son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama en algunas poblaciones.¹³ En el estudio de Byung Ho Son y colaboradores, se encontró una relación directa entre el polimorfismo rs2881766 (variación/ sustitución G/T en la secuencia: GATGCATTCTATAAACTGCAGACT[G/T]AAATTAAGACCTTGAGCAAACCTG GC) en el gen ESR1 y el aumento de riesgo de cáncer de mama en población coreana.¹⁴

Así mismo, en un estudio de casos y controles, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia del polimorfismo rs2987983 del gen ESR2 (variación en A/G en la secuencia: CCTGGTTTAATGCAGAGTGGAGAGG[A/G]TGATTATTCCAATTCT ACCTGAATT entre casos y controles, confiriendo un aumento en el riesgo de cáncer de mama para esta población.¹⁵

Existen conocidas diferencias epidemiológicas en la población mexicana respecto a otros países: La edad promedio al diagnóstico en los Estados Unidos de América y algunos países de Europa es de 63 años, mientras que en México es de 53 años. Así mismo, en México, la mayor parte de los casos (41%) se diagnostican en etapas avanzadas (III y IV),³ mientras que en los Estados

Unidos, el 62% de los casos se diagnostican en etapas tempranas o localizadas.¹⁶ Por tanto, es posible que existan también diferencias en los patrones mutacionales en nuestra población con respecto a lo reportado en otros estudios.

A la fecha de la realización de este estudio, no se han realizado análisis de polimorfismos en genes de ESR1 y ESR2 en población mexicana.

CAPITULO III

3. HIPÓTESIS

Hipótesis nula (H-0):

La prevalencia de los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2 de la población de estudio no se asocian a mayor riesgo de cáncer de mama.

Hipótesis alterna (H-1):

La prevalencia de los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2 de la población de estudio se asocian a mayor riesgo de cáncer de mama.

CAPITULO IV

4. JUSTIFICACIÓN

La justificación de este estudio deriva en que en la actualidad existen solamente estudios de estos polimorfismos en otras poblaciones. En este estudio inicial, la identificación de dichos polimorfismos pudiera establecerse como un factor de riesgo adicional a los ya conocidos para cáncer de mama en población general, lo cual pudiera a su vez derivar en futuras investigaciones en estudios poblacionales con un mayor número de pacientes. Dada la incidencia y mortalidad del cáncer de mama en nuestro país, pudiera impactar positivamente al identificar una población de riesgo que pudiera beneficiarse de estrategias más agresivas de escrutinio.

CAPITULO IV: OBJETIVOS

Objetivo general:

1. Evaluar la relación entre la presencia de polimorfismos en genes asociados a receptores de estrógeno y el cáncer de mama.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la prevalencia del polimorfismo rs2881766 en el gen ESR1 en población con cáncer de mama y controles sanos y determinar su asociación a un mayor riesgo de cáncer de mama.
2. Evaluar la prevalencia del polimorfismo rs2987983 en el gen ESR2 en población con cáncer de mama y controles sanos y determinar su asociación a un mayor riesgo de cáncer de mama.

CAPITULO V: MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del Estudio.

La presente investigación fue diseñada como estudio de casos y controles transversal y observacional.

3.2 Lugar de realización del Estudio.

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología Medica (UBM) del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, en conjunto con el Hospital Universitario “ Dr. José Eleuterio González y el Centro Universitario Contra el Cáncer de la UANL.

3.2.1 Aprobación del protocolo: El protocolo fue sometido y aprobado por el Comité de Ética de la Subdirección de Investigación de la Facultad de Medicina, con el número de registro BI10-002. (Ver Anexo 1).

3.3 Población Estudiada.

- 1) Pacientes diagnosticadas con cáncer de mama que estuvieran recibiendo su tratamiento en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” o en la Clínica de especialidades numero 25 del IMSS.
- 2) Mujeres sin diagnóstico de cáncer de mama pareadas por edad con las pacientes.

Procedimiento de recolección de muestras:

1. A cada sujeto invitado a participar en este estudio, se le proporcionó información detallada (oral y escrita) acerca del protocolo. Se respondieron dudas y posterior a su consentimiento verbal, se les solicitó firmar la carta de Consentimiento Informado (Anexo 2).
2. Se procedió a la toma de muestra de sangre periférica mediante punción, utilizando tubos de recolección con EDTA. A cada participante se le tomaron 3 mL de sangre venosa en tubos con EDTA y 3 mL en tubos sin anticoagulante.
3. Las muestras fueron clasificadas en dos grupos:
 - a. Grupo 1 (casos): Pacientes con diagnóstico de CM. A su vez, este grupo se subdivide en:
 - i. Grupo 1A: Pacientes sin tratamiento activo al momento de la recolección.
 - ii. Grupo 1B: Pacientes que al momento de la recolección estaban recibiendo tratamiento.
 - b. Grupo 2 (controles), mujeres voluntarias sin CM.
4. Las muestras fueron transportadas a UBM donde fueron ingresadas al Laboratorio Nacional Biobanco, fraccionándolas en alícuotas con el fin de generar un almacén de bio-especímenes de las pacientes del estudio.
5. Se generó un documento electrónico con los datos de cada participante.

3.4 Variables de estudio.

Para cada uno de los participantes de este estudio se consideraron: (1) Edad (2) Características demográficas: Lugar de nacimiento, (3) Características antropométricas: (Talla, peso, Índice de Masa Corporal), (4) Características clínico-patológicas de los casos: Lateralidad del CM, tipo histológico y estado de los receptores hormonales, (5) Información adicional: Consumo de anticonceptivos orales, uso de terapia hormonal y consumo de alcohol, tabaco o drogas.

3.4 Criterios de Selección de la muestra.

3.4.1 Criterios de Inclusión y Exclusión.

a) Criterios de inclusión:

- a. Casos: Mujeres >18 años con diagnóstico confirmado de CM por patología.
- b. Controles: Mujeres > 18 años que se les haya realizado una mamografía en el último año y cuyo resultado haya sido negativo a CM, y no hayan padecido ningún otro tipo de cáncer.

b) Criterios de exclusión: Mujeres < 18 años, embarazadas al momento del estudio, portadoras conocidas de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), portadoras conocidas de virus de hepatitis C (VHC) y antecedentes familiares de CM. Así mismo fueron excluidas del análisis final aquellas pacientes de cuyas muestras no se obtuvo una concentración significativa de ADN o que no cumplieran con la calidad

requerida para su posterior análisis (relación 260/280), todas aquellas muestras en las que el ADN no fueran amplificables por PCR punto final o PCR tiempo real también fueron eliminadas del análisis.

3.5 Material y Reactivos.

3.5.1 Material

Material para Extracción de sangre periférica

1. Tubos vacutainer con anticoagulante (EDTA)
2. Tubos vacutainer sin anticoagulante
3. Agujas de colecta múltiple
4. Adaptador para agujas
5. Torniquete

Material para extracción de ADN, PCR punto final, qPCR y secuenciación.

1. Puntillas para pipeta micro –pipetas de 10, 100 y 1000 μ l
2. Tubos de 1, 1.5 y 2 ml
3. Placas de 96 pozos para PCR punto final
4. Placas de 96 pozos para qPCR
5. Cubiertas autoadheribles ópticas para PCR tiempo real

3.6 Genotipificación del los SNP's por qPCR

3.6.1 Genotipificación del SNP rs2881766 en el gen ESR1 y rs2987983 en el ESR2

La detección de los SNP's se realizó utilizando sondas TaqMan® Pre-designed SNP Genotyping Assay (disponible comercialmente en Applied Biosystems® bajo los siguientes números de identificación: ESR1 / Polimorfismo rs2881766 / ID: C__11414988_10 / Catálogo: 4351379 y ESR2 / Polimorfismo rs2987983 / ID: C___1436929_20 / Catálogo: 4351379.)

Se utilizó el software del equipo StepOnePlus® (Applied Biosystems®), bajo condiciones establecidas para detectar mujeres homocigotas para la presencia del alelo normal así como heterocigotas y homocigotas para la presencia del alelo variante. La discriminación entre estos grupos es posible debido a que la reacción de PCR se lleva a cabo en presencia de sondas marcadas con fluoróforos (Figura 1)

1.- Fluorocromo FAM® unido al extremo 5' de la sonda del alelo 1 (alelo normal)

2.-Fluorocromo VIC® unido al extremo 5' de la sonda del alelo 2 (alelo variante)

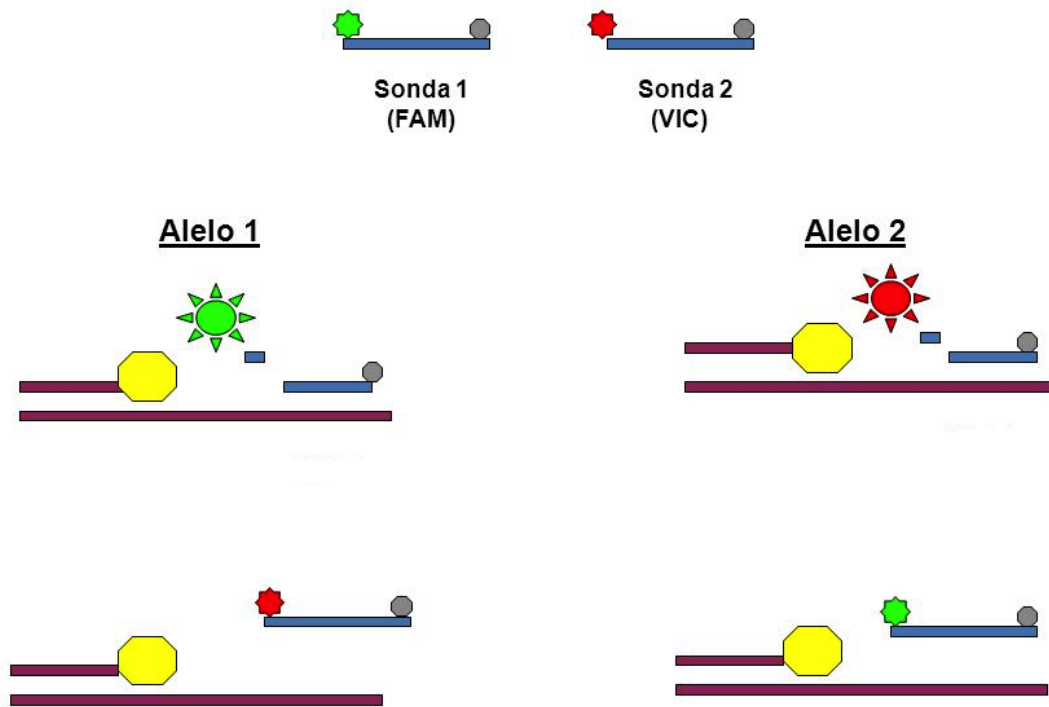


Figura 1: Detección de SNPs mediante sondas TaqMan®

La reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN-polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células. Cuando la sonda se une al templado, se libera fluorescencia (ya sea del alelo normal o variante). Esta es detectada por el equipo mientras que el software las agrupa según la fluorescencia que emiten, ya sea por un solo fluorocromo (indicando homocigocidad) o ambos (indicando que la muestra es heterocigota) para el SNP de interés. En la *Tabla 1* se muestran las condiciones de genotipificación por PCR-en tiempo real.

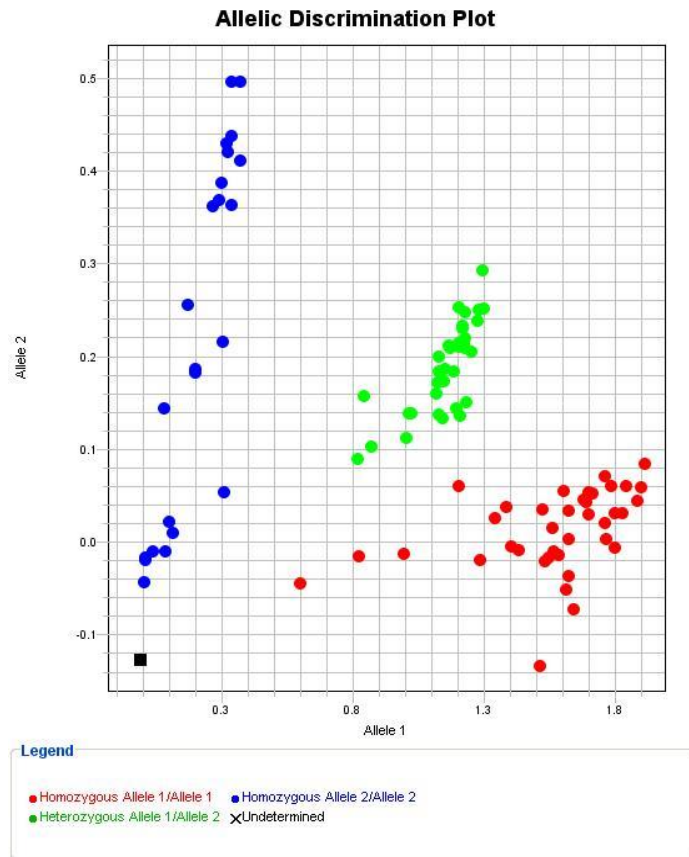


Figura 2: Grafica de discriminación alélica

Tabla 1: Condiciones de genotipificación por PCR-Tiempo Real		
Reactivo	Concentración requerida	Volumen
TaqMan Universal Master Mix II 20X	1X	5µl
Sonda TaqMan Genotyping Assays 20X	1X	0.5 µl
ADN	50 ng/µl	2 µl
ADN libre de nucleasas	-	2µl

Prueba piloto

Previo al análisis de los polimorfismos se realizó un ensayo piloto para identificar el tamaño mínimo de la muestra para cada uno de los SNPs. Se genotificaron 95 personas mexicanas de una población abierta para obtener la frecuencia alélica de cada uno de los SNP y se además se tomaron los datos de la frecuencia mínima alélica (MAF) de la base de datos del proyecto de los 1000 genomas (1000G). Los resultados obtenidos fueron los siguientes: (Tabla 2)

Tabla 2: Ensayo piloto para cálculo del tamaño mínimo de la muestra a partir de la frecuencia alélica.

Gen	SNP	Alelo Ancestral	MAF ^a	N	MAF ^b	N
ESR1	rs2881766	G	G: 0.469	264	0.450	
ESR2	rs2987983	G	G: 0.270	288	0.304	

MAF^a= proyecto 1000G MAF^b= población

Las frecuencias alélicas obtenidas del grupo piloto se analizaron posteriormente con el programa *Epitools Epidemiological calculators Ausvet*®, el cual considera las variables genéticas de la enfermedad para calcular la N mínima para cada uno de los SNPs. Se encontró que para todos los polimorfismos la N osciló entre 200 y 300 muestras, por lo que se determinó que se analizarían 500 muestras.

Genotipificación.

En este estudio se genotipificaron casos y controles utilizando qPCR, mediante la metodología *TaqMan® PreDesigned SNP Genotyping Assays*®. Para la discriminación alélica se utilizó el software *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, para identificar homocigotos para el alelo variante, así como heterocigotos y homocigotos para el alelo ancestral.

Análisis estadístico

La variable cuantitativa (edad) se describe como media en años. Las variables categóricas se describen como valor absoluto y porcentaje. Las diferencias de las variables cuantitativas entre los grupos se analizarán mediante prueba de t-student no pareada. Las diferencias de las variables categóricas entre los grupos serán analizadas mediante la prueba de χ^2 .

La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada SNP se probó mediante la comparación de las frecuencias genotípicas esperadas vs las observadas de los controles (Prueba de χ^2). Se utilizaron modelos de regresión logística multivariada para estimar los OR crudos y multivariados y su IC de 95% correspondiente para analizar las asociaciones entre los polimorfismos y el riesgo de cáncer de mama. Los intervalos de confianza se establecieron en 95% y los valores de P para considerar significancia

estadística se fijaron en < 0.05 . Se utilizó el paquete estadístico SPSS® v22.0 para el análisis de los datos.

CAPÍTULO VI: RESULTADOS

Características epidemiológicas, clínicas y patológicas de la población de estudio

Se analizaron un total de 1200 muestras, de las cuales 650 correspondió a casos y 550 a controles, recabadas de la base de datos del Laboratorio Nacional BIOBANCO. La edad media de los casos fue de 53 años (20-90), mientras que en los controles fue de 47 años (18-86). El porcentaje por rango de edad, así como el estado de procedencia de los sujetos en ambos grupos se describe en la *Tabla 3*:

<i>Tabla 3:</i> Distribución de la población respecto a su lugar de nacimiento y grupo de edad.			
		Casos (n=650)	Controles (n=550)
Estado de Nacimiento	Coahuila	4.6%	7.6%
	Chiapas	15%	5.2%
	Durango	1.7%	3.4%
	Nuevo León	49.2%	48.2%
	San Luis Potosí	6.7%	11.2%
	Tamaulipas	7.9%	8.6%

	Otros	14.9%	15.8%
Grupo de edad	<40	13.1%	23%
	40-50	29.5%	34.8%
	51-60	28.9%	21%
	61-70	18.6%	13%
	>71	5.4%	8.2%

Factores de Riesgo Ambientales

Respecto a las variables antropométricas, la media de peso en kg fue de 72 y 70 kg para los casos y controles, respectivamente. Además, se calculó el IMC de los sujetos, observándose una media de 24.9 para los casos y de 27.72 para los controles. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto a la prevalencia de obesidad entre los grupos (42% en casos vs 31% en controles). La distribución de los sujetos conforme a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se presenta en la *Tabla 3*:

Tabla 4: Distribución de la población de casos y controles según la clasificación de IMC de la Organización Mundial de la Salud.			
	Casos	Controles	P
Desnutrición	6 (1%)	6 (1.3 %)	.000114
Normal	133 (22%)	152 (32.1%)	
Sobrepeso	209 (34.5%)	175 (36-9%)	
Obesidad grado I	158 (26.1%)	98 (20.7%)	
Obesidad grado II	73 (12.1%)	31 (6.5%)	
Obesidad grado III	26 (4.3%)	12 (2.5%)	

Otros factores de riesgo ambientales

Así mismo, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos respecto a la prevalencia del consumo de alcohol y tabaco (Tabla 5)

Tabla 5: Frecuencia de consumo de alcohol y tabaco en los casos y controles.			
Factores de Riesgo	Frecuencia		
	Casos	Controles	P
<i>Alcohol</i>	11.2	13.3	0.044
<i>Tabaco</i>	18.2	20.3	0.043

Factores Hormonales

La media de edad de la menarca fue de 13 años para ambos grupos. Al momento de la recolección de los datos, el 61% de los casos y 39.8% de los controles se consideraron post-menopáusicas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. La distribución de los distintos factores reproductivos por grupo y el análisis se muestra en la *Tabla 5*:

Tabla 6: Prevalencia de factores hormonales de riesgo y protectores entre la población de casos y controles.			
	Casos	Controles	P
<i>Historia de uso de anticonceptivos orales</i>	28.1%	22.7%	0.034
<i>Historia de uso de Terapia de Reemplazo Hormonal</i>	8.4%	9.1%	NS
<i>Paridad (al menos 1 hijo nacido vivo)</i>	83.9%	82.1%	NS
<i>Edad (media) al nacimiento del primer hijo.</i>	23	23	NS
<i>Pacientes que tuvieron primer embarazo antes de los 30 años.</i>	74%	75.7%	NS
<i>Pacientes que tuvieron primer embarazo después de los 30 años</i>	8.4%	5.4%	0.05
<i>Lactancia (Al menos 6 meses en alguno de sus embarazos)</i>	66%	55.7%	NS
<i>Duración (media en meses) de la lactancia</i>	16.79	13.99	0.101

Características clínico-patológicas de la población de casos.

Respecto a la lateralidad del CM, el 48%, 44.8% y 2.4% fueron izquierdos, derechos y bilaterales (sincrónicos), respectivamente. Así mismo, el 20.2% de las pacientes al momento de la recolección se encontraban en fase metastásica. La distribución de los sitios de metástasis se describe en la *Tabla 5*:

Tabla 7: Distribución de los sitios de metástasis en la población de casos.	
Sitio de metástasis	Porcentaje
<i>Óseas</i>	32%
<i>Pulmonares</i>	25%
<i>Hepáticas</i>	13%
<i>Sistema Nervioso Central</i>	9%
<i>Ganglios Linfáticos</i>	15%
<i>Otros</i>	6%

De los casos, la mayoría se encontraban en etapas localmente avanzadas (IIB-IIIC: 68.5%), mientras que un 21.3 y 10.2% de los casos se encontraban en etapas tempranas (I-IIA) y avanzadas (IV), respectivamente. La distribución de los casos por etapa clínica se muestra en la *Tabla 7*.

<i>Tabla 8: Distribución de los casos por etapa clínica</i>	
Etapa clínica	Porcentaje
<i>Etapa I</i>	4.8%
<i>Etapa IIA</i>	16.6%
<i>Etapa IIB</i>	20.45%
<i>Etapa IIIA</i>	21.1%
<i>Etapa IIIB</i>	22.0%
<i>Etapa IIIC</i>	4.5%
<i>Etapa IV</i>	10.2%

En cuanto a la histología de los casos, un 71.8% de estos fueron Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI) mientras que un 6.3% fueron Carcinomas Lobulillares Infiltrantes (CLI) y 21.9% se clasificaron como otros subtipos histológicos. Respecto a los subtipos moleculares de los casos, el 62.6% expresaban receptores hormonales (RE ± RP por IHQ), 23% se consideraron HER2 Positivos (IHQ +++ ó FISH/SISH) y un 14.4% fueron Triples Negativos.

Frecuencias genotípicas del SNP rs2881766 (ESR1).

Para el SNP rs2881766 (ESR1) (*Tabla 9*) el genotipo más frecuente en los casos y controles fueron los homocigotos del alelo G con el 34.3% y 27.5%, respectivamente sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa entre

ambos grupos ($P=0.170$). El grupo control se encuentra dentro del EHW, mientras que la población de casos se encuentra fuera del EHW.

Tabla 9: Frecuencias genotípicas del SNP rs2881766 (ESR1) en la población de casos y controles.

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	P	OR	CI 95%
		N	286	251			
		TT	64 (22.4%)	61 (24.3%)		1	
					.170		
ESR1	rs2881766 (T→G)	TG	124 (43.4%)	121(48.2%)		0.98	0.63-1.5
		GG	98 (34.3%)	69 (27.5%)		1.35	0.85-2.16
		EHW	4.15	0.34			

Así mismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la prevalencia del SNP rs2881766 (ESR1) entre los casos y los controles, respecto al estado menopáusico o a la edad al nacimiento del primer hijo (*Tablas 10 y 11*).

Tabla 10: Análisis del SNP rs2881766 (ESR1) en mujeres pre-menopáusicas y post-menopausia.

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	p	OR	CI 95%
ESR1	rs2881766 (T→G)	Pre- Menopausia					
		N	100	129			
		TT	24 (24.0%)	27(20.9%)	.484	1	
		TG	45 (45.0%)	69 (53.5%)		0.73	0.38-1.43
		GG	31(31.0%)	33(25.6%)		1.06	0.51-2.21
		Post- Menopausia					
		N	175	96			
		TT	40(22.9%)	32 (33.3%)		1	
TG	72(41.1%)	38 (39.6%)	.129	1.52	0.82-2.79		
GG	63 (36.0%)	26 (27.1%)		1.94	1.01-3.72		

Tabla 11: Asociación del SNP rs2881766 (ESR1) con respecto a la edad al nacimiento del primer hijo.

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	P	OR	CI 95%
		Edad de la primera gesta < 30					
		N	207	173			
		TT	43(20.8%)	44(25.4%)	0.092	1	
		TG	94(45.4%)	88(50.9%)		1.6	0.66-1.82
		GG	70(33.8%)	41(23.7%)		1.75	0.99-3.09
ESR1	rs2881766	Edad de la primera gesta < 30					
	(T→G)	N	26	17			
		TT	9((34.6%)	6(35.3%)	.996	1	
		TG	9 (34.6%)	6(35.3%)		1.07	0.23-4.89
		GG	8 (30.8%)	5(29.4%)		1.07	0.23-4.89

Para el SNP rs2987983 (ESR2) (Tabla 12) el genotipo más frecuente en los casos y controles fueron los homocigotos del alelo T con el 44.3% y 44.4%, respectivamente sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($P=0.350$).

Tabla 12: Frecuencias genotípicas del SNP rs2987983 (ESR2).

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	P	OR	CI 95%		
ESR2		N=	287	268	<i>.350</i>	1			
		TT	127 (44.3%)	119 (44.4%)					
		TG	125 (43.6%)	126(47.0%)				0.93	0.65-1.32
		GG	35 (12.2%)	23(8.6%)				1.43	0.8-2.55
		EHW	0.25	1.67					

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia del polimorfismo rs2987983 en el gen ESR2 entre la población de casos y controles respecto al estado menopáusico o a la edad al nacimiento del primer hijo (Tablas 13 y 14)

Tabla 13: Análisis del SNP rs2987983 (ESR2) en mujeres pre-menopáusicas y post-menopáusicas.

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	P	OR	CI 95%		
ESR2	rs2987983 (A→G)	Pre- Menopausia							
		N	101	129	.484	1			
		AA	24(23.8%)	27(20.9%)					
		AG	46(45.5%)	69(53.5%)				0.75	0.76-2.61
		GG	31(30.7%)	33(25.6%)				1.06	0.51-2.21
		Post- Menopausia							
		N	175	96	.129	1			
		AA	40(22.9%)	32 (33.3%)					
AG	72(41.1%)	38(39.6%)	1.52	0.82-2.79					
GG	63(36.0%)	26 (27.1%)	1.94	1.01-3.72					

Tabla 14: Asociación del SNP rs2987983 (ESR2) con respecto a la edad al nacimiento del primer hijo.

Gen	SNP	Genotipos	Casos	Controles	P	OR	CI 95%		
Edad de la primera gesta < 30									
ESR2	rs2987983 (A→G)	N	213	187	.162	1			
		AA	91(42.7%)	86(46.0%)					
		AG	95(44.6%)	88(47.1%)				1.02	0.67-1.54
		GG	27(12.7%)	13(7.0%)				1.96	0.95-4.05
		Edad de la primera gesta < 30							
		N	27	19	.904	1			
		AA	13(48.1%)	10(52.6%)					
		AG	10(37.0%)	7(36.8%)				1.1	0.31-3.91
GG	4(14.8%)	2(10.5%)	1.54	0.23-10.15					

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

Este estudio representa el primer ensayo realizado en población mexicana con la finalidad de encontrar asociaciones entre la presencia de polimorfismos en los genes codificantes para los receptores de estrógenos (ESR1 y ESR2) y el cáncer de mama.

Uno de los hallazgos relevantes de este ensayo es que se confirma el papel de la obesidad como factor de riesgo significativo para el cáncer de mama como ya se ha reportado en otros estudios. ¹⁷

Respecto a la etapa clínica al diagnóstico en la población de casos, se encontró una mayor proporción de pacientes en etapas localmente avanzadas (47% vs 31% en Etapas IIIA-C) así como una menor proporción de etapas tempranas (41.85% vs 55.2% Etapas 0-IIb) respecto a lo reportado en otros estudios en nuestro país. ³ Esto pudiera explicarse dado que el centro de reclutamiento de los casos es considerado centro de referencia y por tanto las pacientes acuden en etapas más avanzadas. Para la etapa avanzada (Etapa IV) el porcentaje de casos al diagnóstico fue similar a los reportes nacionales (9.7 vs 10.2%). ³ En cuanto a la distribución por histología, así como los subtipos moleculares en la población de casos, se encontraron resultados similares a lo reportado en estudios nacionales e internacionales. ^{3, 16}

Por otra parte, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la prevalencia de tabaquismo y consumo de alcohol entre las poblaciones, siendo mayor para los controles que para los casos (13.3 vs 11.2% y 20.3 vs 18.2%, respectivamente). Esto pudiera explicarse dado que la mayoría de los pacientes adoptan cambios al estilo de vida tras el diagnóstico de cáncer dado el conocido impacto que tiene esta medida en la mortalidad por la enfermedad.

18

Si bien existe evidencia que algunos polimorfismos en los genes ESR1 y ESR2 han demostrado ser factores de riesgo para el cáncer de mama en algunas poblaciones asiáticas ¹⁴ y que se ha demostrado similitud genotípica entre la población mexicana y asiática ¹⁹, en este estudio, no se logró demostrar estadísticamente la asociación entre la presencia de los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2 y el cáncer de mama en población del noreste de México. Sin embargo, es posible que esta asociación pudiera demostrarse al aumentar el número de sujetos en la población de controles, pareándolos por grupos de edad

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN

Este estudio no logró demostrar asociación entre la presencia de los SNPs rs2881766 en el gen ESR1 / rs2987983 en el gen ESR2 y el riesgo de cáncer de mama en la población estudiada. Sin embargo, dados los hallazgos reportados en otras poblaciones, pudieran existir SNP's específicos para la población mexicana que permitan la identificación de factores de riesgo genéticos adicionales aún desconocidos para esta enfermedad. Lo anterior recuerda la importancia de incluir el análisis genómico como parte esencial de los estudios de investigación en el futuro.

CAPÍTULO IX: ANEXOS

9.1 Carta de Consentimiento Informado:

CAPÍTULO X: BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accesado el 03/06/2017.
2. CENAVECE. Anuarios de Mortalidad 1984-2016. Secretaría de Salud.
3. Cárdenas-Sánchez et al. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del Cáncer Mamario. Séptima Revisión. Elsevier, México 2017.
4. Vinayak Shabeta. "Molecular Biology of Breast Cancer." Devita, Hellman, and Rosenberg's Cancer : Principles & Practice of Oncology, 10th ed., Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins, 2015, pp. 1107–1113.
5. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 2000 Nov 15;152(10):950-64.
6. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Apr 17;94(8):606-16.
7. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* 2001 Oct 27;358(9291):1389-99.
8. Fagerberg L, Hallström BM, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Feb;13(2):397-406.

9. Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A et al. Postmenopausal endogenous oestrogens and risk of endometrial cancer: results of a prospective study. *Br J Cancer*. 2001 Apr 6;84(7):975-81.
10. Bartlett JM, Brookes CL, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1531-8.
11. Chandarlapaty S, Chen D, et al. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2016 Oct 1;2(10):1310-1315.
12. Dunning AM, Healey CS, et al. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Oct;8(10):843-54.
13. Gold B, Kalush F, et al. Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk. *Cancer Res*. 2004 Dec 15;64(24):8891-900.
14. Son BH, Kim MK, Yun YM et al. Genetic polymorphism of ESR1 rs2881766 increases breast cancer risk in Korean women. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Apr;141(4):633-45.
15. Treeck O, Elemenler E, Kriener C, Horn F, Springwald A, Hartmann A, Ortmann O. Polymorphisms in the promoter region of ESR2 gene and breast cancer susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009 Apr;114(3-5):207-11.
16. SEER Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.
17. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K; International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2016 Aug 25;375(8):794-8.

18. Lee Westmaas J, Berg CJ, Alcaraz KI, Stein K. Health behavior theory constructs and smoking and cessation-related behavior among survivors of ten cancers nine years after diagnosis: A report from the American Cancer Society's Study of Cancer Survivors-I. *Psychooncology*. 2015 Jul 2.
19. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. May 26;106(21):8611-6.

“RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO”

“Candidato para el Grado de”

Especialista en Oncología Médica

Título: *“Prevalencia de los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes ESR1 y ESR2 en pacientes con cáncer de mama y su asociación con el riesgo de cáncer de mama en población sana: Estudio de Casos y Controles”.*

Campo de estudio: Oncología

Biografía: Nacido en Monterrey N.L el 21 de abril de 1986

Nombre de los padres: Arturo Burguete Domínguez y Elizabeth Torres Pérez

Grado: Médico Cirujano – Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

Grado: Especialista en Medicina Interna – Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

*“Prevalencia de los polimorfismos rs2881766 y rs2987983 en los genes
ESR1 y ESR2 en pacientes con cáncer de mama y su asociación con el
riesgo de cáncer de mama en población sana: Estudio de Casos y
Controles”*

Aprobación de la tesis:

**Dra. en C. Ma. De Lourdes Garza Rodríguez
Director de la tesis**

**Dr. José Luis González Vela
Director de la tesis**

**Dr. David Hernández Barajas
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. Edio Llerena Hernández
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. Med. Oscar Vidal Gutiérrez
Miembro de la Comisión de Tesis**

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a Dios por la vida y por las abundantes bendiciones que derrama sobre mí. A mi esposa Jackeline, por ser mi fiel compañera en los momentos de dificultad, por su infinita paciencia, entrega y amor. A mis padres Lhiz y Arturo, por amarme incondicionalmente desde que fui pensado, por darme la maravillosa oportunidad de estudiar una carrera a pesar de las adversidades. A mi hermana Abdeth, por apoyarme y motivarme a ser siempre ejemplo para ella. A mis tíos Eduardo y Zaida, por estar siempre ahí para nosotros. A mis suegros Gilberto y Norma, por el gran cariño y apoyo que he recibido. A toda mi hermosa familia por brindarme esa calidez inigualable. A mis amigos por compartir las alegrías y disculpar las ausencias. Al Dr. Oscar Vidal, Dr. David Hernández y al Dr. Juan Francisco González, por la confianza y la oportunidad de continuar mi crecimiento profesional. A mis demás maestros: Dr. Edio Llerena, Dr. Jorge Martínez, Dr. José Luis González Vela, Dr. Adolfo Isassi, Dr. Luis Morales por el tiempo dedicado a mi aprendizaje y por la constante disposición para compartir su experiencia y conocimientos. A las Dra en C. María de Lourdes Garza, mtra. Frecia Rodríguez y Dra. Diana Pérez Ibañez, por permitirme formar parte de este gran proyecto. A mis compañeros residentes por la convivencia y el aprendizaje diario. Finalmente a todos los pacientes que he tenido el privilegio de tratar, pues aún sin conocerme, han confiado en mí y han puesto en mis manos el tesoro más preciado: su salud.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN.	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN.	4
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS.	10
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS.	12
Capítulo V	
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	13

Capítulo VI

6. RESULTADOS. 23

Capítulo VII

7. DISCUSIÓN. 37

Capítulo VIII

8. CONCLUSIÓN. 39

Capítulo IX

9. ANEXOS. 40

9.1 Carta de Consentimiento Informado. 40

Capítulo X

10. BIBLIOGRAFÍA.....	41
-----------------------	----

Capítulo XI

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	i
---------------------------------	---

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Condiciones de genotipificación por PCR-Tiempo Real.	19
2. Ensayo piloto para cálculo del tamaño mínimo de la muestra a partir de la frecuencia alélica.	20
3. Distribución de la población respecto a su lugar de nacimiento y grupo de edad.	23
4. Distribución de la población de casos y controles según la clasificación de IMC de la Organización Mundial de la Salud	25
5. Frecuencia de consumo de alcohol y tabaco en los casos y controles	25
6. Prevalencia de factores de riesgo hormonales en la población de estudio.	27
7. Distribución de los sitios de metástasis en la población de casos.	28
8. Distribución de los casos por etapa clínica.	29

9. Frecuencias genotípicas del SNP rs2881766 (ESR1) en la población de casos y controles.	31
10. Análisis del SNP rs2881766 (ESR1) en mujeres pre y post- menopausicas.. . . .	32
11. Asociación del SNP rs2881766 (ESR1) con respecto a la edad al nacimiento del primer hijo.	33
12. Frecuencias genotípicas del SNP rs2987983 (ESR2)..	34
13. Análisis del SNP rs2987983 (ESR2) en mujeres pre y post- menopáusicas.	35
14. Asociación del SNP rs2987983 (ESR2) con respecto a la edad al nacimiento del primer hijo.	36

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Detección de SNPs mediante sondas TaqMan.	18
2. Grafica de discriminación alélica.	19

LISTADO DE ABREVIATURAS

ESR1: Gen del Receptor de Estrógeno Tipo 1

ESR2: Gen del Receptor de Estrógeno Tipo 2

kDa: Kilodaltons

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

SNPs: Polimorfismos de Nucleótidos Simples

CM: Cáncer de Mama

UANL: Universidad Autónoma de Nuevo León

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

NS: No significativo

kg: Kilogramo

IMC: Índice de Masa Corporal

OMS: Organización Mundial de la Salud

