

**POLIMORFISMOS DEL GEN P53 EN CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN  
UNA POBLACION COLOMBIANA**

**YADIRA YLEANA PINTO QUINTERO**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
AREA BIOLOGIA  
BOGOTÁ D.C  
2006**

**POLIMORFISMOS DEL GEN P53 EN CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN  
UNA POBLACION COLOMBIANA**

**YADIRA YLEANA PINTO QUINTERO**

**Tesis para optar el título de Maestría en Ciencias Biológicas  
Área Biología**

**Directora**

**SANDRA RAMIREZ Ph.D**

**Co-directora**

**HELENA GROOT M.Sc**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
AREA BIOLOGIA  
BOGOTÁ D.C**

**2006**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

Jurado

---

Directora

---

Co-director

Bogotá, Diciembre 7 de 2005

*A Dios por ser mi guía espiritual,  
por darme unos padres maravillosos  
A mis Padres Jorge Antonio y Cruz Delina por creer siempre en mí,  
por su amor, comprensión apoyo, por sus sabio consejos  
y sin los cuales no habría salido adelante en esta maestría.  
A mi Hna Fabiola, a mis sobrinos Marianella y Fabio Andrés  
que han sido un motor en mi vida.  
A mi familia, tías, tíos, primos y a abuelita que  
siempre han confiado y creído en mí como persona*

**AGRADECIMIENTOS**

QUIERO EXPRESAR MIS AGRADECIMIENTOS A:

**Sandra Ramírez**, PhD y Directora de la investigación por abrirme de las puertas de la Universidad del Rosario, su orientación, apoyo y paciencia.

**Helena Groot**, MSc y co-directora por su apoyo en la Universidad de los Andes

Los Doctores:

De la Unidad Oncológica del Country: **José Joaquín Caicedo MD, José Fernando Robledo MD**

Del Hospital Militar Central: **William Sánchez MD, Diego Vanegas MD, Alfredo Ballén MD**

De la Fundación Santafé de Bogotá: **Fabio Torres MD**

De la Clínica San Pedro Claver: **Gabriel Bernal MD**

Por su apoyo en la obtención de las pacientes participantes

**Victoria Villegas MSc** por su apoyo en la elaboración de este trabajo

**Ignacio Briceño MD** por su apoyo en la elaboración de este trabajo

**Milciades Ibáñez MSc** por su apoyo y asesoría estadística de este trabajo

**La Fundación ONES** por su apoyo en la obtención de las pacientes

**Las pacientes** participantes por su colaboración en este trabajo

**CONTENIDO**

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general	2
2.1.1 objetivos específicos	2
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	3
3.1. Cáncer de mama	5
3.1.1 Tipos de cáncer de mama	6
3.1.2 Estadios del cáncer	8
3.1.3 Factores de riesgo	9
3.1.4 Factores relacionados con el estilo de vida	11
3.1.5 Cuadro clínico	12
3.1.6 Diagnóstico	13
3.1.7 Tratamiento	15
3.1.8 Seguimiento	16
3.2 Aspectos del cáncer de mama en Colombia	16
3.3 p53 y el cáncer de mama	19
3.3.1 Características de p53	19
3.3.2 Alteraciones en la función de p53	23
3.3.3 Polimorfismos del gen p53	24
4. METODOLOGÍA	28
4.1 Población de estudio	28
4.1.1 Selección de la población de estudio	28
4.1.2 Criterios de inclusión	28
4.1.3 Criterios de exclusión	30

4.1.4 Encuesta (hoja de registro)	30
4.2 Genotipificación	31
4.2.1 Extracción de ADN	31
4.2.2 Análisis de PCR-RFLP del polimorfismo del codón 72 del gen p53	31
4.2.3 Análisis de PCR-RFLP del polimorfismo del intrón 6 del gen p53	33
4.2.4 Análisis de PCR del polimorfismo del intrón 3 del gen p53	34
4.3 Análisis estadístico	36
5. RESULTADOS	37
5.1 Características de la población de estudio	37
5.2 Características clínicas en casos y controles	37
5.3 Relación entre la edad de la menarquia, edad del primer embarazo, la nuliparidad y el índice de masa corporal como factores de riesgo en el cáncer de mama	39
5.4 Distribución de los hábitos alimenticios y estilos de vida	42
5.5 Descripción de características clínico patológicas en los casos de cáncer de mama heredo familiar.	44
5.6 Características genéticas de los polimorfismos del gen p53	46
5.6.1 Polimorfismo del codón 72	46
5.6.1.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del codón 72 en casos y controles	46
5.6.1.2 Relación de los genotipos del codón 72 y el riesgo a cáncer de mama heredo familiar	47
5.6.1.3 .Relación de los genotipos del codón 72 y el riesgo a cáncer de mama con otros factores de riesgo	48
5.6.1.4 Relación entre los polimorfismos del codón 72 en los casos de cáncer de mama heredo familiar vs. las características clínico patológicas	48
5.6.2 Polimorfismo del intrón 6 del gen p53	49
5.6.2.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del intrón 6 del genp53 en casos y controles	49
5.6.2.2 Relación entre el genotipo del intrón 6 y el riesgo a	

cáncer de mama heredo familiar	50
5.6.2.3 Relación de los genotipos del intrón 6 y el riesgo a cáncer de mama con otros factores de riesgo	51
5.6.2.4 Relación entre los polimorfismos del intrón6 en los casos de cáncer de mama heredo familiar vs. las características clínico patológicas.	51
5.6.3 Polimorfismo del intrón 3 del gen p53	52
5.6.3.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del intrón3 del gen p53 en casos y controles	52
5.6.3.2 Asociación entre el genotipo del intrón 3 y el riesgo a cáncer de mama heredo familiar	53
5.6.3.3 .Relación de los genotipos del intrón 3 y el riesgo a cáncer de mama con otros factores de riesgo	54
5.6.3.4 Asociación del polimorfismo del intrón 3 en los casos de cáncer de mama heredofamiliar y las características clínico patológicas.	55
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
7. RECOMENDACIONES	64
8. CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	73



## LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Secuencia de los Iniciadores para el codón 72	31
Tabla 2. Composición de la Reacción en la Cadena de la polimerasa	32
Tabla 3. Perfil Térmico Utilizado para PCR del polimorfismo del codón 72 del gen p53	32
Tabla 4. Secuencia de los Iniciadores para el polimorfismo del Intrón 6 del gen p53	33
Tabla 5. Composición de la Reacción en la Cadena de la polimerasa	33
Tabla 6. Perfil Térmico Utilizado para PCR del polimorfismo del intrón 6 del gen p53	34
Tabla 7. Secuencia de los Iniciadores Para el polimorfismo del intrón 3	35
Tabla 8. Composición de la Reacción en la Cadena de la polimerasa	35
Tabla 9. Perfil Térmico Utilizado para PCR del polimorfismo del intrón 3 del gen p53	35
Tabla 10. Características Sociodemográficas en casos y controles	38
Tabla 11. Características Clínicas en casos y controles	38
Tabla 12. Antecedentes Gineco-Obstétricos	39
Tabla 13. Edad de la menarquia, edad del primer embarazo, nuliparidad e índice de masa corporal (IMC) asociados al cáncer de mama,	42
Tabla 14. Hábitos Alimenticios en Casos y Controles	43
Tabla 15. Frecuencia de Consumo de Hábitos Alimenticios y Estilo de Vida	44
Tabla 16. Características Clínico Patológicas de los casos de cáncer de mama	45

Tabla 17. Distribución de Frecuencias genotípicas y alélicas del codón 72 en casos y controles	47
Tabla 18. Asociación entre el genotipo del codón 72 de p53 y el riesgo a Cáncer de mama	48
Tabla 19. Asociación entre el genotipo del codón 72 y factores de riesgo hallados en el presente estudio	48
Tabla 20. Relación entre los genotipos del codón 72 y las características clínico patológicas de los casos.	49
Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas del Intrón6 en casos y controles	50
Tabla 22. Asociación entre el genotipo de intrón 6 y el riesgo a Cáncer de mama	51
Tabla 23. Asociación entre el genotipo del Intrón 6 y los factores de riesgo hallados en el presente estudio	51
Tabla 24. Asociación entre los genotipos del Intrón 6 y las características clínico patológicas de los casos.	52
Tabla 25. Frecuencias genotípicas y alélicas del Intrón 3 en casos y controles	53
Tabla 26. Asociación entre el genotipo de intrón 3 y el riesgo a Cáncer de mama	54
Tabla 27. Asociación entre el genotipo del intrón 3 y factores de riesgo hallados en el presente estudio	54
Tabla 28. Asociación entre los genotipos del Intrón 3 y las características clínico patológicas de los casos.	55

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Diez primeras localizaciones primarias de casos de cáncer.	17
Figura 2. Diez primeras localizaciones de casos de cáncer, por sexo	18
Figura 3. Vías de Apoptosis	23
Figura 4. Edad promedio e IC del 95% de la edad de la Menarquia en casos y controles	40
Figura 5. Número promedio de la edad del primer embarazo e IC del 95% en casos y controles	41

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO 1. Consentimiento Informado	73
ANEXO 2. Hoja de Registro	76
ANEXO 3. Técnica de Extracción de ADN "Método PROBE"	78
ANEXO 4 Fotografía de RFLP's del polimorfismo del codón 72 del gen p53	79
ANEXO 5. Fotografía del Polimorfismo del intrón 3	80
ANEXO 6 Fotografía de RFLP's del polimorfismo del intrón 6	81

## RESUMEN

El gen p53 se encuentra frecuentemente mutado en el 50% de los carcinomas humanos. Varios estudios han mostrado una asociación entre el riesgo al cáncer de mama y los polimorfismos genéticos en el exón 4 (codón 72) intrón 3 (duplicación de 16pb) e intrón 6 (MspI) de este gen, sin embargo los resultados han sido inconsistentes. El objetivo del presente estudio de casos y controles fue analizar la asociación de los genotipos y las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos del gen p53 con el riesgo al cáncer de mama familiar. Se analizaron 186 pacientes con cáncer de mama familiar y 186 controles, las frecuencias alélicas y genotípicas fueron determinadas por análisis de RFLP y se midió la fuerza de asociación mediante la razón de disparidad (Odds ratio: OR) con una significancia de la asociación utilizando el intervalo de confianza del 95% (IC) usando el programa estadístico SPSS 11,5. Los resultados indicaron una presencia de los genotipos del codón 72, Arg/Arg de un 61,3% en los casos versus un 44,2% de los controles con un de OR=2,19 (IC=1,33-3,63), Arg/Pro (32,3% vs. 45,7%) y Pro/Pro (6,5% vs. 10,2%) y una frecuencia alélica de Arg de 77,4% en los casos comparado con un 67% de los controles. La frecuencia de los genotipos del intrón 6 fueron entre casos y controles W/W (75,3% vs. 82,3%), W/M (24,2% vs. 15,6%) y M/M (0,5% vs. 2,2%) mientras que las frecuencias genotípicas para el intrón 3 fueron W/W (90,3% vs. 98,9%), W/M (8,6% vs. 0,5% OR=18; CI=2,25-141,84), cuando se comparó con el genotipo W/W) y M/M (1,1% vs. 0,5%). Se puede concluir que nuestros resultados tienen una importante asociación entre el genotipo Arg/Arg del codón 72 y el genotipo W/M intrón 3 con el riesgo al cáncer de mama familiar.

Palabras Claves: Cáncer de mama, polimorfismos, p53

**Abstract:** The p53 tumor suppressor gene is frequently mutated in many forms of human carcinomas. Several studies have reported the association between breast cancer risk and genetic polymorphisms of p53 at exon 4 (codon 72), intron 3 (16bp duplication), intron 6 (MspI). However, the results are inconsistent. The purpose of the present case-control study was to analyze and correlate the genotype and allele frequencies at the three polymorphisms in p53 with the risk of familial breast cancer.

**Methods:** We analyzed 186 familiar breast cancer patients and 186 controls recruited from oncologic units of the Military Hospital, Country Clinic and Santafé de Bogotá Foundation. p53 genotype and allele frequencies were determined by RFLP analysis of peripheral blood DNA by direct counting. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) for breast cancer risk was done by logistic regression analysis using the SPSS 11.5 software.

**Results:** Frequency of codon 72 genotype polymorphism was Arg/Arg (61,3% vs. 44,2%; OR=2,19; CI:1,33-3,63, compared to Arg/Pro) Arg/Pro (32,3% vs. 45,7%), Pro/Pro (6,5% vs. 10,2%) between patients and controls respectively. Arg72 allele frequency was 77,4% and 67% (p=0,001) for patients and controls respectively. Frequency of intron 6 genotype polymorphism was W/W (75,3% vs. 82,3%), W/M (24,2% vs. 15,6%) M/M (0,5% vs. 2,2%); while frequency of intron 3 genotype polymorphism was W/W (90,3% vs. 98,9%), W/M (8,6% vs. 0,5% OR=18; CI:2,25-141,84, compared to W/W) and M/M (1,1% vs. 0,5%), between patients and controls.

**Conclusions:** Our results support the important association between p53 codon 72 Arg/Arg and intron 3 W/W polymorphisms and risk of familial breast cancer.

## 1. INTRODUCCION

En Colombia, el cáncer de mama es la tercera causa de muerte por cáncer después del cáncer gástrico y cuello uterino. En países desarrollados una de cada nueve mujeres desarrolla cáncer de mama a lo largo de su vida y la tercera parte de ellas, muere debido a esta neoplasia (Castro Miguel Ángel, 2003; Dunning et al., 1999). Del total de casos de cáncer de mama, el 10-15% son de origen familiar, de los cuales el 5% se puede asociar con mutaciones en genes de alta penetrancia como BRCA1 y BRCA2. Adicionalmente, los individuos que tienen antecedentes familiares presentan un riesgo 2 veces mayor a desarrollar la enfermedad que la población general. Sin embargo, este riesgo no puede ser explicado únicamente por alteraciones en los genes BRCA1/BRCA2, sino que existen variantes genéticas de baja penetrancia que pueden estar asociados al desarrollo de la enfermedad, como los polimorfismos presentes en genes asociados a cáncer de mama, como p53. (Coughlin & Piper, 1999; Khaliq et al., 2000; Suspitsin et al., 2003).

El gen p53 que codifica para una proteína reguladora de la apoptosis, la reparación del ADN y del ciclo celular, posee tres polimorfismos que están asociados al cáncer de mama: el codón 72 codifica para una proteína que puede tener prolina o arginina y tiene el sitio de corte para la enzima de restricción BstUI (Pro72Arg), el intrón 6 ( MspI) y la inserción de 16 pb del intrón 3(Buyru, Tigli, & Dalay, 2003; Coughlin & Piper, 1999; Dunning et al., 1999; Khaliq et al., 2000; Papadakis, Dokianakis, & Spandidos, 2000; Sjalander et al., 1996; Suspitsin et al., 2003; Wang-Gohrke, Becher, Kreienberg, Runnebaum, & Chang-Claude, 2002).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Describir la frecuencia de los polimorfismos del codón 72, del intrón 3 e intrón 6 del gen p53, en una población colombiana con cáncer de mama familiar con respecto a un grupo control de individuos sin antecedentes de cáncer.

#### **2.1.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo del codón 72 del gen p53
- Determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo de la inserción en el intrón 3 de 16pb del gen p53.
- Determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo del intrón 6 (A/G) Msp I del gen p53
- Determinar si existe asociación entre los polimorfismos del gen p53 en el codón 72, intrón 6 (A/G) MspI o Inserción en el intrón 3 de 16pb y la presencia de cáncer de mama familiar.

### **3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE**

El cáncer de mama es una enfermedad común en los países occidentales, en donde la prevalencia de esta enfermedad es de 1 de cada 12 mujeres (Reino Unido) y 1 de cada 8 mujeres (USA) (Dunning et al., 1999). En Colombia en el año 2002 en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) se diagnosticaron 4990 casos nuevos de cáncer, 576 casos más que en el año 2001 lo que representa un incremento de 13 % con respecto al año 2001, de estos el 61.5% se presentaron en mujeres. El cáncer de cuello uterino fue el más común en las mujeres (23,4%), seguido por el de mama (19,7%) y el de piel (11,8%). Del total de casos nuevos para todos los tumores, el cáncer de mama ocupa el tercer lugar en frecuencia en la población colombiana y el segundo en el sexo femenino (Constanza Pardo, 2002)

Más del 60% de los casos que ingresan al INC se encuentran en estadíos clínicos tardíos (Estadios III y IV) y tan solo 4.8% lo hacen en estadíos tempranos (in situ y I). Por tanto, es importante realizar investigaciones que conduzcan no sólo a la detección temprana de cáncer de mama sino además a la identificación de factores que contribuyan al desarrollo de la enfermedad, especialmente en la población más susceptible como sería aquella que tiene antecedentes de cáncer de mama familiar. Entre estos factores se puede incluir el aporte genético dado por las variaciones en la secuencia de los genes y conocidos como polimorfismos.

Se han reportado estudios genéticos que analizan la asociación entre el polimorfismo del codón 72 de p53 en diferentes poblaciones



(Dunning et al., 1999; Ohayon et al., 2005; Papadakis et al., 2000); sin embargo, muchos de ellos no tienen en cuenta el componente étnico o no hacen la diferenciación de este. Es relevante tener en cuenta la diferencia étnica de las poblaciones en la determinación de la influencia del legado genético en la carcinogénesis, por lo tanto aunque hay estudios estadísticamente significativos que describen la asociación existente entre los polimorfismos de gen p53 y el cáncer de mama, es importante analizar esta asociación en nuestra población colombiana.

El cáncer es una enfermedad de tipo multifactorial porque para que se produzca y desarrolle intervienen tanto factores genéticos como ambientales. Entre los factores genéticos se consideran principalmente la presencia de genes que confieren una predisposición para la aparición de la enfermedad. También son factores genéticos la ocurrencia de mutaciones heredadas o producidas de manera esporádica en genes que participan o que regulan procesos celulares como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Factores ambientales también pueden alterar el correcto funcionamiento de las células, entre ellos están los compuestos químicos, agentes físicos como las radiaciones o microorganismos que causan infecciones y alteran los mecanismos de regulación de diferentes actividades celulares. Los compuestos químicos considerados como citogeno-tóxicos o cancerígenos pueden intercalarse en la estructura del ADN alterando los procesos de transmisión de la información, o pueden dañar organelos claves en el funcionamiento celular como por ejemplo las mitocondrias. Las radiaciones ionizantes y las ultravioleta, causan rupturas en el ADN o modificaciones de su estructura, dependiendo de la gravedad del daño pueden ser o no reparados por mecanismos especializados que se activan en las células. Si estos daños no pueden ser reparados se activa en la célula alterada el proceso de muerte celular programada o apoptosis, pero si alguno de los genes claves que participan en este proceso o que lo regulan, también se encuentra alterado, entonces al no desencadenarse la apoptosis la célula puede continuar proliferando y transmitiendo de esta manera, las mutaciones sufridas. Si las mutaciones se

acumulan pueden llegar a desencadenar procesos tumorigénicos. Por otro lado los virus también pueden inducir el desarrollo de procesos cancerosos en las células que infectan, ejemplos de estos virus son el herpes virus y el papillomavirus HPV 7 (asociados a cáncer de cuello uterino), y el adenovirus que cuando infecta una célula induce la síntesis de proteínas virales (E1A, E1B, etc) que generalmente se asocian con proteínas como p53 y pRB bloqueando su función normal y conduciendo a la célula hacia una transformación celular.(Cooper & Hausman, 2004)

En los procesos de transformación celular hay un cambio de conducta en las células que puede manifestarse como: pérdida de adherencia célula/célula o célula-sustrato, pérdida de la inhibición por contacto, reducción o desorganización del citoesqueleto, aparición o desaparición de proteínas de membrana (antígenos asociados a tumor), proliferación celular descontrolada y dotación cromosómica aberrante. Desde el momento de la transformación de una célula hasta la aparición del tumor ocurren múltiples eventos que los oncólogos han descrito como: displasia, carcinoma *in situ*, carcinoma maligno y metástasis. Según el tipo de tejido afectado y el tipo de cáncer que se esté produciendo se determinan diferentes etapas que describen el grado de evolución de la neoplasia, así por ejemplo en el cáncer de mama la Etapa 0 corresponde al carcinoma *in situ* y en Etapa IIIB se consideran las metástasis a otros órganos como huesos, pulmones, hígado y cerebro.(Alberts, 2002; Lodish, 2004)

### **3.1. Cáncer de mama**

La mama está formada por una serie de glándulas mamarias, que producen leche tras el parto, y a las que se les denomina lóbulos y lobulillos. Los lóbulos se encuentran conectados entre sí por unos tubos, conductos mamarios, que son los que conducen la leche al pezón, durante la lactancia. Las glándulas (o lóbulos) y los conductos mamarios están inmersos en el tejido adiposo y en el tejido conjuntivo, que, junto con el tejido linfático, forman la mama. A modo de muro de

contención, actúa el músculo pectoral que se encuentra entre las costillas y la mama. La piel recubre y protege toda la estructura mamaria (Crum, 2003)

El sistema linfático está formado por recipientes y vasos o conductos que contienen y conducen la linfa, que es un líquido incoloro formado por glóbulos blancos, en su mayoría linfocitos. Estas células reconocen cualquier sustancia extraña al organismo y liberan otras sustancias que destruyen al agente agresor (Crum, 2003)

### **3.1.1 Tipos de cáncer de mama**

Los tumores constituyen la lesión más importante de la mama y son muchos más comunes en las mujeres que en los hombres. La mayoría de los tumores que se producen en la mama son benignos y son debidos a cambios fibroquísticos. El quiste es como una bolsa llena de líquido y la fibrosis es un desarrollo anormal del tejido conjuntivo. La fibrosis no aumenta el riesgo de desarrollar un tumor y no requiere de un tratamiento especial. Los quistes, si son grandes, pueden resultar dolorosos. La eliminación del líquido con una punción suele hacer desaparecer el dolor. La presencia de uno o más quistes no favorece la aparición de tumores malignos (Crum, 2003)

Dentro de los tumores malignos, existen varios tipos en función del lugar de la mama donde se produce el crecimiento anormal de las células y según su estadio. Los tumores pueden ser localizados o extenderse, a través de los vasos sanguíneos o mediante los vasos linfáticos, y dar lugar a metástasis, es decir, a un cáncer en un órgano distante al originario (Crum, 2003)

El cáncer de mama se clasifican en:

**Carcinoma ductal in situ:** se define como una población maligna de células que carecen de capacidad de invadir otros tejidos a través de la membrana basal. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas ni ha producido metástasis, tiene una amplia variedad de patrones histológicos entre los cuales

están el sólido, cribiforme, papilar y micropapilar. Por este motivo esta enfermedad 'pre maligna' puede extirparse fácilmente. Este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía y comúnmente las calcificaciones se asocian con este tipo de carcinoma. Las personas a las que se les diagnostica este tipo de cáncer tienen una tasa de supervivencia cerca del 97% (Crum, 2003)

**Carcinoma ductal infiltrante** (o invasivo) se inicia en el conducto mamario, este tipo de tumor presenta masas o nódulos palpables, bien delimitados de consistencia pétreo. Las células invaden el estroma del tejido conectivo y logran atravesarlo, pasan al tejido adiposo de la mama y luego puede extenderse a otras partes del cuerpo. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en el 70 % al 80% de los casos (Crum, 2003).

**Carcinoma lobular in situ** se origina en las glándulas mamarias (o lóbulos) se manifiesta por una proliferación celular, en uno o más de los conductos terminales, tiene una apariencia uniforme y es un carcinoma que se presenta de manera incidental, no forma masas y raramente está asociado con calcificaciones. Aproximadamente 1 de cada 3 mujeres pueden eventualmente llegar a desarrollar carcinomas invasivos. Se suele presentar antes de la menopausia. Una vez que es detectado, es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer (Crum, 2003).

**Carcinoma lobular infiltrante** (o invasivo) Se trata de una forma morfológica característica de cáncer de mama que surge de los conductillos terminales del lobulillo mamario, se puede extender a otros tejidos del cuerpo como ovario, útero, y médula ósea. Entre el 10% y el 20% de este carcinoma es multicéntrico y bilateral, expresa receptores hormonales y rara vez expresa el oncogen ERBB2 (Crum, 2003)

**Carcinoma inflamatorio** es un cáncer poco común, tan sólo representa un 1% del total de los tumores cancerosos de la mama. Es agresivo y de rápido crecimiento. Hace enrojecer la piel de la mama y aumentar su temperatura. La

aparición de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja, y pueden aparecer arrugas y protuberancias. Estos síntomas se deben al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos (Crum, 2003)

### 3.1.2 Estadios del Cáncer

El cáncer tiene un pronóstico y tratamiento distintos en función de la etapa de desarrollo en el momento del diagnóstico en que se encuentre y de los factores de riesgo que tenga la mujer. Hay que realizar una serie de análisis que facilitan su clasificación en uno u otro estadio.

El Comité Conjunto Norteamericano del Cáncer (American Joint Committee on Cancer Staging of Breast Carcinoma) utiliza el sistema de clasificación TNM:

- La letra **T**, seguida por un número que va del 0 al 4, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o a la pared del tórax debajo de la mama. A un número más alto le corresponde un tumor más grande y/o una mayor propagación a los tejidos cercanos.
- La letra **N**, seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y, si es así, si estos ganglios están adheridos a otras estructuras.
- La letra **M**, seguida por un 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes.

La clasificación, para los subgrupos, se realiza con números que van del 0 al IV. (Crum, 2003)

**ESTADIO 0:** para carcinomas ductal in situ, incluye enfermedad de Paget en el pezón

**ESTADIO I:** indica que el tumor es menor de 2 cm. y no hay metástasis.

**ESTADIO II:** abarca las siguientes situaciones:

**-Estadio IIA:** Carcinomas de 2 cm. o menos, con metástasis a los nódulos linfáticos

**-Estadio IIB:** Carcinomas entre 2 y 5 cm. con nódulos linfáticos positivos o carcinomas con tamaño superior a 5 cm. pero con nódulos linfáticos negativos.

**ESTADIO III:** se divide en estadio IIIA y IIIB:

**-Estadio III A:**

-El tumor tiene cualquier tamaño y se ha fijado a nódulos linfáticos y éstos están unidos entre sí o a otras estructuras.

-El tumor mide más de 5 cm. y los ganglios linfáticos axilares están afectados.

**-Estadio III B:**

- El cáncer ha invadido otros tejidos cerca de la mama (piel, pared torácica, incluyendo costillas y músculos del tórax).

- El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro de la pared torácica cerca del esternón.

**ESTADIO IV:** se produce cuando el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo. Los órganos en los que suele aparecer metástasis con mayor frecuencia son los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro. También puede ser que el tumor haya afectado localmente a la piel. (Crum, 2003)

### **3.1.3 Factores de riesgo**

La causa del cáncer de mama no se conoce pero sí se sabe de algunos factores de riesgo.

**Sexo:** El cáncer de mama se da principalmente en la mujer, aunque también puede afectar a los hombres pero la probabilidad es mucho menor cerca del 1% del total de casos de mama ocurre en los hombres.(Giordano, Buzdar, & Hortobagyi, 2002)

**Edad:** Una mayor edad con lleva un aumento del número de cánceres. El 60% de los tumores de mama ocurren en mujeres de más de 60 años y el 3% ocurre en

mujeres menores de 40 años.(Jernstrom, Loman, Johannsson, Borg, & Olsson, 2005) Este porcentaje aumenta mucho más después de los 75 años.

**Antecedentes Familiares y Genéticos:** Cuando se tiene historia familiar de cáncer de mama, en parientes de primer grado se tiene un riesgo relativo de 1, 2 a 3,0 y de 4 a 6 veces más de desarrollar la enfermedad en las personas que tiene 2 familiares afectados.(Crum, 2003). Del total de casos de cáncer de mama, el 10-15% son de origen familiar, de los cuales el 5% se puede asociar con mutaciones de alta penetrancia en genes tales como BRCA1 y BRCA2. Adicionalmente, los individuos que tienen antecedentes familiares presentan un riesgo 2 veces mayor a desarrollar la enfermedad que la población general. Sin embargo, este riesgo no puede ser explicado únicamente por alteraciones en los genes BRCA1/BRCA2, sino que existen variantes genéticas de baja penetrancia que pueden estar asociados al desarrollo de la enfermedad, dentro de las cuales se incluyen los polimorfismos para el gen p53.(Dunning et al., 1999; Papadakis et al., 2000; Wang-Gohrke et al., 2002; Weber & Nathanson, 2000)

**Antecedentes personales:** Una enfermedad mamaria benigna previa parece aumentar el riesgo en aquellas mujeres que tienen un gran número de conductos mamarios. Aún así, este riesgo es moderado. Algunos resultados anormales de biopsia de mama pueden estar relacionados con un riesgo ligeramente elevado de padecer cáncer de mama. El riesgo de desarrollar cáncer en la otro mama en aquellas mujeres que han tenido un cáncer de mama es distinto de la recurrencia o reaparición del primer cáncer (Crum, 2003)

**Raza:** El riesgo de desarrollar esta neoplasia es significativamente más alto en Norte América y el Norte de Europa que en Asia y África. La tasa de incidencia y mortalidad es más alta en los Estados Unidos que en Japón.(Crum, 2003)

**Edad de la Menarquia:** La edad de la menarquia no solo sirve como un indicador cronológico de la actividad ovárica, sino que también es un predictor de la frecuencia ovulatoria durante la adolescencia y los niveles hormonales en los adultos jóvenes. Mujeres que presentan menarquias a edades tempranas (menor

de 12 años) tienen un riesgo mayor al cáncer de mama comparadas con aquellas con menarquias tardías (después de los 14 años), lo mismo ocurre con la menopausia: las mujeres con una menopausia tardía (después de los 55 años) tienen mayor riesgo.(Kelsey, Gammon, & John, 1993). Una reducción del riesgo cercano del 9% se ha establecido por cada año adicional en la menarquia cuando el cáncer es diagnosticado antes de la menopausia y cerca del 4% cuando es diagnosticado después. (Zografos, Panou, & Panou, 2004).

**Paridad:** Es más frecuente en nulíparas que en multíparas.(Lester, 2000)

**Edad al momento de tener el Primer Hijo:** El riesgo es mayor cerca de 5 veces más cuando la mujer tiene mas de 30 años cuando tiene su primer hijo que aquellas que lo han tenido antes de los 20 años.(Lester, 2000; Zografos et al., 2004)

### **3.1.4 Factores relacionados con el estilo de vida**

**Uso prolongado de anticonceptivos:** El aumento del riesgo de cáncer de mama puede deberse principalmente al componente estrogénico de las píldoras, a mayor dosis mayor es el riesgo, a la duración de su uso y a la edad de la mujer, el riesgo relativo (RR) en mujeres entre los 25 y 34 años que usaron los anticonceptivos hormonales por un año es 1,7 veces más que aquellas que los usaron por menos de 1 año, se tiene un RR de 0,9 en mujeres entre los 35 y 44 y de 1,2 entre los 45 y 49 años. El uso prolongado por más de 12 años tiene un RR de 1,3 y es más evidente en mujeres menores de 35 que en las mayores de 45 años ya que aquí se presentan controversias . (Althuis et al., 2003; Rosenberg et al., 1996; Weber & Nathanson, 2000; Zografos et al., 2004)

**Terapia de Reemplazo hormonal (TRH):** Esta terapia, que se utiliza para aliviar los síntomas de la menopausia, parece aumentar a largo plazo (más de 10 años) el riesgo de sufrir cáncer de mama, de acuerdo a varios estudios de casos y controles el riesgo tiende a aumentar de acuerdo al mayor tiempo de uso TRH continua combinada (estrógenos-progestina) con un riesgo relativo (RR) entre 2,5



y 4,6, el uso de gestagen solamente tiene un RR de 3,74, el uso de TRH secuencial (uso de estrógenos más progestina por menos de 25 días al mes) tuvo un riesgo relativo entre 1,5 y 2,23.(Daling et al., 2002; Olsson, Ingvar, & Bladstrom, 2003) El uso de terapia únicamente estrogénica en algunos estudios no muestra una asociación con el aumento al riesgo a cáncer de mama, mientras que otros estudios si lo hace.(Kirsh & Kreiger, 2002; Newcomb et al., 2002)

**Alcohol:** El consumo de alcohol ha sido vinculado al riesgo elevado de cáncer de mama, recientemente la ingesta de alcohol ha mostrado una asociación significativa con el cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. (Tjonneland et al., 2004; Zografos et al., 2004)

**Exceso de peso:** Las dietas ricas en grasa se han asociado como factor de riesgo, mujeres que tienen una dieta rica en grasa animal o alto consumo de carnes rojas tienen un riesgo alto de desarrollar cáncer de mama.(Jardines, 2005) La relación entre la obesidad y el cáncer de mama depende del estado menopáusico de la mujer, la obesidad se sabe que es un factor de riesgo en la postmenopausia y puede ser un factor protector en la premenopausia (Zografos et al., 2004).

**Estado Socioeconómico:** La incidencia del cáncer de mama es más alto en mujeres de estrato socioeconómico elevado, esto está probablemente relacionado con el nivel académico y edad del primer hijo (Jardines, 2005)

### **3.1.5 Cuadro Clínico**

La presentación clínica del cáncer de mama es de amplio espectro, puede variar desde la ausencia de signos y síntomas, en cuya situación el diagnóstico es imagenológico, hasta cuadros clínicos evidentes que se caracterizan por la presencia de masa firme e indolora, alteraciones en la piel, tales como retracción del tejido mamario, enrojecimiento, edema, ulceración y/o retracción del pezón.(Carranza, 2001)

En los estadíos iniciales del cáncer de mama la mujer no suele presentar síntomas. El dolor de mama no es un signo de cáncer aunque el 10% de estas pacientes lo suelen presentar sin que se palpe ninguna masa. El primer signo suele ser una masa que, al tacto, se nota diferente del tejido mamario que lo rodea. Se suele notar con bordes irregulares, duro, que no duele al tocarlo. En ocasiones aparecen cambios de color y tirantez en la piel de la zona afectada.(Lester, 2000)

No todos los tumores malignos presentan estas características pues algunos tienen bordes regulares y son suaves al tacto. En las primeras fases, el bulto bajo la piel se puede desplazar con los dedos. En fases más avanzadas, el tumor suele estar adherido a la pared torácica o a la piel que lo recubre y no se desplaza. El nódulo suele ser claramente palpable e incluso los ganglios de las axilas pueden aumentar de tamaño. Los síntomas de estas etapas son muy variados y dependen del tamaño y la extensión del tumor.(Lester, 2000)

### **3.1.6 Diagnóstico**

**Autoexamen:** El **autoexamen** se debe iniciar hacia los 20 años, esta técnica permite detectar pequeños cambios que puedan ocurrir en los mamas en las mujeres que lo realizan regularmente; este debe realizarse después de pasada la menstruación, las mujeres menopáusicas deberán asociarla a un día del mes, pues conviene que se realice siempre en condiciones similares, esta técnica raramente se realiza bien, solamente 2-3% de las mujeres saben hacer una exploración correcta. La Sociedad Americana de Cáncer (American Cancer Society ACS), sugiere que se debe iniciar la consulta clínica sobre los 20 años y realizarla cada 3 años cuando se esta entre los 20 y 39 años y luego anualmente sobre los 40 años (Jardines, 2005)

**Mamografía:** Se realiza para detectar el cáncer de mama en pacientes asintomáticos o en etapas iniciales, es una de las mejores técnicas para detectar el cáncer de mama, tiene una sensibilidad entre 85-90% El Instituto de Nacional de Cáncer de USA (National Cancer Institute NCI) recomienda que las mujeres

con o sin factores de riesgo deben realizarse una mamografía y un examen clínico anual a partir de los 40 años.(Jardines, 2005)

**Ecografía:** Se realiza como complemento del examen clínico o de los hallazgos mamográficos y también para guiar procedimientos invasores de tipo diagnóstico. (Carranza, 2001)

**Biopsia:** Es indicada si hay algún quiste sanguinolento, o hay evidencia de una masa sólida palpable, para confirmar el diagnóstico. Hay varios tipos de biopsias

- Biopsia por aspiración con aguja fina
- Biopsia abierta (excisional o incisional)
- Biopsia guiada por arpón.

#### **Estudios Complementarios:**

- Radiografía de tórax posteroanterior y lateral
- Gamagrafía ósea
- Ecografía Hepática
- TAC abdominal, si existe indicación.

**Análisis Moleculares:** Se realizan una serie de factores moleculares en el tumor como:

**Receptores de estrógenos y progesterona:** a través de la biopsia del tejido tumoral, se analiza si las células del tumor expresan de manera anormal los receptores para estrógenos y progestágenos. Estas moléculas ectoplasmáticas reconocen los estrógenos y la progesterona y permiten que puedan actuar tanto las células sanas como las del tumor pero en aquellos tumores positivos para estos receptores se denominan ER-positivos y PR-positivos y tienen mejor pronóstico que los negativos, así como mayores probabilidades de responder a la terapia hormonal.(Jardines, 2005)

**Prueba de HER2/neu:** Es una proteína promotora del crecimiento celular, y que puede ser evaluada también en la biopsia. La presencia elevada de la proteína se asocia con un peor pronóstico del cáncer pues tienden a crecer y a propagarse más rápidamente. HER/2nu es un oncogen detectado en el 20%-25% de todos los casos. Una vez detectada la presencia de ésta proteína y sólo en determinadas situaciones, puede administrarse un medicamento llamado Herceptina que evita que la proteína HER/2nu estimule el crecimiento de las células cancerosas. (Jardines, 2005)

### **3.1.7 Tratamiento**

El tratamiento del cáncer de mama es multidisciplinario, los lineamientos generales del manejo son definidos según el estado clínico. Estudios han establecido que para la mayoría de las mujeres con cáncer de mama temprano, la escisión tumoral amplia con preservación de la mama, seguida de radioterapia es el tratamiento de elección. La radioterapia es parte integral de tratamiento conservador de la mama. La intervención quirúrgica, permite el control local de la enfermedad y llevar a cabo un diagnóstico riguroso gracias a que se pueden determinar las características del tumor y el número de ganglios afectados por células malignas. (Carranza, 2001; elmundosalud.com, 2005)

La quimioterapia consiste en la administración de medicamentos que destruyen las células cancerosas y evitan la aparición del tumor en otras partes del cuerpo. Existen varias vías de administración, pero las más frecuentes son la vía oral y la vía intravenosa.

Existe la quimioterapia preoperatoria o neoadyuvante que se da a mujeres con tumores grandes y puede llegar a reducir su tamaño en un 40% permitiendo conservar la mama, donde anteriormente se habría requerido mastectomía. La quimioterapia adyuvante se realiza después de la cirugía para eliminar las posibles células cancerosas que hayan quedado en pocas cantidades e impedir su crecimiento.

La terapia hormonal consiste en la administración de fármacos que bloquean la acción de las hormonas que estimulan el crecimiento de las células cancerosas. Se les da a aquellas pacientes que tienen receptores hormonales positivos, las cuales pueden ser el 60-70% del total de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama. (Carranza, 2001; elmundosalud.com, 2005)

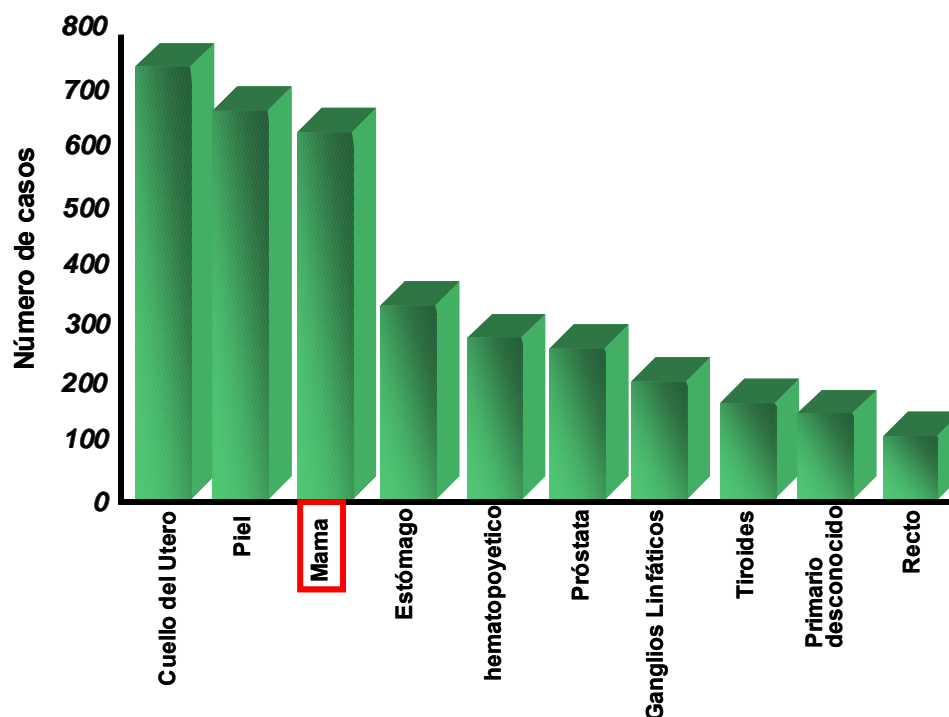
### **3.1.8 Seguimiento**

Después de que la mujer se haya sometido al tratamiento para la eliminación del cáncer de mama, tiene que hacerse controles más frecuentes durante los cinco primeros años. Pasados éstos deberá seguir controlándose como cualquier mujer sana.

### **3.2 Aspectos del cáncer de mama en Colombia**

En Colombia, según el registro institucional de cáncer del año 2002 del INC, se registraron 608 casos nuevos de cáncer de mama, de los cuales dos casos se presentaron en hombres. La edad de presentación estuvo en un rango entre los 16 y los 90 años con una edad media de 53 años y una mediana de 53.9 años. El 40.5% corresponden a pacientes menores de 50 años. Las cinco localizaciones anatómicas más frecuentes de cáncer para 2002 son en su orden: cuello uterino, piel, mama, estómago y sistema hematopoyético. (Constanza Pardo, 2002) (Figura 1)

Para ayudar a realizar el diagnóstico a 97,4% de las pacientes se les realizó un estudio histopatológico del tumor y se observó que el 79,4%(430) de los casos fueron carcinoma canalicular infiltrante, seguido por el carcinoma lobulillar 3,3% y el carcinoma SAI con el 4,6% (26) de los casos. Más del 70% de los casos que ingresan al INC son diagnosticados en estadíos clínicos tardíos (Estadíos III y IV) y tan solo 5,1% lo hacen en estadíos tempranos (In situ y I)(Constanza Pardo, 2002) (Cuadro 1).



### Localización Primaria

Figura 1. Diez primeras localizaciones primarias de casos de cáncer. Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia, 2002. Revista colombiana de cancerología 2003; 7(3): 4-19

Estadio Clínico	No.	%
In situ	15	2,5
I	16	2,6
IIA	38	6,3
IIB	57	9,4
IIIA	37	6,1
IIIB	267	43,9
IV	113	18,6
Sin Dato	65	10,7
<b>Total</b>	<b>608</b>	<b>100</b>

Cuadro 1. Casos de cáncer de mama, según el estadio clínico al ingreso. Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia, 2002. Revista Colombiana de Cancerología 2003; 7(3): 4-19

En cuanto a la distribución por sexo, el 61.2% de los casos nuevos para todos los tumores son del sexo femenino. En donde el cáncer de cérvix o cuello uterino junto con el de mama constituyen el 43,1% de los casos atendidos en el sexo femenino, y en los hombres las cinco primeras localizaciones son en orden de frecuencia: cáncer de estómago, seguido por el de piel, sistema hematopoyético, próstata y ganglios linfáticos. (Constanza Pardo, 2002) (Figura 2)

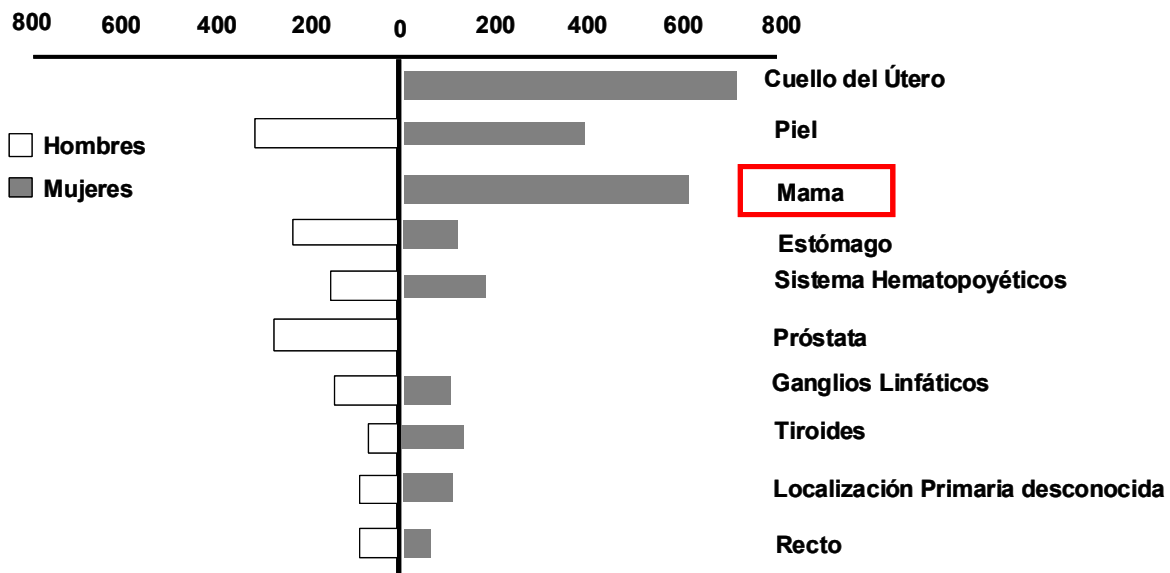


Figura 2. Diez primeras localizaciones de casos de cáncer, por sexo. Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia, 2002. Revista Colombiana de Cancerología 2003; 7(3): 4-19

Las alteraciones genéticas más frecuentes encontradas en cáncer de mama son: amplificación de fragmentos de ADN (algunos conteniendo proto-oncogenes conocidos) y pérdida frecuente de material cromosómico de loci específicos en células tumorales, lo que puede conducir a la inactivación de genes supresores de tumor (Harada et al., 1994). Existe una tendencia aumentada de los epitelios mamario y ovárico BRCA deficientes a acumular mutaciones y sufrir transformación maligna, es evidente, por lo que se ha propuesto el influjo estrogénico de la vida reproductiva femenina como desencadenante del proceso (Welcsh & King, 2001) Esto se soporta en la observación de que las vías normales de diferenciación y proliferación están invariablemente alteradas en el proceso de carcinogénesis y la historia reproductiva y hormonal modifican el riesgo de cáncer (Chodosh et al., 1999)

Los genes que frecuentemente se han encontrado asociados a cáncer de mama de tipo familiar hereditario son BRCA1 y BRCA2, y últimamente también se han asociado, por estudios epidemiológicos de polimorfismos genéticos, variaciones polimórficas en el gen P53 como factores de riesgo en este tipo de cáncer (Khaliq et al., 2000; Ohayon et al., 2005; Papadakis et al., 2000; Suspitsin et al., 2003)

### **3.3 P53 y el cáncer de mama**

Se han descrito muchas moléculas que pueden actuar como supresoras de tumor, por su función dentro de la célula. La proteína p53 denominada así por su peso molecular de 53 Kda es una fosfoproteína nuclear que fue descubierta en 1979 como un antígeno tumoral asociado al antígeno T en células transformadas por el SV40 (Lane & Crawford, 1979). Posteriormente, a finales de la década de los 80 fue redescubierta por su función como supresora de tumor (Darnton, 1998; Wang, 1999). Los genes p53 y rb, son llamados supresores de tumores porque además de participar en la regulación del ciclo celular, cuando la proteína que codifican pierde su función aparece un fenotipo tumorigénico. En el 50-55% de cánceres humanos se encuentran mutaciones en el gen p53.(Gasco, Yulug, & Crook, 2003)

#### **3.3.1 Características de p53**

El gen p53 está ubicado en el brazo corto del cromosoma 17 y está mapeado en 17p13.1. Consta de 11 exones que codifican para 392 aminoácidos, los cuales constituyen varios dominios alostéricos con roles definidos. Los primeros 42 aminoácidos constituyen el dominio de activación de la transcripción (TAD) en la región amino-terminal (N-term) de la proteína, el cual interactúa con la maquinaria de transcripción basal regulando positivamente la expresión génica, otro TAD se encuentra ubicado entre los aminoácidos 43-73 (Chumakov, 2000). El dominio central o core ubicado entre los aminoácidos 102 a 292 participa en el reconocimiento y unión a secuencias específicas de ADN. Este dominio es resistente a proteasas y requiere la presencia de  $Zn^{2+}$  para su unión al ADN. En células tumorales son comunes las mutaciones que afectan estos dominios bloqueando las interacciones proteína/proteína o proteína/ADN por lo cual se denominan puntos calientes de mutación (Jayaraman & Prives, 1999; Levine, 1997). Acorde a lo anterior, más del 90% de las mutaciones de la proteína están en este dominio (Chumakov, 2000; Levine, 1997). Entre los aminoácidos 324-355 se encuentra el dominio de tetramerización, el cual es necesario para la formación de un complejo tetramérico activo. El dominio carboxi-terminal (C-term) entre los aminoácidos 363 a 393, es de carácter básico y se encarga de regular la actividad



de p53 especialmente la función del dominio central. (Bray, Schorl, & Hall, 1998). Hay dos modelos que explican la regulación de la interacción del dominio central de p53 con el ADN por parte del dominio C-term. El primero consiste en que el dominio C-term regula alostéricamente la conversión de p53 de una forma latente a una forma activa capaz de unirse al ADN. El segundo consiste en que el dominio C-term interactuaría con el ADN bloqueando la interacción del dominio central con el ADN temporalmente (Jayaraman & Prives, 1999)

En términos generales la proteína p53 puede ser considerada un factor de transcripción, cuya principal función es monitorear la integridad y estabilidad del genoma (de ahí el apodo de *guardián del genoma*) y en algunos casos, puede actuar como supresora de la angiogénesis. Estas funciones las logra uniéndose específicamente al ADN y regulando la expresión de una amplia variedad de genes involucrados en la detención del ciclo celular y la apoptosis (Spinelli, 1996). El gen p53 se activa en respuesta a cualquier forma de daño principalmente al daño causado por las radiaciones ultravioleta (UV), que afecte al genoma; si el daño es leve detiene la progresión del ciclo celular en la transición de la fase G1/S para permitirle a la célula reparar el ADN y posteriormente reiniciar el ciclo celular, mientras que si el daño es muy grave o irreparable activa el proceso de apoptosis reduciendo de esta manera la posibilidad de que células con mutaciones puedan sobrevivir y contribuir al proceso de carcinogénesis. La proteína p53 después de ser modificada por fosforilación en el aminoácido Ser15, adquiere la capacidad de actuar como factor de transcripción de genes que detienen el ciclo celular como el gen P21<sup>WAF1/CIP1</sup> que codifica para un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk). La proteína P21 se une a los complejos ciclina/Cdk inhibiendo su actividad quinasa, logrando que la proteína Rb permanezca hipofosforilada y activa, cumpliendo con su función de retener el factor de transcripción E2F (un factor de transcripción requerido para pasar el punto de restricción en G1), para finalmente detener el ciclo celular en la fase G1 (Janus et al., 1999; Levine, 1997). El producto del gen GADD45 (Growth-arrest and DNA damage-inducible), también

bloquea la entrada a la fase S, e induce la activación del mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Arrowsmith, 1999; Tokino & Nakamura, 2000)

El gen p53 se transcribe y traduce continuamente, pero la proteína está sujeta a degradación dependiente de ubiquitina en proteosomas. Por esto, la concentración de la proteína en las células de la mayoría de tejidos es baja y puede encontrarse en el límite de detección y en un estado inactivo. La baja concentración de p53 es mantenida por la proteína Mdm2, que al unirse a p53 a través de su dominio TAD N-term reprime su actividad y la exporta del núcleo al citoplasma gracias a que Mdm2 presenta secuencias de exportación. En el citoplasma son ubiquitinadas y por acción del proteasoma ambas proteínas son degradadas (Chumakov, 2000; Freedman, Wu, & Levine, 1999). p53 permanece inactiva pero situaciones en las que se produzca stress celular como: hipoxia, shock térmico o en situaciones donde se daña el ADN por una ruptura de la doble cadena causada por radiación ionizante o formación de dímeros de timina por efecto de la radiación ultravioleta, inducen la estabilización y aumento de la concentración de la proteína P53 (Chumakov, 2000) (Arrowsmith, 1999). La proteína alcanza su activación por diferentes mecanismos entre los cuales se han descrito por modificaciones postraduccionales como fosforilación, defosforilación, acetilación y glicosilación de varias regiones, junto con la formación de complejos covalentes y no covalentes con otras proteínas. (Chumakov, 2000)

Adicionalmente la proteína P53 juega un rol en la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y en la reparación por recombinación homóloga P53 se une a RPA (Proteína de Replicación A), la cual está involucrada en el desenrollamiento y síntesis del ADN durante el inicio y elongación de la replicación del ADN. RPA se ha encontrado formando un complejo con proteínas que forman parte del mecanismo de reparación por escisión tales como la proteína de reconocimiento del daño XPA (Xeroderma pigmentosum protein A) y la endonucleasa XPG (Xeroderma Pigmentosum protein G). El complejo RPA y XPA se une a lesiones de ADN de manera cooperativa después de que las células han sido sometidas a radiación ultravioleta (UV) el complejo p53-RPA se disocia induciendo la actividad

transcripcional de p53 y permitiendo a RPA participar en el mecanismo de reparación NER, posiblemente p53 participa directamente en el mecanismo NER interactuando con el factor general de la transcripción TFIIH (Janus et al., 1999).

El gen p53 también participa en el “punto de inspección o chequeo” (checkpoint) de la fase de Mitosis donde se verifica el correcto ensamblaje del huso mitótico. Células de fibroblastos embrionario murino con p53 normal y tratadas con nocodazole o colcemid (inhibidores de la formación del huso mitótico) no entran en fase S, bloqueándose el ciclo celular en dichas células. En contraste, células homocigotas para p53<sup>-/-</sup> tratadas con las mismas sustancias continuaron su paso por el ciclo celular sin llevar a cabo la segregación cromosómica en la mitosis, de tal manera que se llegó a obtener poblaciones octaploides (Cross et al., 1995).

Otra de las funciones atribuidas a p53 es la de conducir las células hacia la apoptosis o muerte celular programada. Esta función la realiza de manera dependiente o independiente de la transcripción, en este último caso por señalización directa por medio de interacciones proteína/proteína. Los genes *bax* e *igf-Bp3* participan en la activación del mecanismo apoptótico bajo la dirección de p53. P53 activa la expresión de *Bax* produciendo una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia de proteínas Bcl2, la cual actúa formando poros en la membrana mitocondrial, permitiendo la liberación del citocromo c hacia el citoplasma celular. El citocromo c en conjunto con Apaf1 (factor activador de proteasas apoptóticas 1) activa a la caspasa 9 iniciando así una cascada de eventos que culminan con la muerte de la célula por apoptosis.

El gen del receptor Fas (APO1) es activado por p53 y convierte a las células que expresan el receptor fas sensibles a su ligando natural el Fas-L, el cual causa la trimerización del receptor y posteriormente conduce a la activación de la caspasa 8 y por ende al desencadenamiento del mecanismo apoptótico de manera irreversible (Arrowsmith, 1999; Tokino & Nakamura, 2000). Figura 3.

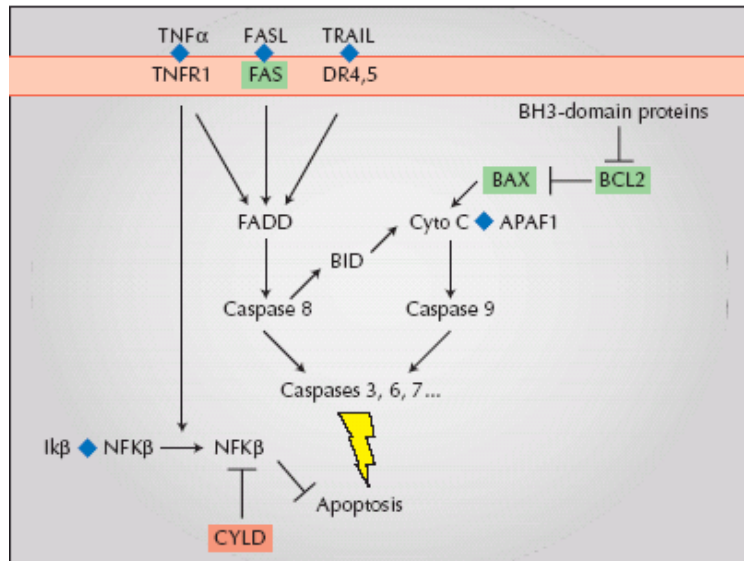


Figura 3. Vías de Apoptosis

### 3.3.2 Alteraciones en la función de p53

La pérdida de la función normal de la proteína P53 se puede producir por dos mecanismos, ya sea por una mutación que afecte al gen p53 (lo más frecuente) o mediante una inactivación funcional de la proteína, por interacción con proteínas virales o celulares (comportándose en forma equivalente a una mutación del gen). La pérdida de la función conduce a un aumento de la inestabilidad cromosómica, caracterizada por un incremento en la frecuencia de amplificaciones génicas, rearrreglos cromosómicos o mutaciones (Wang & Harris, 1997)

Entre las proteínas virales que se asocian e inactivan a P53 se encuentra el antígeno T grande del virus SV40, la proteína E1b del adenovirus y la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV) (Spinelli, 2000).

Se han identificado mutaciones en el gen p53 o en las vías reguladas directamente por este gen, en más del 80% de los tumores humanos. Además defectos en la función de p53 se han relacionado con la patogénesis y etiología molecular de muchas neoplasias (Borresen-Dale, 2003; Gasco et al., 2003; Lozano & Elledge, 2000). La inactivación de ambos alelos del gen p53 ha sido documentada en diversas formas de cáncer (colon, cerebro, pulmón, hígado etc.).

La pérdida de la función de P53 se produce generalmente por un mecanismo que comprende en una primera etapa la mutación de un alelo del gen p53 y en una segunda etapa la delección/inactivación del alelo normal restante (Darnton, 1998). En algunos casos la inactivación de un solo alelo es suficiente para anular la función de p53 mediante un efecto denominado dominante negativo; en esta situación el producto del alelo mutante al unirse con el producto del alelo normal forma un heterotetrámero incapaz de funcionar y regular la transcripción de los genes blanco, aumentando además la vida media de la proteína (Canman & Kastan, 1996).

Las mutaciones que afectan al gen p53 no solamente ocurren en células somáticas, sino también pueden aparecer como mutaciones en la línea germinal. Esta situación se observa en algunas familias de pacientes con predisposición al cáncer denominado síndrome de Li-Fraumeni. En este raro síndrome los pacientes heredan una mutación de un alelo del gen p53 a través de la línea germinal, con posterior pérdida de la actividad del alelo silvestre o normal. Estos pacientes desarrollan con alta frecuencia múltiples tumores que afectan la corteza adrenal, el cerebro, el mama o que producen sarcomas y leucemias (Darnton, 1998)

### **3.3.3. Polimorfismos del gen p53**

En humanos el gen p53 es polimórfico en el exón 4, el intrón 3 y el intrón 6. El nucleótido 347 del exón 4 forma parte del codón que codifica para el aminoácido de la posición 72 de la cadena polipeptídica, puede contener una G o una C dando origen a dos codones diferentes el CGC que codifica para el aminoácido Arginina y el CCC que codifica para Prolina. En individuos homocigotos para el alelo Arginina (Arg/Arg) por análisis de restricción polimórfica con la enzima BstU I el fragmento amplificado que contiene el codón produce 2 fragmentos. En individuos homocigotos para el alelo Prolina (Pro/Pro) el mismo análisis de PCR-RFLP la enzima no reconoce el sitio de corte y se produce un solo fragmento. En los individuos heterocigotos Arg/Pro se originan 3 fragmentos. El análisis de PCR-RFLP con la enzima de restricción BstUI origina un fragmento de 199 pares de bases (pb) para el alelo Prolina (Pro) (individuos homocigotos Pro/Pro) y el alelo Arginina (Arg) es clivado en este sitio formando dos fragmentos uno de 113 pb y

otro de 86 pb respectivamente, en los individuos heterocigotos se observan tres fragmentos de 199 pb, de 113 pb y de 86 pb (Fan et al., 2000; Papadakis et al., 2000).

Este polimorfismo Arg/Pro, es una variante génica de gran asociación al cáncer de mama (Dunning et al., 1999; Suspitsin et al., 2003). También ha sido encontrado asociado con la presencia de cáncer de cuello uterino, de pulmón, y de vejiga, dando resultados controversiales en diferentes estudios (Fan et al., 2000; Storey et al., 1998; Wang, Chen, Chen, Chang, & Lin, 1999)

En un estudio realizado por Matlashewski et al, se muestra que la proteína p53 cuando porta en la posición 72 el aminoácido Prolina es estructuralmente diferente de la proteína p53 portando la Arginina en la misma posición, según muestra la actividad electroforética de las dos proteínas, p53 Arg72 migra más rápido que la proteína p53 Pro72. También observaron que tumores en los cuales p53 portaba Pro72 tenían crecimiento más lento y eran más pequeños que los que expresaban Agr72. Se han relacionado ambas formas con cáncer de mama, sin embargo parece que tumores con el polimorfismo Arg72 de p53 son más oncogénicos que los que portan Pro72 (Matlashewski et al., 1987; Papadakis et al., 2000)

Adicionalmente Papadakis et al, concluyeron que pacientes con tumores en la mama portaban en una mayor proporción, la forma homocigota del polimorfismo Agr72, sugiriendo que este polimorfismo podría constituir un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama. Los resultados mostraron que la frecuencia alélica homocigota de p53 Arg72 en la población estudiada fue de 61% comparada con el 20% de los controles normales. Mientras que la frecuencia alélica homocigota de p53 Pro72 fue apenas del 21% comparada con el 10% de los controles normales (Papadakis et al., 2000) Thomas et al encontraron que la variante Pro72 es un inductor de la transcripción más fuerte que la variante Arg72 y esto parece estar relacionado al menos en parte a la fuerte afinidad de los factores de transcripción TAFII32 y TAFII70 a prolina 72. Además aunque las dos formas parecen suprimir la proliferación de las células Saos-2 con niveles similares de eficiencia, Arg72 induce la apoptosis en estas células con mayor rapidez cinética que Pro72. Ambas variantes tienen diferencias muy marcadas con respecto a sus habilidades para

activar la expresión de una variedad de promotores dependientes de p53, esto sugiere que puede tener implicaciones para la reactivación de tumores, ya que se esperaría que individuos que expresan Pro72 pueden mostrar una transactivación transcripcional más fuerte que los que expresan Arg72.(Thomas et al., 1999) Dumont et al en 2003 reportaron que la forma que contiene el codon Arg72 es más eficiente que Pro72 para inducir apoptosis y es por la localización de la variante Arg72 en la mitocondria, ya que esta variante tiene mayor afinidad que Pro72 por la proteína MDM2, lo cual es probable que facilite la exportación nuclear y probablemente también la subsecuente localización mitocondrial de Arg72. (Dumont, Leu, Della Pietra, George, & Murphy, 2003). La localización de p53 en la mitocondria parece ocurrir solamente en células tumorales (Marchenko, Zaika, & Moll, 2000), pues en células normales de fibroblastos no hay evidencia de su localización en la mitocondria, Dumont et al observaron aumento de la asociación de p53 Arg72 al CRM1 de estas células. Sin embargo aún no es claro si el potencial apoptótico de Pro72 y Arg72 altera el riesgo a desarrollar cáncer y se sugiere continuar haciendo estudios al respecto (Dumont et al., 2003)

Se han buscado otros marcadores genéticos para la susceptibilidad al cáncer de mama y esto ha llevado a estudios epidemiológicos de polimorfismos genéticos poco comunes que tienen un papel en el metabolismo del estrógeno o en la detoxificación de drogas y carcinógenos ambientales(Coughlin & Piper, 1999) Algunos de ellos son polimorfismos del gen p53 asociados a neoplasias donde se describen duplicaciones de 16 pb en el intrón 3 del gen y RFLPs en el intrón 6 determinadas por la enzima MspI (Buyru et al., 2003; Khaliq et al., 2000; Suspitsin et al., 2003; Wang-Gohrke et al., 2002; Wang-Gohrke, Rebbeck, Besenfelder, Kreienberg, & Runnebaum, 1998) Otros polimorfismos, presentes en otros genes asociados a cáncer de mama, son por ejemplo la superfamilia de enzimas del Citocromo P-450 que presentan 3 polimorfismos, estas enzimas actúan en la esteroidogénesis y detoxificación de químicos ambientales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, arilamidas y aminoheterocíclicos; los genes que codifican para NAT1 Y NAT2 que participan en la detoxificación de las aminas aromáticas presentes en el tabaco; los genes que codifican para GSTM1 glutation S-

Transferasa encargada de detoxificar varios citotóxicos como pesticidas y solventes; y finalmente vale la pena mencionar polimorfismos en los genes que codifican para receptores de Estrógenos (ER).

Se han realizado cerca de 46 estudios de casos y controles en los que se han estudiado 18 genes diferentes que están asociados a cáncer de mama, de estos solamente 12 han reportado asociaciones estadísticamente significativas y de estos solamente 3 genes presentaron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas, Cyp19, Ile105Val del gen GSTP1 y el polimorfismo Arg72Pro del gen p53. (Dunning et al., 1999),.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Población de estudio

En este estudio se analizaron dos grupos de individuos un grupo de casos y un grupo de controles. Para el grupo de los casos se seleccionaron pacientes provenientes de las siguientes instituciones: Fundación Santafé de Bogotá (Clínica del Seno), Hospital Militar Central (Consulta externa de Seno), Unidad Oncológica del Country, Universidad Javeriana (Instituto de Genética) y pacientes particulares, entre junio de 2004 y agosto de 2005.

El grupo comprende 186 casos con cáncer de mama heredo familiar.

El grupo de controles fue seleccionado en las instituciones anteriormente mencionadas y comprende 186 pacientes.

#### 4.1.1 Selección de la población de estudio

Los pacientes con cáncer de mama, fueron seleccionados por análisis de la historia clínica donde constara el diagnóstico patológico y clínico de la enfermedad y luego se hizo 2 preguntas, si tenían antecedentes de cáncer de mama en algún familiar de primer o segundo grado y fecha y resultado de la última citología vaginal.

El grupo de controles se seleccionó a través de una entrevista clínica para indagar antecedentes de cáncer en familiares de primer o segundo grado, resultados normales de la última citología vaginal y ausencia de enfermedades malignas en la mama.

#### 4.1.2 Criterios de inclusión

**Grupo Caso:** Se incluyeron como casos, individuos diagnosticados con cáncer de mama, con patología confirmada sin importar que hayan sido tratados o recién

diagnosticados, que mediante consentimiento informado accedieron a participar en el estudio de forma voluntaria. y que cumplieron con los siguientes criterios:

- Diagnóstico de cáncer de mama antes de los 30 años sin importar si tiene o no antecedentes de cáncer de mama en la familia.

Que haya tenido en la familia:

- Al menos un caso de cáncer de mama bilateral. Primer diagnóstico antes de los 40 años.
- Al menos un caso de cáncer de mama y un caso de cáncer de ovario en un familiar de primer o segundo grado.
- Al menos un caso de cáncer de mama en un familiar de primero o segundo grado, que haya sido diagnosticado antes de los 50 años.
- Al menos dos casos de cáncer de mama y uno de próstata en familiares de primer o segundo grado.
- Tres o más casos de cáncer de mama en la familia.
- Un caso de cáncer de mama masculino.
- Al menos dos o más casos de cáncer de mama a cualquier edad en familiares de primer grado.
- Al menos un caso de cáncer de mama y además tres o más casos de cáncer de otro tipo en familiares de primer o segundo grado.

**Grupo control:** Se incluyeron como controles mujeres, que de carácter voluntario, mediante consentimiento informado accedieron a participar en el estudio y que cumplieron los criterios de inclusión descritos a continuación:

- No tener antecedentes de ningún tipo de cáncer en familiares de primer y segundo grado.
- No presentar ni haber presentado diagnóstico confirmado de cáncer de ningún tipo.
- No presentar sintomatología asociada con patología mamaria y tener exámenes normales de mama de acuerdo a la edad.

- Tener una citología vaginal normal, en el último año.

Todas las personas que participaron en el estudio son de nacionalidad colombiana.

#### **4.1.3 Criterios de exclusión**

En el grupo de los casos se excluyeron las mujeres con citología vaginal del último año con diagnóstico de displasia, que no recordaran sus antecedentes familiares o que no quisieron participar en el estudio.

En el grupo control mujeres que no recordaran tener antecedentes familiares de cáncer o tuvieran algún antecedente en familiares en primer o segundo grado, que tuvieran una citología con alguna displasia o sin citología vaginal en el último año. Todas las personas incluidas en el estudio diligenciaron el consentimiento informado. Anexo 1.

#### **4.1.4 Encuesta ( Hoja de Registro)**

Se diseñó una encuesta para obtener información relativa al estilo de vida de los individuos seleccionados para el estudio; y se aplicó a todos los participantes en el mismo. Se utilizó un cuestionario estructurado para categorizar la información colectada, con el fin de minimizar los errores en la recolección de los datos cuantitativos. En esta encuesta se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: características sociodemográficas; ocupación durante los últimos 5 años, antecedentes clínicos, antecedentes gineco-obstétricos, hábitos del estilo de vida como: consumo de cigarrillo, café y alcohol y algunos factores de la dieta como consumo de alimentos ahumados, consumo de enlatados y embutidos. El hábito de consumo de cigarrillo, café alcohol y elementos de dieta fueron evaluados como frecuencia de consumo. (Anexo 2)

## 4.2 Genotipificación

### 4.2.1 Extracción de ADN

Se obtuvieron muestras de sangre de cada individuo participante, en tubos de 5 ml con EDTA. Las muestras fueron codificadas, alicuotadas en tubos de centrifuga de 1.5 ml y almacenadas a  $-20^{\circ}$  C.

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre total, utilizando el método PROBE (Briceño, 1988),( Anexo 3)

### 4.2.2 Análisis de PCR-RFLP del polimorfismo del codón 72 del gen p53

Se analizó el polimorfismo del codón 72 del gen p53 que se encuentra localizado en el exón 4.

Las muestras de ADN fueron amplificadas por medio de una PCR convencional, la cual permite amplificar el fragmento de interés.

**Primers o Cebadores:** La secuencia de los iniciadores (primers), utilizados en la amplificación de los fragmentos a analizar se tomaron de Fan et al, 2000(Fan et al., 2000) (Tabla 1)

**Tabla 1. Secuencia de los Iniciadores para el codón 72**

CODON 72	Número de pares de bases	Tamaño del fragmento	SECUENCIA
Sentido (Forward)	23	199	5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3'
Antisentido (Reverse)	23	199	5-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC3'

**Componentes de Mezcla de reacción:** Se utilizaron los componentes de una PCR convencional, Taq ADN polimerasa, dNTPs,  $MgCl_2$  y un buffer de reacción (Promega) a una concentración óptima para una amplificación eficiente de un templado de ADN. Los primers se utilizaron a una concentración final de  $0,2 \mu M$ , la cantidad de ADN adicionada fue de 100-300 ng, para un volumen final de cada reacción de 40  $\mu l$ . (Tabla 2)

**Tabla 2. Composición de la Reacción en la Cadena de la Polimerasa (Volumen final 30  $\mu$ l)**

Componente	Concentración Stock	1 RX	Concentración Final
Buffer	10X	3 $\mu$ l	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 $\mu$ M	2,4 $\mu$ l	2,0 $\mu$ M
dNTPs	10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Primers	10 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l	0,25 $\mu$ M
Taq Polimerasa	500 U	0,3 $\mu$ l	3 U
ADN		3 $\mu$ l	100-300ng
Agua		18,3 $\mu$ l	

**Perfil Térmico para el codón 72:** El perfil térmico utilizado para la amplificación de este polimorfismo fue sugerido por Fan et al 1999, con algunas modificaciones (Tabla 3)

**Tabla 3. Perfil Térmico Utilizado para PCR del polimorfismo del codón 72 del gen p53**

ETAPA	PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
1	Temperatura inicial	95 °C	5 minutos	1
2	Denaturación	95°C	30 segundos	30
3	Anillaje	59 °C	30 segundos	
4	Extensión	72 °C	30 segundos	
5	Extensión final	72 °C	5 minutos	1

**RFLPs del Codón 72:** El fragmento amplificado para los alelos Arginina y Prolina mide 199 pares de bases (pb) y fue corrido en un gel de agarosa a una concentración de 2,0%, coloreado con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador

Este fragmento puede tener o no, el sitio de corte para la enzima de restricción BstUI, que reconoce la secuencia CG<sup>▼</sup>CG, pero la presencia de C en lugar de G en la secuencia del codón genera o elimina el sitio de reconocimiento para la enzima BstUI. El producto obtenido de la PCR convencional; fue sometido a digestión con BstUI por diez y seis (16) horas a 60°C y luego se corrió en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador.

Los genotipos observados para el codón 72 son Arginina/Arginina (Arg/Arg), Arginina/Pro (Arg/Pro) y Prolina/Prolina (Pro/Pro); en el genotipo Arg/Arg se

visualizan dos bandas una de 113 pb y otra de 86 pb; para Arg/Pro se visualizan tres bandas una de 199 pb, otra de 113 y una última de 86 pb y finalmente para el genotipo Pro/Pro se visualiza una única banda de 199 pb. (Anexo 4)

#### 4.2.3 Análisis de RFLP-PCR del polimorfismo del Intrón 6 del gen p53

Las muestras de ADN fueron amplificadas por medio de una PCR simple. La secuencia de los cebadores (primers), utilizados en la amplificación del fragmento que contienen el polimorfismo (Wu et al., 2002) son: (Tabla 4)

**Tabla 4. Secuencia de los Iniciadores para el polimorfismo del Intrón 6 del gen p53**

Polimorfismo	Número de pares de Bases		Secuencia
	Intrón 6	20 pb	Sentido
20 pb		Antisentido	5' TTGCACATCTCATGGGGTTA 3'

**Componentes de la mezcla de reacción:** Se utilizaron los componentes de una PCR convencional, Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y un buffer de reacción (Promega) a una concentración óptima para una amplificación eficiente de un templado de ADN. Los primer se utilizaron a una concentración final de 0,2 μM, la cantidad de ADN adicionada fue de 100-300 ng, para un volumen final de cada reacción de 40 μl. (Tabla 5)

**Tabla 5. Composición de la Reacción en la Cadena de la polimerasa (Volumen final 40 μl)**

Componente	Concentración Stock	1 RX	Concentración Final
Buffer	10X	4 μl	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 μM	3,2 μl	2,0 μM
dNTPs	10 μM	1,0 μl	0,25 μM
Primers	10 μM	1,2 μl	0,3 μM
ADN		3 μl	100-300ng
Agua		26,1 μl	

**Perfil térmico del intrón 6:** El perfil térmico utilizado para la amplificación de este polimorfismo fue tomado como base el propuesto por Wu et al 2002, solamente se cambio la temperatura de anillaje del primer. (Tabla 6)

**Tabla 6. Perfil Térmico Utilizado para PCR del polimorfismo del intrón 6 del gen p53**

ETAPA	PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
1	Temperatura inicial	94 °C	5 minutos	1
2	Denaturación	94°C	30 segundos	30
3	Anillaje	56 °C	30 segundos	
4	Extensión	72 °C	30 segundos	
5	Extensión final	72 °C	7 minutos	1

El fragmento amplificado fue de 404 pb, se corrió en un gel de agarosa a una concentración de 2,0% para confirmar la amplificación, coloreado con bromuro de etidio.

**RFLPs del intrón 6:** Para establecer el polimorfismo del intrón 6 se digirió el fragmento amplificado con la enzima de restricción MspI durante 16 horas a 37°C, luego se corrieron en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio.y se visualizaron en un transiluminador. Los individuos homocigotos Mutante/Mutante (M/M), con ausencia del sitio de corte solo presentan bandas de 404 pb; los individuos homocigotos Wild/Wild (W/W) (más frecuente), con presencia del sitio de corte presentan bandas de 336 pb y 68 pb. Los heterocigotos tienen tres bandas una de 412 pb, otra de 360 pb y la última de 68 pb y corresponden al genotipo Wild/Mutante (W/M). (ANEXO 5).

#### **4.2.4 Análisis de PCR del Polimorfismos del intrón 3 del gen p53**

Se analizó el polimorfismo del intrón 3 que se determinó como presencia o ausencia de una inserción de 16 pb en los fragmentos analizados.

La secuencia de los cebadores (primers), utilizados en la amplificación de los fragmentos que contienen los polimorfismos (Wu et al., 2002) son : (Tabla 7)

**Tabla 7. Secuencia de los Iniciadores Para el polimorfismo del intrón 3**

Polimorfismo	Número de pares de Bases	Secuencia	
		Intrón 3	21 pb
	20 pb	Antisentido	5' TCAAATCATCCATTGCTTGG 3'

**Componentes de Mezcla de reacción:** Las muestras de ADN fueron amplificadas por medio de una PCR simple, las condiciones de la reacción son las siguientes

**Tabla 8. Composición de la Reacción en la Cadena de la Polimerasa (Volumen final 25 µl)**

Componente	Concentración Stock	1 RX	Concentración Final
Buffer	10X	2,5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 µM	2,0 µl	2,0 µM
dNTPs	10 µM	1,0 µl	0,4 µM
Primers	10 µM	0,5 µl	0,2 µM
Taq Polimerasa	500 U	0,3µl	3 U
ADN		3 µl	100-300ng
Agua		15,2 µl	

**Perfil térmico del intrón 3:** El perfil térmico utilizado para la amplificación de este polimorfismo fue sugerido por Wu et al 2002, al que se le realizaron algunas modificaciones (Tabla 9)

**Tabla 9. Perfil Térmico utilizado para PCR del polimorfismo del intrón 3 del gen p53**

ETAPA	PROCESO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
1	Temperatura Inicial	95 °C	5 minutos	1
2	Denaturación	95°C	30 segundos	30
3	Anillaje	57 °C	30 segundos	
4	Extensión	72 °C	30 segundos	
5	Extensión Final	72 °C	5 minutos	1



Los fragmentos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio, la presencia de la inserción de 16 pb se detecto por una banda de 196 pb y ausencia de la misma por una banda de 180 pb. (Anexo 6)

#### **4.3 Análisis estadístico**

La sistematización de los datos se hizo en el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5. Para evaluar los factores asociados a cáncer de mama heredofamiliar cuando estos se midieron en forma categórica y dicotómica (expuestos: no expuestos) se hizo mediante un análisis bivariado donde se utilizó la prueba asintótica de asociación ji-cuadrado sin corregir de Pearson o la prueba exacta de Fisher en valores esperados  $<5$ ; también se midió la fuerza de asociación mediante la razón de disparidad (Odds ratio: OR) y se evaluó la significancia de la asociación utilizando el intervalo de confianza del 95% asintótico o exacto (valores esperados  $<5$ ). En los factores medidos cuantitativamente se utilizó la prueba T-student para la comparación de medias en grupos independientes y se evaluó previamente el supuesto de normalidad (Test de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Test Levene).

La explicación conjunta de los factores y su respectivo control de variables de confusión se hizo inicialmente con el método de estratificación de Cochran-Mantel-Haenzel y finalmente se construyó un modelo de análisis multivariante de regresión logística incondicional para variables dependientes dicotómicas; la evaluación de las variables de confusión se realizó teniendo en cuenta los resultados del análisis bivariado con los OR crudos y se compararon con los obtenidos en el análisis multivariante con los OR ajustados. Las pruebas estadísticas se evaluaron a un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características de la Población de Estudio

La población de estudio estuvo conformada por 186 mujeres diagnosticadas con cáncer de mama (casos) y 186 mujeres sin enfermedad neoplásica (controles), los individuos presentaron un promedio de edad en los casos de  $52,6 \pm 11,3$  años y en los controles de  $48,0 \pm 12,9$  años, el rango de edades para ambos grupos estuvo entre 23 y 83 años.

Las frecuencias de las características sociodemográficas (Tabla 10), de los casos y controles, mostraron diferencias significativas en el estrato social ( $P=0,000$ ) y el nivel educativo ( $P=0,000$ )

### 5.2 Características Clínicas en casos y controles

Las características clínicas no mostraron relación significativa con cáncer de mama, a excepción del consumo de medicamentos donde los casos presentan un porcentaje mayor de consumo de ellos. (Tabla 11)

La edad de la menarquia a edades inferiores de los 12 años fue más alta en el grupo de los casos (42,0%) que en los controles (33,3%), a la edad de 14 años son similares y mucho más baja la frecuencia en los casos que en los controles cuando son mayores de los 16 años. Se encontraron diferencias significativas en la edad de la menarquia ( $P=0,006$ ), la edad del primer embarazo ( $P=0,015$ ), el uso de terapia de reemplazo hormonal ( $P=0,008$ ) y el estado menopáusico ( $P=0,047$ ), (Tabla 12)

**Tabla 10. Características Sociodemográficas en casos y controles**

Característica	Casos (%)	Controles (%)	Valor-P
<b>Datos Sociodemográficos</b>			
Edad			0,020
≤39	25 (13,9)	49 (26,3)	
40-49	47 (26,1)	54 (29,0)	
50-59	65(36,1)	51 (27,4)	
60-69	26 (14,4)	21 (11,3)	
≥70	17 (9,4)	11 (5,9)	
	180(100)	186(100)	
Promedio de edad	52,6 ±11,3	48,0 ±12,9	0,000
<b>Estrato Socioeconómico</b>			0,000
2	12(6,8)	61(32,8)	
3	41(23,3)	77(41,4)	
4	41(23,3)	30(16,1)	
5	49(27,8)	9(4,8)	
6	33(18,8)	9(4,8)	
Total	176(100)	186(100)	
<b>Estado Civil</b>			0,112
Soltera	21(11,9)	36(19,4)	
Casada	116(65,9)	102(54,8)	
Unión Libre	14(8,0)	24(12,9)	
Viuda	9(5,1)	7(3,8)	
Separada	16(9,1)	17(9,1)	
Total	176(100,0)	186(100,0)	
<b>Nivel Educativo</b>			0,000
Primaria	9(5,1)	40(21,5)	
Secundaria	48(27,3)	63(33,9)	
Técnico	25(14,2)	35(18,8)	
Universitario	67(38,1)	38(20,4)	
Post-grado	27(15,3)	10(5,4)	
Total	176 (100,0)	186(100,0)	

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado,

**Tabla 11. Características Clínicas en casos y controles**

Característica	Casos (%)	Controles (%)	Valor-P	OR (IC 95%)
<b>Antecedentes Clínicos</b>				
IMC			0,144	
< 20	14(8,2)	15 (8,1)		
20-23	49 (28,7)	37 (19,9)		
> 23	108(63,2)	134 (72,0)		
Total	171(100,0)	186(100,0)		
<b>Consumo de Medicamentos</b>			0,000	2,19(1,41-3,42)
Si	128(73,6)	104(55,9)		
No	46(26,4)	82(44,1)		
Total	174(100,0)	186(100,0)		
<b>Presencia de Alergias</b>			0,125	1,50(0,89-2,54)
Si	40(23,1)	31(16,7)		
No	133(76,9)	155(83,3)		
Total	173(100,0)	186(100,0)		

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado.

**Tabla 12. Antecedentes Gineco-Obstétricos**

Característica	Casos (%)	Controles (%)	Valor-P	OR (IC 95%)
<b>Edad de la Menarquia</b>			0,006	
≤12	76 (42,0)	62 (33,3)		
13	53(29,3)	44(23,7)		
14	29(16,0)	30(16,1)		
15	18(9,9)	29(15,6)		
≥16	5(2,8)	21(11,3)		
Total	181(100,0)	186(100,0)		
<b>Edad del Primer Embarazo</b>			0,015	
≤25	98 (65,8)	123 (76,9)		
26-29	30 (20,1)	14(8,8)		
≥30	21 (14,0)	23 (14,4)		
Nulipara	24	26		
Total	173(100,0)	186(100,0)		
<b>Número de Embarazos</b>			0,868*	
Nuliparidad	24 (13,5)	26 (14,0)		
1-3	100(56,2)	96(51,6)		
4-5	37(20,8)	41(22,0)		
6-8	14(7,9)	20(10,8)		
8-12	3(1,7)	3(1,6)		
Total	178 (100,0)	186(100,0)		
Promedio	2,96 ±2,1	3,03±2,3	0,776	
<b>Uso de Anticonceptivos</b>			0,946	0,99(0,65-1,49)
Si	101(57,7)	108(58,1)		
No	74(42,3)	78(41,9)		
Total	175(100,0)	186(100,0)		
<b>Método de Planificación</b>			0,520*	
A, hormonales-óvulos	1(0,6)	0(0)		
A, hormonales-diafragma	0(0)	1(0,5)		
Ritmo	0(0)	1(0,5)		
Preservativo	5(2,9)	2(1,1)		
DIU-A.Hormonales	13(7,4)	13(7,0)		
DIU	32(18,3)	45(24,3)		
A. Hormonales	49(28,0)	46(24,9)		
Ninguno	75(42,9)	77(41,6)		
Total	175(100,0)	185(100,0)		
<b>Uso de Terapia Hormonal</b>			0,008	2,31(1,23-4,33)
Si	32(18,8)	17(9,1)		
No	138(81,2)	169(90,9)		
Total	170(100,0)	186(100,0)		
<b>Estado Menopáusico</b>			0,047	1,53(1,00-2,31)
Premenopausia	117(63,9)	100(53,8)		
Postmenopausia	66(36,1)	86(46,2)		
Total	143(100,0)	106(100,0)		

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado, \*Prueba Exacta de Fisher

### 5.3 Relación entre la edad de la menarquia, edad del primer embarazo, la nuliparidad y el índice de masa corporal (IMC) como factores de riesgo en el cáncer de mama

Los factores de riesgo la edad de la menarquia, edad del primer embarazo, la nuliparidad y el índice de masa corporal (IMC) se indican en la Tabla 13.

La edad promedio de la menarquia es significativamente menor en los casos (12,8±1,6 años) que en los controles (13,4±1,8), (Figura 4)

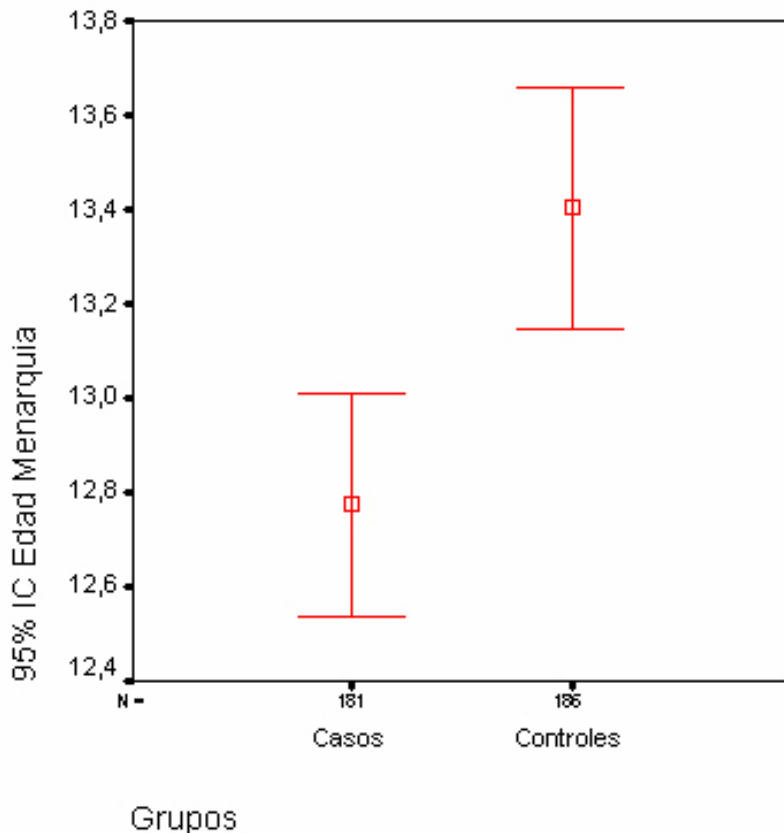


Figura 4. Edad promedio e IC95% de la edad de la Menarquia en casos y controles

La edad del primer embarazo en mujeres menores de 25 años fue más frecuente en los controles (76,9%) que en los casos (65,8%), en tanto que el primer hijo entre los 26 y 29 años fue más frecuente en los casos (20,1%) que en los controles (8,8%).

La edad promedio, de las mujeres con cáncer de mama estudiadas a la cual tienen su primer hijo fue 24,03 ±5,0 años y la de los controles fue 22,65 ±5,5 años, Se observan diferencias significativas entre ellas (P=0,023) (Figura 5)

El número promedio de embarazos en ambos grupos no muestra una diferencia significativa: casos (2,96 ±2,14) y controles (3,04 ±2,3).

La nuliparidad fue similar en ambos grupos (13,5% casos y 14,0% controles).

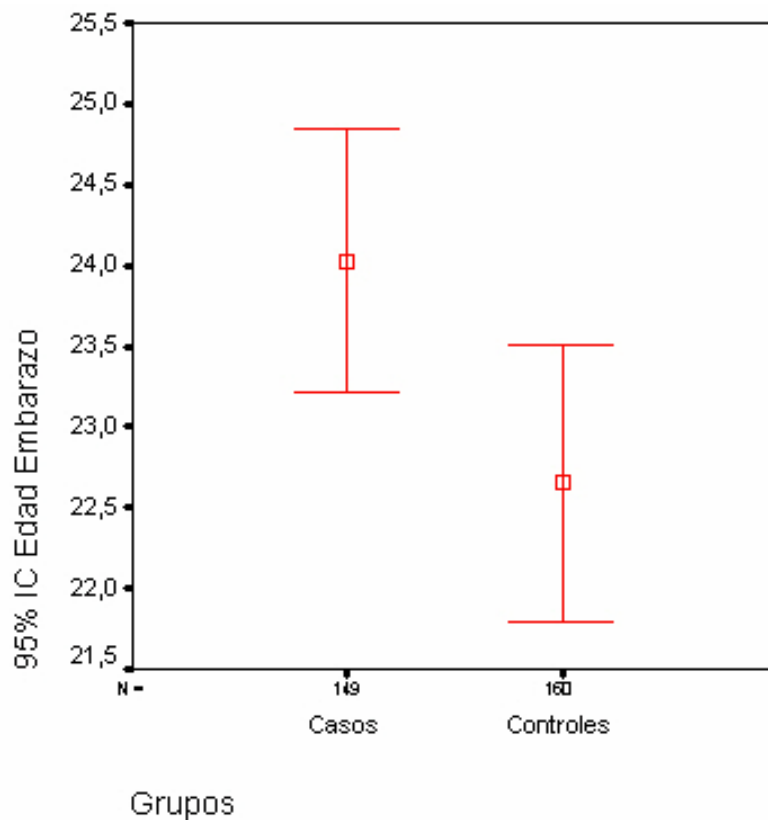


Figura 5. Número promedio de la edad del primer embarazo e IC del 95% en casos y controles

El índice de masa corporal (IMC) muestra que los casos en un 28,7% están en el rango de peso normal (20-23), mientras que los controles estuvieron en un 19,9%, sin embargo el IMC correspondiente a sobrepeso (>23) fue menor en los casos (63,2%) que en los controles (72,0%), no se observó ninguna diferencia significativa.

**Tabla 13. Edad de la menarquia, edad del primer embarazo, nuliparidad e índice de masa corporal (IMC) asociados al cáncer de mama.**

	Casos (%)	Controles (%)	Valor-P
<b>Edad de la Menarquia</b>			0,006
≤12	76 (42,0)	62 (33,3)	
13	53(29,3)	44(23,7)	
14	29(16,0)	30(16,1)	
15	18(9,9)	29(15,6)	
≥16	5(2,8)	21(11,3)	
Total	181(100,0)	186(100,0)	
Promedio	12,8±1,6	13,4±1,8	
<b>Edad del Primer Hijo</b>			0,015
≤25	98 (65,8)	123 (76,9)	
26-29	30 (20,1)	14(8,8)	
≥30	21 (14,0)	23 (14,4)	
Promedio	24,03±5,0	22,65±5,5	0,023
<b>Número de Embarazos</b>			0,868*
Nuliparidad	24 (13,5)	26 (14,0)	
1-3	100(56,2)	96(51,6)	
4-5	37(20,8)	41(22,0)	
6-8	14(7,9)	20(10,8)	
8-12	3(1,7)	3(1,6)	
Total	178 (100,0)	186(100,0)	
Promedio	2,96 ±2,1	3,03±2,3	0,776
<b>IMC</b>			0,144
< 20	14(8,2)	15 (8,1)	
20-23	49 (28,7)	37 (19,9)	
> 23	108(63,2)	134 (72,0)	
Total	171(100,0)	186(100,0)	

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado.

#### **5.4 Distribución de los hábitos alimenticios y estilos de vida**

Las distribuciones de los hábitos alimenticios se indican en las Tablas 14 y 15. El consumo de enlatados y así mismo el consumo de embutidos mostraron una relación significativa con el cáncer de mama, (P=0,036 y 0,029), el OR indica una probabilidad mayor de desarrollar cáncer de mama cuando se consume enlatados que cuando no se hace, de manera similar ocurre con los embutidos (OR=1,74 IC95% 1,06-2,284 y 1,64 IC95% 1,06-2,53).

Para los demás hábitos como el consumo de cigarrillo, café, carnes ahumadas o asadas y alcohol no se encontraron diferencias significativas,

Las frecuencias del consumo de cigarrillo fueron de 24,9% en los casos y 17,7% en los controles mientras que las frecuencias del consumo de carnes asadas y alcohol fueron similar en ambos grupos (87,9 y 84,9%) y (31,0 y 34,4%).

**Tabla 14. Hábitos Alimenticios en Casos y Controles**

Característica	Casos (%)	Controles (%)	Valor-P	OR(IC 95%)
<b>Fuma</b>			0,099	1,53(0,92-2,55)
Si	43(24,9)	33(17,7)		
No	130(75,1)	153(82,3)		
Total	173(100,0)	186(100,0)		
<b>Consumo de carnes asadas/ahumadas</b>			0,421	1,28(0,69-2,36)
Si	152(87,9)	158(84,9)		
No	21(12,1)	28(15,1)		
Total	173(100,0)	186(100,0)		
<b>Consumo de enlatados</b>			0,036	1,74(1,06-2,84)
Si	140(80,9)	132(71,0)		
No	33(19,1)	54(29,0)		
Total	173(100,0)	186(100,0)		
<b>Consumo de café</b>			0,55	1,19(0,67-2,14)
Si	149 (86,1)	156(83,9)		
No	24(13,9)	30(16,1)		
Total	173(100,0)	186(100,0)		
<b>Consumo de embutidos</b>			0,029	1,64(1,06-2,53)
Si	120(69,4)	108(58,1)		
No	53(30,6)	78(41,9)		
Total	173(100,0)	186(100,0)		
<b>Consumo de alcohol</b>			0,496	0,86(0,55-1,33)
Si	54(31,0)	64(34,4)		
No	120(69,0)	122(65,6)		
Total	174(100,0)	186(100,0)		

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado.

Si se mira las frecuencias en los consumos de los factores como fumar, consumir carnes asadas/ahumadas, café no se encontraron diferencias significativas, sin embargo si hubo diferencias en las de los enlatados y los embutidos.

La frecuencia de fumar “siempre” fue más alta en los casos que en los controles.

El consumo de carne 1 vez a la semana y el no consumo de enlatados fueron menores en los casos que en los controles (36,4 y 46,2%; 19,1 y 29,0% respectivamente).

El consumo de café “más de 1 vez al día” fue similar en ambos grupos.

El no consumo de embutidos por parte de los individuos con cáncer de mama se presentó tan sólo en el 30,6% en tanto que en los controles fue de 41,4%, por otra



parte el consumo de embutidos una vez a la semana fue similar en ambos grupos; mostrándose diferencias significativas.

La distribución del consumo de alcohol es similar en ambos tanto cuando lo hacen “siempre” como cuando es tan sólo algunas veces

**Tabla 15. Frecuencia de Consumo de Hábitos Alimenticios y Estilo de Vida**

Característica	Casos (%)	Controles (%)	Valor –P
<b>Fuma</b>			0,095
Nunca	130(75,1)	153(82,3)	
A veces	19(11,0)	20(10,8)	
Siempre	24(13,9)	13(7,0)	
<b>Carnes asadas/ahumadas</b>			0,085*
Nunca	20(11,6)	28(15,1)	
Menos 1 vez mes	46(26,6)	41(22,0)	
1 vez semana	63(36,4)	86(46,2)	
Mas 1 vez semana	43(24,9)	29(15,6)	
Todos días	1(0,6)	2(1,1)	
<b>Enlatados</b>			0,012*
Nunca	33(19,1)	54(29,0)	
Menos 1 vez mes	86(49,7)	78(41,9)	
Menos 1 vez semana	6(3,5)	16(8,6)	
1 vez semana	45(26,0)	32(17,2)	
Mas 1 vez semana	3(1,7)	6(3,2)	
<b>Café</b>			0,885*
Nunca	25(14,5)	30(16,1)	
1 vez semana	1(0,6)	1(0,5)	
2 veces semana	2(1,2)	1(0,5)	
1 vez día	64(37,0)	62(33,3)	
Mas 1 vez día	81(46,8)	92(49,5)	
<b>Embutidos</b>			0,014
Nunca	53(30,6)	77(41,4)	
Menos 1 vez mes	65(37,6)	52(28,0)	
Menos 1 vez semana	4(2,3)	10(5,4)	
1 vez semana	37(21,4)	42(22,6)	
Mas 1 vez semana	14(8,1)	5(2,7)	
<b>Alcohol</b>			0,431*
Nunca	120(69,0)	122(65,6)	
A veces	53(30,5)	64(34,4)	
Siempre	1(0,6)	0(0)	

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado. (P<0,05)

Prueba de Exacta de Fisher (P<0,05)

## 5.5 Descripción de Características Clínico Patológicas en los casos de cáncer de mama heredofamiliar.

La distribución de la características clinicopatológicas encontradas en los casos bajo estudio se indica en la Tabla 16.

La enfermedad analizada se presentó con mayor frecuencia entre los 50 y 59 años (26,1%) y fue más frecuente en el lado derecho (49,2%) que en el izquierdo (44,2%)

El grado histológico más frecuente fue el grado II con un 57,0% a diferencia del grado III que fue el menos frecuente (18,6%), Los ganglios linfáticos fueron negativos en un 56,2%,

Los receptores hormonales estrogénicos (ER) y progestágenos (PR), ambos positivos, se encontraron en 71,5% de los individuos estudiados, en tanto que ambos receptores hormonales fueron negativos en el 20,3% de los casos.

El Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI) fue el tipo histológico más frecuente (77,2%). En los 186 casos analizados se encontró que el diagnóstico del cáncer fue más alto en mujeres premenopáusicas que en mujeres postmenopáusicas.

**Tabla 16. Características Clínico Patológicas de los casos de cáncer de mama**

Característica	Casos	%
<b>Edad n= 180</b>		
≤39	25	13,9
40-49	47	26,1
50-59	65	6,5
60-69	26	14,4
≥70	17	9,4
<b>Lateralidad n=181</b>		
Derecho	89	49,2
Izquierdo	80	44,2
Ambos	12	6,6
<b>Grado Histológico n=172</b>		
Grado I	42	24,4
Grado II	98	54,0
Grado III	32	18,6
<b>Nódulos Linfáticos n= 169</b>		
Negativos	95	56,2
Positivos	74	43,8
<b>Característica</b>	<b>Casos</b>	<b>%</b>
<b>Receptores Hormonales n= 158</b>		

Característica	Casos	%
Positivos	113	71,5
Negativos	32	20,3
ER+ y PR-	6	3,8
ER- y PR+	7	4,4
<b>Tipo Histológico n=180</b>		
CDI	139	77,2
CD In situ	24	13,3
CLI	10	10,0
CD y CL In situ	1	0,6
Mucinoso	1	0,6
Coloide	2	1,1
CL Insitu	2	1,1
Filodes	1	0,6
<b>Estado menopáusico n=182</b>		
Pre-menopausia	117	63,9
Post-menopausia	66	36,1

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, CDIn situ: Carcinoma Ductal Insitu, CLI: Carcinoma Lobulillar Infiltrante.

## 5.6 Características genéticas de los polimorfismos del gen p53

### 5.6.1 Polimorfismo del codón 72

#### 5.6.1.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del codón 72 en casos y controles

Los valores de las frecuencias de los genotipos del codón 72 se exponen en la Tabla 17.

La distribución de los genotipos fue significativamente diferente entre los casos y controles, la presencia del genotipo Arg/Arg fue significativamente superior en los casos (61,3%), que en los controles (44,1%) ( $P=0,001$ )

Se puede observar que en los individuos con cáncer de mama el genotipo Arg/Arg es significativamente superior ( $P=0,001$ ) que en los individuos controles mientras que el genotipo Pro/Arg es significativamente inferior en los casos que en los controles ( $P=0,011$ ).

Es claro entonces que la frecuencia del alelo Arginina (77,4%) se mostrará significativamente mayor en el grupo de los casos que en el grupo control (67,0%),

habiendo entonces una clara asociación significativa del alelo arginina con el cáncer de mama hereditario (P= 0,004)

Ambos grupos están en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) casos ( $\lambda^2 = 1,113$ ), controles ( $\lambda^2 = 0,195$ )

**Tabla 17. Distribución de Frecuencias genotípicas y alélicas del codón 72 en casos y controles**

	Cáncer de mama	Controles	Valor -P
<b>Genotipos Codón 72</b>	N (%)	N (%)	0,004
Arg/Arg	114(61,3)	82(44,1)	0,001
Pro/Arg	60(32,3)	85(45,7)	0,008
Pro/Pro	12(6,5)	19(10,2)	0,260
<b>Alelos</b>			0,001
Arg	288 (77,4)	249 (67,0)	
Pro	84 (22,6)	123 (33,0)	
$\lambda^2$ EHW	1,113	0,195	

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado,

### 5.6.1.2 Relación de los genotipos del codón 72 y el riesgo a cáncer de mama heredofamiliar

Los OR de los genotipos del codón 72 sin ajustar y ajustados por los factores de riesgo edad de la menarquia, edad del primer embarazo, la nuliparidad y el IMC se muestran en la Tabla 18.

Los pacientes con cáncer de mama presentan el genotipo Arg/Arg con una mayor probabilidad de 2,2 veces que los controles (OR=2,2 IC95% 1,33-3,63) tomando como base el genotipo Arg/Pro. El genotipo Pro/Pro, sobre esta misma categoría base, no mostró asociación significativa.

Los OR ajustados por edad de la menarquia, edad del primer embarazo, nuliparidad e IMC mostraron valores muy similares a los ya indicados. Esto podría indicar que el genotipo Arg/Arg es un posible factor de riesgo en el cáncer de mama heredofamiliar.

**Tabla 18. Asociación entre el genotipo del codón 72 de p53 y el riesgo a Cáncer de mama**

Genotipos Codón 72	Cáncer de mama n= 186	Controles n=186	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
Arg/Arg	114	82	1,97 (1,27 -3,05)	2,19 (1,33-3,63)
Arg/Pro	60	85	1 referencia	1 referencia
Pro/Pro	12	19	0,89 (0,40-1,98)	1,18 (0,48-2,88)

*\*Regresión Logística Incondicional OR ajustado por edad menarquia, nuliparidad, edad del primer embarazo, IMC,*

### 5.6.1.3 .Relación de los genotipos del codón 72 y el riesgo a cáncer de mama con otros factores de riesgo.

Los OR ajustados por los factores de riesgo estrato socioeconómico, nivel educativo, terapia hormonal, consumo de enlatados y embutidos, que en el presente estudio se encontraron relacionados con el cáncer de mama familiar se observan en la Tabla 19. Se observa de la misma manera, que lo indicado anteriormente, el genotipo Arg/Arg mostró una asociación significativa con el cáncer de mama heredofamiliar.

**Tabla 19. Asociación entre el genotipo del codón 72 y factores de riesgo hallados en el presente estudio**

Genotipos Codón 72	Cáncer de mama n= 186	Controles n=186	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
Arg/Arg	114	82	1,97 (1,27 -3,05)	1,75(1,04-2,92)
Arg/Pro	60	85	1 referencia	1 referencia
Pro/Pro	12	19	0,89 (0,40-1,98)	0,98(0,38-2,48)

*\*Regresión Logística Incondicional OR ajustado por estrato social, nivel educativo, terapia hormonal, enlatados y embutidos*

### 5.6.1.4 Relación entre los polimorfismos del codón 72 en los casos de cáncer de mama heredofamiliar vs. las características clínico patológicas.

La relación entre los genotipos del codón 72 versus las características clinicopatológicas de los casos, se indican en la Tabla 20. En ninguna de estas características se observaron diferencias significativas.

**Tabla 20. Relación entre los genotipos del codón 72 y las características clinicopatológicas de los casos.**

Características Histopatológicas	Pro/Pro (%)	Arg/Arg (%)	Pro/Arg (%)	Valor-P*
<b>Edad</b>				0,489*
≤39	1(8,3)	20(18,0)	4(7,0)	
40-49	5(41,7)	26(23,4)	16(28,1)	
50-59	2(16,7)	40(36,0)	23(40,4)	
60-59	2(16,7)	15(13,5)	9(15,8)	
≥70	2(16,7)	10(9,0)	5(8,8)	
<b>Estado Menopáusico</b>				0,878*
Pre-menopáusica	7(58,3)	72(63,7)	38(65,5)	
Post-menopáusica	5(41,7)	41(36,3)	20(34,9)	
<b>Nódulos Linfáticos Involucrados</b>				0,490*
Negativos	7(70,0)	54(51,4)	34(63,0)	
Positivos	3(30,0)	51(48,6)	20(37,0)	
<b>Receptores Hormonales</b>				0,776*
ER-PR Positivos	6(66,7)	71(74,0)	36(67,9)	
ER-PR Negativos	2(22,2)	18(18,8)	12(22,6)	
ER (+) – PR(-)	0(0)	4(4,2)	2(3,8)	
ER(-) PR(+)	1(11,1)	3(3,1)	3(5,7)	
<b>Grado Histológico</b>				0,060*
Grado I	2(18,2)	24(22,6)	16(29,1)	
Grado II	5(45,5)	58(54,7)	35(63,6)	
Grado III	4(36,4)	24(22,6)	4(7,3)	
<b>Tipo de Cáncer</b>				0,864*
CDI	10(83,3)	82(73,9)	47(82,5)	
CD In situ	1(8,3)	17(15,3)	6(10,5)	
CD y CL In situ	0 (0,0%)	1(0,9)	0(0,0)	
CLI	1(8,3)	7(6,3)	2(3,5)	
Mucinoso	0(0,0)	0(0,0)	1(1,8)	
Coloidal	0	1(0,9)	1(1,8)	
Filodes	0(0,0)	1(0,9)	0(0,0)	

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, CDIn situ: Carcinoma Ductal Insitu, CLI: Carcinoma Lobulillar Infiltrante, \*Prueba exacta de Fisher

## 5.6.2 Polimorfismo del Intrón 6 del gen p53

### 5.6.2.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del Intrón 6 del gen p53 en casos y controles

Los valores de las frecuencias de los genotipos del intrón 6 se observan en la Tabla 21.

La distribución del genotipo del intrón 6 fue diferente significativamente entre los grupos de casos y controles, siendo más frecuente la presencia del genotipo W/W en el grupo de los controles (82,3%) que en los casos (75,3%) (P= 0,055)

El análisis estadístico independientemente para cada uno de los genotipos, se encontró que existe relación con el cáncer de mama del genotipo W/M (P=0,038). La frecuencia del Alelo Mutante (M) (12,6%) es estadísticamente igual en el grupo de los casos que en el grupo de los controles (9,9%). (P=0,088). La distribución genotípica de cada una de la poblaciones analizadas está en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) casos ( $\lambda^2=1,71$ ), controles ( $\lambda^2=3,13$ )

**Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas del Intrón 6 en Casos y Controles**

	Cáncer de mama n= 186 (%)	Controles n=186 (%)	Valor-P
<b>Genotipos Intrón 6</b>			0,055*
W/W	140 (75,3)	153 (82,3)	0,099
W/M	45 (24,2)	29 (15,6)	0,038
M/M	1 (0,5)	4 (2,2)	0,216*
<b>Alelos</b>			0,246
W	325 (87,4)	335 (90,1)	
M	47 (12,6)	37 (9,9)	
<b>X<sup>2</sup> EHW</b>	1,71	3,13	

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado. (P<0,05) \*Prueba Exacta de Fisher

### 5.6.2.2 Relación entre el genotipo del intrón 6 y el riesgo a cáncer de mama heredofamiliar

En los genotipos del intrón 6, los OR sin ajustar y ajustados por los factores de riesgo edad de la menarquia, edad del primer embarazo, la Nuliparidad y el IMC se muestran en la Tabla 22.

Los pacientes con cáncer de mama presentan el genotipo W/M con una mayor probabilidad de 1,5 veces que los controles (OR=1,53 IC95% 0,89-2,82) tomando como base el genotipo W/W. El genotipo M/M, sobre esta misma categoría base, no mostró asociación significativa.

El OR de 1,5 indica que en los pacientes con cáncer de mama el genotipo W/M está presente con mayor probabilidad en los casos que en los controles comparando con el genotipo (W/W) tomada como categoría de base o referencia aunque no es significativo; el genotipo M/M no se encontró asociado significativamente.

Ajustando o no por las variables de confusión los OR no muestran un cambio significativo, sin embargo los intervalos de confianza si varían significativamente. Indicando que solo el genotipo W/M es un probable factor de riesgo en el cáncer de mama heredofamiliar.

**Tabla 22. Asociación entre el genotipo de intrón 6 y el riesgo a Cáncer de mama**

Genotipos Intrón 6	Cáncer de mama N= 186	Controles n=186	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
W/W	140	153	1 referencia	1 referencia
W/M	45	29	1,7 (1,08-2,85)	1,53 (0,89-2,82)
M/M	1	4	0,27 (0,03-2,47)	0,36 (0,03-3,81)

*\*Regresión Logística Incondicional OR ajustado por edad menarquía, nuliparidad, edad del primer embarazo, IMC*

### 5.6.2.3 Relación de los genotipos del intrón 6 y el riesgo a cáncer de mama con otros factores de riesgo.

Los OR ajustados por los factores de riesgo estrato socioeconómico, nivel educativo, terapia hormonal, consumo de enlatados y embutidos que en el presente estudio se encontraron relacionados con el cáncer de mama familiar se observan en la Tabla 23. Se observa de la misma manera, que lo indicado anteriormente, que el genotipo W/M mostró una asociación aunque no es significativa con el cáncer de mama heredofamiliar.

**Tabla 23. Asociación entre el genotipo del Intrón 6 y los factores de riesgo hallados en el presente estudio**

Genotipos Intrón 6	Cáncer de mama n= 186	Controles n=186	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
W/W	140	153	1 referencia	1 referencia
W/M	45	29	1,7 (1,08-2,85)	1,26(0,68-2,32)
M/M	1	4	0,27 (0,03-2,47))	0,16(0,01-2,09)

*\*Regresión Logística Incondicional OR ajustado por estrato social, nivel educativo, terapia de reemplazo hormonal, enlatados y embutidos*

### 5.6.2.4 Relación entre los polimorfismos del Intrón 6 en los casos de cáncer de mama heredofamiliar vs. las características clínico patológicas.

La relación entre los genotipos del intrón 6 y las característica clinicopatológicas de los casos, se observan en la tabla 24, en ninguna de estas características se observaron diferencias significativas.



**Tabla 24. Asociación entre los genotipos del Intrón 6 y las características clinicopatológicas de los casos.**

Características Histopatológicas	W/W (%)	W/M (%)	M/M (%)	Valor-P*
<b>Edad</b>				0,395*
≤39	22(16,2)	3(7,0)	0(0,0)	
40-49	12(27,9)	34(25,0)	1(100)	
50-59	47(34,6)	18(41,9)	0(0)	
60-59	10(13,2)	8(18,6)	0(0)	
≥70	15(11,0)	2(4,7)	0(0)	
<b>Estado Menopáusico</b>				0,596*
Pre-menopáusica	85(61,6)	31(70,5)	1(100)	
Post-menopáusica	53(38,4)	13(29,5)	0(0)	
<b>Nódulos Linfáticos Involucrados</b>				0,410*
Negativos	69(53,9)	25(62,5)	1(100)	
Positivos	59(46,1)	15(37,5)	0(0)	
<b>Receptores Hormonales</b>				0,238*
ER-PR Positivos	86(71,7)	27(73,0)	0(0)	
ER-PR Negativos	24(20,0)	7(18,9)	1(100)	
ER (+) – PR(-)	6(3,8)	0(0)	0(0)	
ER(-) PR(+)	4(3,3)	3(8,1)	0(0)	
<b>Características Histopatológicas</b>	<b>W/W (%)</b>	<b>W/M (%)</b>	<b>M/M (%)</b>	<b>Valor-P*</b>
<b>Grado Histológico</b>				0,459*
Grado I	31(23,7)	11(27,5)	0(0)	
Grado II	75(57,3)	23(57,5)	0(0)	
Grado III	25(19,1)	6(15,0)	1(100)	
<b>Tipo de Cáncer</b>				0,539*
CDI	104(76,5)	34(79,1)	1(100)	
CD In situ	19(14,0)	5(11,6)	0(0)	
CD y CL In situ	1 (0,7%)	0(0)	0(0)	
CLI	9(6,6)	1(2,3)	0(0)	
CLI In situ	1(0,7)	1(2,3)	0(0)	
Mucinoso	1(0,7)	0(0)	0(0)	
Coloidal	1(0,7)	1(2,3)	0(0)	
Filodes	0(0,0)	1(2,3)	0(0,0)	

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante, CDIn situ: Carcinoma Ductal Insitu, CLI: Carcinoma Lobulillar Infiltrante, \*Prueba exacta de Fisher

### 5.6.3 Polimorfismo del Intrón 3 del gen p53

#### 5.6.3.1 Frecuencias genotípicas y alélicas del Intrón 3 del gen p53 en casos y controles

Los valores de las frecuencias de los genotipos del intrón 3 del gen p53 en casos y controles se muestran en la tabla 25.

La distribución del genotipo fue diferente significativamente entre los grupos de casos y controles (P= 0,001)

Al realizarse el análisis estadístico independientemente para cada uno de los genotipos, se encontró que existen diferencias significativas tanto en el genotipo W/W (P=0,000) como en el genotipo W/M (P=0,000).

La frecuencia del Alelo Mutante (M) (5,4%) fue mayor significativamente en el grupo de los casos que en el grupo de los controles (0,08%).

El análisis del ji-cuadrado ( $\lambda^2$ ) del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) indican que la población de los casos ( $\lambda^2=4,44$ ) y la población de los controles ( $\lambda^2=81,99$ ) no se encuentran en equilibrio.

**Tabla 25. Frecuencias genotípicas y alélicas del Intrón 3 en casos y controles**

	Cáncer de mama n=186(%)	Controles n=186 (%)	Valor-P
<b>Genotipos Intrón 3</b>			0,001*
W/W	168 (90,3)	184(98,9)	0,000
W/M	16(8,6)	1(0,5)	0,000
M/M	2(1,1)	1(0,5)	1,000*
<b>Alelos</b>			0,003
W	352(94,6)	369(99,2)	
M	20(5,4)	3(0,08)	
$\lambda^2$ EHW	4,44	81,99	

\* Prueba exacta de Fisher

### 5.6.3.2 Asociación entre el genotipo del intrón 3 y el riesgo a cáncer de mama heredofamiliar

Los OR de los genotipos del intrón 3 sin ajustar y ajustados por los factores de riesgo evaluados se observan en la tabla 26.

El OR de 18,2 indica que en los pacientes con cáncer de mama el genotipo W/M esta presente con mayor probabilidad en forma significativa en los casos que en

los controles comparando con el genotipo (W/W) tomada como categoría de base o referencia; el genotipo M/M no se encontró asociado significativamente.

Los OR sin ajustar y ajustados por las variables de confusión no muestran un cambio significativo. Indicando que el genotipo W/M del intrón 3 es un probable factor de riesgo en el cáncer de mama heredofamiliar.

**Tabla 26. Asociación entre el genotipo de intrón 3 y el riesgo a Cáncer de mama**

Genotipos Intrón 3	Cáncer de mama n= 186	Controles n=186	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
W/W	168	184	1 referencia	1 referencia
W/M	16	1	17,53 (2,29-133,57)	18,24(2,30-144,4)
M/M	2	1	2,19 (0,19-24,38)	No aplica

*\*Regresión Logística Incondicional OR ajustado por edad menarquia, Nuliparidad, edad del primer embarazo, IMC*

### 5.6.3.3 .Relación de los genotipos del intrón 3 y el riesgo a cáncer de mama con otros factores de riesgo.

Los OR ajustados por los factores de riesgo estrato socioeconómico, nivel educativo, terapia hormonal, consumo de enlatados y embutidos que en el presente estudio se encontraron relacionados con el cáncer de mama familiar se observan en la Tabla 27. Se observa de la misma manera, que lo indicado anteriormente, que el genotipo W/M mostró una asociación significativa con el cáncer de mama heredofamiliar

**Tabla 27. Asociación entre el genotipo del intrón 3 y factores de riesgo hallados en el presente estudio**

Genotipos Intrón 3	Cáncer de mama n= 186	Controles n=186	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
W/W	168	184	1 referencia	1 referencia
W/M	16	1	18,53 (2,29-133,57)	18,24 (2,30-144,4)
M/M	2	1	2,19 (0,19-24,38)	2,66(0,14-50,87)

*\*Regresión Logística Incondicional OR ajustado por estrato social, nivel educativo, terapia de reemplazo hormonal, enlatados y embutidos*

### 5.6.3.4 Asociación del polimorfismo del intrón 3 en los casos de cáncer de mama hereditario y las características clínico patológicas.

La relación entre los genotipos del intrón 3 y las características clinicopatológicas de los casos se observan en la tabla 28, en ninguna de estas características se observaron diferencias significativas.

**Tabla 28. Asociación entre los genotipos del Intrón 3 y las características clinicopatológicas de los casos.**

Características Histopatológicas	W/W (%)	W/M(%)	M/M (%)	Valor-P
<b>Edad</b>				0,235*
≤39	24(14,8)	1(6,3)	0(0)	
40-49	40(24,7)	6(37,5)	1(50)	
50-59	62(38,3)	3(18,8)	0(0)	
60-59	22(13,6)	3(18,8)	1(50)	
≥70	14(8,6)	3(18,8)	0	
<b>Estado Menopáusico</b>				0,143
Pre-menopáusica	108(65,5)	7(43,8)	2(100)	
Post-menopáusica	57(34,5)	9(56,2)	0(0)	
<b>Nódulos Linfáticos Involucrados</b>				0,483*
Negativos	86(55,8)	9(64,3)	0(0)	
Positivos	68(44,2)	5(35,7)	1(100)	
<b>Receptores Hormonales</b>				0,365*
ER-PR Positivos	102 (71,3)	10(71,4)	1(100)	
ER-PR Negativos	30(21,0)	2(14,3)	0(0)	
ER (+) – PR(-)	4(2,8)	2(14,3)	0(0)	
ER(-) PR(+)	7(4,9)	0(0)	0(0)	
<b>Grado Histológico</b>				0,522*
Grado I	38(24,2)	4(28,6)	0(0)	
Grado II	90(57,3)	8(57,1)	0(0)	
Grado III	29(18,5)	2(14,3)	1(100)	
<b>Tipo de Cáncer</b>				0,785*
CDI	127(77,4)	11(73,3)	1(100)	
CD In situ	21(12,8)	3(20,0)	0(0)	
CD y CL In situ	1 (0,6%)	0(0)	0(0)	
CLI	9(5,5)	1(6,7)	0(0)	
CLI In situ	2(1,2)	0(0)	0(0)	
Mucinoso	1(0,6)	0(0)	0(0)	
Coloidal	2(1,2)	0(0)	0(0)	

Valor-P: Prueba de Ji-cuadrado. \*Prueba de Fisher

## 6. DISCUSION DE RESULTADOS

En Colombia no se ha realizado ningún estudio en cáncer de mama heredo familiar que analice los polimorfismos del gen p53, como factores de riesgo asociados a este tipo de enfermedad. El análisis de los polimorfismos del codón 72 e intrón 3 y 6 del gen p53 es un estudio pionero en la población colombiana.

Los polimorfismos del gen p53 han sido asociados tanto a cáncer de mama, como a otros tipos de cáncer; como por ejemplo cáncer de colon y pulmón se han asociado a los polimorfismos del intrón 3 y del intrón 6, (Birgander et al., 1995; Sjalander et al., 1995; Wu et al., 2002) y el polimorfismo del codón 72 se ha visto asociado al cáncer de pulmón, cuello uterino, tiroides y ovario entre otros (Birgander et al., 1995; Boltze et al., 2002; Mabrouk et al., 2003; Niwa et al., 2004; Sjalander et al., 1996).

De acuerdo a la literatura existe variación en el genotipo que se asocia al cáncer de mama para el codón 72; algunos autores indican que es el genotipo Pro/Pro o Pro/Arg que esta asociado al desarrollo del cáncer de mama (Bonafe et al., 2003; Dunning et al., 1999; Huang et al., 2003; Wang-Gohrke et al., 2002) y otros indican que es Arg/Arg (Buyru et al., 2003; Ohayon et al., 2005; Papadakis et al., 2000). En cuanto a los intrones 3 y 6 se ha indicado que son los genotipos W/M y M/M los asociados al riesgo de desarrollo de cáncer de mama. (Dunning et al., 1999; Khaliq et al., 2000; Sjalander et al., 1996).

En el presente estudio se halló una asociación significativa con el polimorfismo del codón 72 en los casos que portan el genotipo Arg/Arg (tabla 18), esto es consistente con el estudio de Ohayon y col realizado en judías Ashkenazi y no Ashkenazi con antecedentes familiares de cáncer de mama, donde encontraron que individuos homocigotos para el alelo Arginina tienen un riesgo 2 veces más

alto de desarrollar cáncer de mama que los heterocigotos u homocigotos para el alelo prolina (OR= 2,18 IC 95% (1,08-4,39)) (Ohayon et al., 2005).

El aminoácido Arginina se encuentra en el dominio de transactivación del gen p53 y está ubicado en la región hidrofóbica de la proteína, el cual contribuye en la determinación de su conformación espacial la cual puede afectar la unión al ADN y su actividad transcripcional. (Greenblatt, Bennett, Hollstein, & Harris, 1994; Wang, Lee, Chen, Chang, & Chen, 1999). Por lo que este puede alterar la función de la proteína P53 favoreciendo en este caso el desarrollo del cáncer.

Se ha mostrado que las variantes del codón 72 (Arg72 y Pro72) difieren en la actividad funcional, Matlashewski y col observaron que Pro72 es diferente estructuralmente a Arg72 lo cual se refleja en la diferencia de la movilidad electroforética, Arg72 migra más rápido en geles de poliacrilamida que Pro72. También observó que los tumores formados por células que contienen el genotipo Pro/Pro aparecen de forma más lenta y son más pequeños que los tumores causados por el genotipo Arg/Arg. (Matlashewski et al., 1987). Por otro lado, Storey y col observaron que el genotipo Arg/Arg aumenta significativamente la susceptibilidad a la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano (VPH) mediada por la proteína P53. (Storey et al., 1998) Adicionalmente Pro72 parece inducir la transcripción de manera más eficientemente que Arg72, mientras que Arg72 suprime la transformación celular e induce la apoptosis más eficiente que Pro72. (Dumont et al., 2003; Thomas et al., 1999).

Aunque ambas formas, producen cambios tumorigénicos, el genotipo Arg/Arg es más oncogénico que Pro/Pro (Papadakis et al., 2000)

Las frecuencias alélicas halladas en este estudio para Arginina (Tabla 17) fueron similares a las encontradas por Ohayon y col en la población Ashkenazi que fue de 83,3% para los individuos con cáncer de mama heredofamiliar y 70% para los controles (Ohayon et al., 2005).

Se ha visto que las frecuencias alélicas varían de una población a otra, esto se refleja en otros estudios realizados en cáncer de mama pero no heredofamiliares, Papadakis en población griega observó 62% en los casos y 20% en los controles, (Papadakis et al., 2000) estudios en Japón muestran frecuencias entre 57 y 66%

en los casos y 64,9 y 68,3% en los controles, en población turca la frecuencia alélica de arginina en los casos fue de 72,6% y en los controles de 56%. En Rusia por otra parte, las frecuencias alélicas se mostraron muy similares en ambos grupos (72 y 73% respectivamente), al igual que en población jordana en donde el grupo de los casos la frecuencia fue de 59,3% y en los controles de 60%, (Buyru et al., 2003; Huang et al., 2003; Mahasneh & Abdel-Hafiz, 2004; Noma, Miyoshi, Taguchi, Tamaki, & Noguchi, 2004; Suspitsin et al., 2003)

En cuanto a la frecuencia alélica de Prolina encontrada el presente trabajo (tabla 17) fue similar al indicado por Ohayon (casos 16,6% y controles 30%), sin embargo, no es concordante con lo indicado por otros estudios realizados en cáncer de mama no familiar como en las poblaciones suiza (casos 33,3%, controles 27,2%), griega (casos 54%, controles 44,9%), turca (casos 27,3%, controles 44%), japonesa (casos 33,2-43% y controles 57%-66,8%) y coreana (casos 34%, controles 66%) donde se observan claramente estas diferencias. (Buyru et al., 2003; Papadakis et al., 2000; Sjalander et al., 1996)

En un estudio realizado en Noruega en cáncer de mama no familiar las frecuencias alélicas para los alelos Arginina y Prolina obtenidos para los casos fue de 24% para Prolina y 71% para Arginina, muy similares a las obtenidas en este estudio (Prolina 22,6% y 77,4% Arginina). (Langerod et al., 2002)

Para los controles las frecuencias alélicas fueron similares a las reportadas en población japonesa por Noma y col (Arginina 69%, Prolina 32%) y el grupo étnico de población jordana (Beduinos) (Arginina 61%, Prolina 38%). (Mahasneh & Abdel-Hafiz, 2004; Noma et al., 2004)

Si analizamos los datos obtenidos en las frecuencias alélicas para los casos y los controles son más concordantes con la población judía Ashkenazi, sin embargo la influencia étnica de esa población es muy baja en la nuestra, ya que la población colombiana esta conformada por ancestros españoles, amerindios y africanos, siendo entonces una población mestiza.

En el presente estudio no se encontró asociación del polimorfismo del codón 72 y las características clinicopatológicas, otros estudios, realizados en cáncer de mama esporádico, han mostrado este mismo hallazgo (Noma et al., 2004; Papadakis et al., 2000), sin embargo en el estudio hecho por Han y col encontraron que el alelo Prolina estaba asociado con los nódulos linfáticos negativos y por consiguiente a la sobrevida del paciente. (Han et al., 2004).

La nuliparidad y el índice de masa corporal en mujeres postmenopáusicas, son factores de riesgo importantes para la etiología del cáncer de mama, sin embargo en este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los casos y controles respecto a estas características. La edad de la menarquia, la edad del primer embarazo y el uso de terapia de reemplazo hormonal, al igual que lo mencionado en la literatura, se asociaron con el aumento del riesgo a cáncer de mama (Zografos et al., 2004).

En cuanto a los hábitos alimenticios en ambos grupos el consumo de alcohol no estuvo asociado como factor de riesgo, aunque difiere con lo indicado en estudios recientes que mostraron una asociación significativa entre el alcohol y el cáncer de mama en la postmenopausia en población danesa; el consumo del alcohol parece estar asociado más fuertemente con el cáncer lobular que con el cáncer ductal y aumenta el riesgo en tumores ER+/PR+, pero no en tumores ER+/PR- o ER-/PR+, en este estudio no se observó tal asociación.(Zografos et al., 2004)

El hábito de fumar y la asociación al cáncer de mama aún no es claro, sin embargo, hay estudios que indican que el fumar tiene poco o ningún efecto sobre el riesgo al desarrollo del cáncer de mama, en tanto que la cafeína no ha mostrado ejercer efecto alguno sobre el desarrollo en el cáncer de mama, la información obtenida en este estudio es concordante con lo anteriormente referido.(Hamajima et al., 2002; Zografos et al., 2004)



El estrato socioeconómico está asociado al cáncer de mama al igual que lo encontrado en la literatura (Hamajima et al., 2002; Zografos et al., 2004). Posiblemente la asociación hallada en el presente estudio se deba al muestreo realizado, debido a que los estratos sociales de los cuales se obtuvieron los casos y los controles fueron diferentes, esta circunstancia podría ocasionar ese sesgo de muestreo y por consiguiente la diferencia significativa.

La literatura indica que el riesgo a cáncer de mama es más alto en mujeres con algún grado académico que en mujeres campesinas (RR=1,39) (Dano, Andersen, Ewertz, Petersen, & Lynge, 2003). Otros estudios indican que amas de casa, gerentes y diferentes profesionales tienen un riesgo de 1,7 veces más que mujeres con trabajos informales o manuales (Barbone et al., 1996); por lo tanto se puede decir que a mejor estrato socioeconómico y nivel educativo el riesgo al desarrollo al cáncer de mama es mayor tal como se halló en el presente trabajo.

El consumo de enlatados y embutidos presentaron una significancia alta. Estos productos elaborados pueden contener sustancias que posiblemente sean carcinogénicas e induzcan el desarrollo de la enfermedad aunque se tendría que hacer estudios más completos sobre el tipo de alimentación.

El estrato social, el nivel de educación, el consumo de enlatados, el consumo de embutidos y el uso de terapia hormonal, mostraron una fuerte asociación del genotipo Arg/Arg en los individuos con cáncer de mama heredofamiliar (OR=1,75 IC95% 1,04-2,92), esta información aunque se presenta por primera vez como factores de riesgo en población con cáncer de mama familiar debe ser estudiada a profundidad para poder indicar con certeza si efectivamente son factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama.

En el estudio de Wan-Gohrke y col, se encontró una asociación significativa para el genotipo W/M del intrón 3 (OR= 1,3 IC95% 1,0-1,7), pero no para el del intrón 6 (OR ajustado por el número de embarazos, 1,2 IC95% 0,9-1,6) (Wang-Gohrke et al., 2002) sin embargo los resultados del presente estudio muestran una

asociación significativa con el genotipo W/M tanto del intrón 3 (OR= 18,24 IC95% (2,30-144,4)) como del intrón 6 (OR=1,56 IC 95% (0,89-2,82)), indicando que se tiene un riesgo de 1,5 veces más de desarrollar cáncer de mama heredofamiliar, si se tiene el genotipo W/M para el intrón 6 y de 18 veces más cuando se tiene este genotipo para el intrón 3, sin embargo el genotipo M/M no mostró asociación con cáncer en ninguno de los 2 intrones contrariamente a lo indicado en la literatura para este genotipo (Barbone et al., 1996; Dunning et al., 1999; Sjalander et al., 1996; Suspitsin et al., 2003).

En las 2 poblaciones los alelos estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg para el intrón 6, sin embargo para el intrón 3 ambas poblaciones están en desequilibrio, se obtuvieron menos heterocigotos de los que esperaban.

Las frecuencias alélicas para el intrón 3 en los casos de cáncer de mama heredofamiliar fueron de 94,6% para el alelo silvestre (W) y 5,4% para el alelo mutante(M), otras investigaciones han mostrado que la frecuencia del alelo W era más baja y por lo tanto la frecuencia del alelo M más alta; así el alelo W presentó frecuencias entre 76%-87% y el alelo M entre 19% y 13% (Khaliq et al., 2000; Mahasneh & Abdel-Hafiz, 2004; Sjalander et al., 1996; Suspitsin et al., 2003; Wang-Gohrke et al., 2002) pero es de resaltar que estos estudios han sido realizados en cáncer de mama esporádicos por lo tanto la información referida de las frecuencias alélicas del presente trabajo cobran un mayor valor por ser relativos a cáncer de mama heredofamiliar.

Wang-Gohrke en su estudio en población alemana encontró un riesgo de 5 veces en mujeres portadoras del alelo M con historia de cáncer de mama en familiares de primer grado (Wang-Gohrke et al., 2002) en el presente estudio se observó que fue de 18,2 veces el riesgo al cáncer de mama cuando se tienen antecedentes familiares.

Las frecuencias alélicas W y M del intrón 3 para los controles fueron 99,2% y 0,08% respectivamente. En general se ha visto que las frecuencias alélicas varían de población a población por sus características étnicas, de ahí que los valores

encontrados para la población control colombiana puedan variar con respecto a otras poblaciones tal como se encuentra referido en la literatura donde los rangos están entre 77% y 90% para el alelo W y del 23% y 6% para el alelo M.(Khaliq et al., 2000; Mahasneh & Abdel-Hafiz, 2004; Sjalander et al., 1996; Suspitsin et al., 2003; Wang-Gohrke et al., 2002)

Si se hace el análisis de las frecuencias del genotipo W/M para el intrón 3 se ve que esta presente en 16 (8,6%) casos y en los controles solo 1 (0,5%) individuo, presentó dicho genotipo, esto indica que el riesgo al cáncer de mama con antecedentes familiares, se aumenta cuando los individuos tienen el genotipo W/M del intrón 3.

Las frecuencias alélicas W y M del intrón 6 en este estudio fueron 87,4% y 12,6% para los casos y de 90,1% (W) y 9,9% (M) para la población control. Los valores de la población caso son cercanos a los realizados en otros estudios de cáncer de mama no heredofamiliares como en la población suiza, alemana, rusa y jordana donde el rango osciló entre 83-90% para el alelo W y 7-10% para el alelo M.(Khaliq et al., 2000; Mahasneh & Abdel-Hafiz, 2004; Sjalander et al., 1996; Suspitsin et al., 2003; Wang-Gohrke et al., 2002). Se observa que no existen diferencias entre estas frecuencias en casos de cáncer familiar y esporádicos.

Wang-Gohrke al comparar el polimorfismo del intrón 6 en mujeres con antecedentes familiares en primer grado halló una fuerte evidencia de asociación aunque no significativa (OR=3,8 IC95% (0,8-19,3)) con el genotipo W/M (Wang-Gohrke et al., 2002), en el presente estudio los resultados hallados son similares a ese estudio (OR=1,53 IC95% (0,89-2,82)), indicando que para la población colombiana el genotipo heterocigótico tiene asociación aunque no significativa con el riesgo en el desarrollo del cáncer de mama heredofamiliar

El valor de la frecuencia alélica de W (90,1%) para la población control del presente estudio fue similar a los hallados en los estudios anteriormente mencionados, donde se muestran valores entre 74% y 90%, como es de esperarse el alelo M (9,9%) también fue similar ya que ellos reportan valores entre

10% y 17%.(Khaliq et al., 2000; Mahasneh & Abdel-Hafiz, 2004; Sjalander et al., 1996; Suspitsin et al., 2003; Wang-Gohrke et al., 2002), por lo que se puede decir que en nuestra población control hay una frecuencia baja del alelo M. Ambas poblaciones mostraron estar en equilibrio Hardy-Weinberg.

El análisis de la asociación entre las características clinicopatológicas con los genotipos tanto del intrón 3 como del intrón 6, no mostraron diferencias significativas, esta información se convierte en el primer registro de la relación de la frecuencia de estos polimorfismos en pacientes con cáncer de mama heredofamiliar.

## **7. RECOMENDACIONES**

- Realizar estudios con mayor profundidad para analizar la asociación entre el consumo de embutidos y enlatados
- Diseñar un estudio para determinar la frecuencia de los polimorfismos analizados a nivel poblacional en Colombia
- Determinar la frecuencia de otros polimorfismos genéticos que se han asociado con el cáncer de mama heredofamiliar
- Estudiar el impacto del genotipo W/M del intrón 3 sobre la función de la proteína P53.

## 8 .CONCLUSIONES

Para la población colombiana estudiada de individuos con cáncer de mama heredofamiliar se puede concluir que:

1. El genotipo Arg/Arg del codón 72 del gen p53 es un posible factor de riesgo (2 veces más) para el desarrollo del cáncer de mama heredofamiliar.
2. El genotipo W/M del intrón 3 del gen p53 es un posible factor de riesgo (18 veces más) para el desarrollo del cáncer de mama heredofamiliar.
3. El genotipo W/M del intrón 6 del gen p53 tiene asociación aunque no muy fuerte y significativa con el riesgo en el desarrollo del cáncer de mama heredofamiliar.
4. Hay asociación entre los siguientes factores y el desarrollo de cáncer de mama heredofamiliar:
  - Edad de la menarquia inferior a 12 años
  - La edad del primer hijo (26-29 años)
  - El consumo de embutidos y de enlatados
  - El uso de terapia hormonal
5. No hay asociación entre los genotipos de los diferentes polimorfismos del gen p53 y las características clinicopatológicas en los casos con cáncer

## BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Althuis, M. D., Brogan, D. R., Coates, R. J., Daling, J. R., Gammon, M. D., Malone, K. E., Schoenberg, J. B., & Brinton, L. A. (2003). Hormonal content and potency of oral contraceptives and breast cancer risk among young women. *Br J Cancer*, 88(1), 50-57.
- Arrowsmith, C. H. (1999). Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ*, 6(12), 1169-1173.
- Barbone, F., Filiberti, R., Franceschi, S., Talamini, R., Conti, E., Montella, M., & La Vecchia, C. (1996). Socioeconomic status, migration and the risk of breast cancer in Italy. *Int J Epidemiol*, 25(3), 479-487.
- Birgander, R., Sjalander, A., Rannug, A., Alexandrie, A. K., Sundberg, M. I., Seidegard, J., Tornling, G., Beckman, G., & Beckman, L. (1995). P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis*, 16(9), 2233-2236.
- Boltze, C., Roessner, A., Landt, O., Szibor, R., Peters, B., & Schneider-Stock, R. (2002). Homozygous proline at codón 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Oncol*, 21(5), 1151-1154.
- Bonafe, M., Ceccarelli, C., Farabegoli, F., Santini, D., Taffurelli, M., Barbi, C., Marzi, E., Trapassi, C., Storci, G., Olivieri, F., & Franceschi, C. (2003). Retention of the p53 codón 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 9(13), 4860-4864.
- Borresen-Dale, A. L. (2003). TP53 and breast cancer. *Hum Mutat*, 21(3), 292-300.
- Bray, S. E., Schorl, C., & Hall, P. A. (1998). The challenge of p53: linking biochemistry, biology, and patient management. *Stem Cells*, 16(4), 248-260.
- Briceño, I. (1988). *Histocompatibility antigens and Mitochondrial genome serological and molecular genetics studies of amerindian in Colombia*. New Castle, New Castle.
- Buyru, N., Tigli, H., & Dalay, N. (2003). P53 codón 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep*, 10(3), 711-714.
- Canman, C. E., & Kastan, M. B. (1996). Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature*, 384(6606), 213-214.
- Carranza, H. A., A; Hoyos, O; Martinez, JO. (2001). Cáncer de Seno. In I. N. d. *Cancerología* (Ed.), *Guías de Practica Clinica en Enfermedades Neoplásicas* (1ra Edicion ed., pp. 79-110). Bogota: Ruecolor.

- Castro Miguel Ángel, P. M., Martínez Teresa,. (2003). Mortalidad en el Instituto Nacional de Cancerología , Colombia, 2002. *Revista Colombiana de Cancerología*, 7 Numero . Septiembre, 20-32.
- Constanza Pardo, R. M., Marion Piñeros, Miguel Ángel Castro. (2002). CASOS NUEVOS DE CÁNCER EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA, COLOMBIA, 2002. *Revista Colombiana de Cancerología*, 7(3), 4-19.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2004). *The cell : a molecular approach* (3rd ed.). Washington, D.C. Sunderland, Mass.: ASM Press ; Sinauer Associates.
- Coughlin, S. S., & Piper, M. (1999). Genetic polymorphisms and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8(11), 1023-1032.
- Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H., & Reid, B. J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, 267(5202), 1353-1356.
- Crum, C., Lester, S, Cotran, R. (2003). *The Female Genital System and Breast*. In V. Kumar, Cotran, R, Robbins, S. (Ed.), *Robbins Basic Pathologic* (Vol. 7th Edition, pp. 679-717). Philadelphia: Saunders.
- Chodosh, L. A., D'Cruz, C. M., Gardner, H. P., Ha, S. I., Marquis, S. T., Rajan, J. V., Stairs, D. B., Wang, J. Y., & Wang, M. (1999). Mammary gland development, reproductive history, and breast cancer risk. *Cancer Res*, 59(7 Suppl), 1765-1771s; discussion 1771s-1772s.
- Chumakov, P. M. (2000). Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochemistry (Mosc)*, 65(1), 28-40.
- Daling, J. R., Malone, K. E., Doody, D. R., Voigt, L. F., Bernstein, L., Coates, R. J., Marchbanks, P. A., Norman, S. A., Weiss, L. K., Ursin, G., Berlin, J. A., Burkman, R. T., Deapen, D., Folger, S. G., McDonald, J. A., Simon, M. S., Strom, B. L., Wingo, P. A., & Spirtas, R. (2002). Relation of regimens of combined hormone replacement therapy to lobular, ductal, and other histologic types of breast carcinoma. *Cancer*, 95(12), 2455-2464.
- Dano, H., Andersen, O., Ewertz, M., Petersen, J. H., & Lynge, E. (2003). Socioeconomic status and breast cancer in Denmark. *Int J Epidemiol*, 32(2), 218-224.
- Darnton, S. J. (1998). Demystified ... p53. *Mol Pathol*, 51(5), 248-253.
- Dumont, P., Leu, J. I., Della Pietra, A. C., 3rd, George, D. L., & Murphy, M. (2003). The codón 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, 33(3), 357-365.
- Dunning, A. M., Healey, C. S., Pharoah, P. D., Teare, M. D., Ponder, B. A., & Easton, D. F. (1999). A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8(10), 843-854.
- Fan, R., Wu, M. T., Miller, D., Wain, J. C., Kelsey, K. T., Wiencke, J. K., & Christiani, D. C. (2000). The p53 codón 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(10), 1037-1042.
- Freedman, D. A., Wu, L., & Levine, A. J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*, 55(1), 96-107.



- Gasco, M., Yulug, I. G., & Crook, T. (2003). TP53 mutations in familial breast cancer: functional aspects. *Hum Mutat*, 21(3), 301-306.
- Giordano, S. H., Buzdar, A. U., & Hortobagyi, G. N. (2002). Breast cancer in men. *Ann Intern Med*, 137(8), 678-687.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., & Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54(18), 4855-4878.
- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E. E., Heath, C. W., Jr., Coates, R. J., Liff, J. M., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Morabia, A., Schuman, L., Stewart, W., Szklo, M., Bain, C., Schofield, F., Siskind, V., Band, P., Coldman, A. J., Gallagher, R. P., Hislop, T. G., Yang, P., Kolonel, L. M., Nomura, A. M., Hu, J., Johnson, K. C., Mao, Y., De Sanjose, S., Lee, N., Marchbanks, P., Ory, H. W., Peterson, H. B., Wilson, H. G., Wingo, P. A., Ebeling, K., Kunde, D., Nishan, P., Hopper, J. L., Colditz, G., Gajalanski, V., Martin, N., Pardthaisong, T., Silpisornkosol, S., Theetranont, C., Boosiri, B., Chutivongse, S., Jimakorn, P., Virutamasen, P., Wongsrichanalai, C., Ewertz, M., Adami, H. O., Bergkvist, L., Magnusson, C., Persson, I., Chang-Claude, J., Paul, C., Skegg, D. C., Spears, G. F., Boyle, P., Evstifeeva, T., Daling, J. R., Hutchinson, W. B., Malone, K., Noonan, E. A., Stanford, J. L., Thomas, D. B., Weiss, N. S., White, E., Andrieu, N., Bremond, A., Clavel, F., Gairard, B., Lansac, J., Piana, L., Renaud, R., Izquierdo, A., Viladiu, P., Cuevas, H. R., Ontiveros, P., Palet, A., Salazar, S. B., Aristizabel, N., Cuadros, A., Tryggvadottir, L., Tulinius, H., Bachelot, A., Le, M. G., Peto, J., Franceschi, S., Lubin, F., Modan, B., Ron, E., Wax, Y., Friedman, G. D., Hiatt, R. A., Levi, F., Bishop, T., Kosmelj, K., Primic-Zakelj, M., Ravnihar, B., Stare, J., Beeson, W. L., Fraser, G., Bullbrook, R. D., Cuzick, J., Duffy, S. W., Fentiman, I. S., Hayward, J. L., Wang, D. Y., McMichael, A. J., McPherson, K., Hanson, R. L., Leske, M. C., Mahoney, M. C., Nasca, P. C., Varma, A. O., Weinstein, A. L., Moller, T. R., Olsson, H., Ranstam, J., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A., Apelo, R. A., Baens, J., de la Cruz, J. R., Javier, B., Lacaya, L. B., Ngelangel, C. A., La Vecchia, C., Negri, E., Marubini, E., Ferraroni, M., Gerber, M., Richardson, S., Segala, C., Gatei, D., Kenya, P., Kungu, A., Mati, J. G., Brinton, L. A., Hoover, R., Schairer, C., Spirtas, R., Lee, H. P., Rookus, M. A., van Leeuwen, F. E., Schoenberg, J. A., McCredie, M., Gammon, M. D., Clarke, E. A., Jones, L., Neil, A., Vessey, M., Yeates, D., Appleby, P., Banks, E., Beral, V., Bull, D., Crossley, B., Goodill, A., Green, J., Hermon, C., Key, T., Langston, N., Lewis, C., Reeves, G., Collins, R., Doll, R., Peto, R., Mabuchi, K., Preston, D., Hannaford, P., Kay, C., Rosero-Bixby, L., Gao, Y. T., Jin, F., Yuan, J. M., Wei, H. Y., Yun, T., Zhiheng, C., Berry, G., Cooper Booth, J., Jelichovsky, T., MacLennan, R., Shearman, R., Wang, Q. S., Baines, C. J., Miller, A. B., Wall, C., Lund, E., Stalsberg, H., Shu, X. O., Zheng, W., Katsouyanni, K., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Dabancens, A., Martinez, L., Molina, R., Salas, O., Alexander, F. E., Anderson, K., Folsom, A. R., Hulka, B. S., Bernstein, L., Enger, S., Haile, R. W., Paganini-Hill, A., Pike, M. C., Ross, R. K., Ursin, G., Yu, M. C., Longnecker, M. P., Newcomb, P., Kalache, A., Farley, T. M., Holck, S., &

- Meirik, O. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*, 87(11), 1234-1245.
- Han, W., Kang, D., Park, I. A., Kim, S. W., Bae, J. Y., Chung, K. W., & Noh, D. Y. (2004). Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clin Cancer Res*, 10(1 Pt 1), 124-130.
- Harada, Y., Katagiri, T., Ito, I., Akiyama, F., Sakamoto, G., Kasumi, F., Nakamura, Y., & Emi, M. (1994). Genetic studies of 457 breast cancers. Clinicopathologic parameters compared with genetic alterations. *Cancer*, 74(8), 2281-2286.
- Huang, X. E., Hamajima, N., Katsuda, N., Matsuo, K., Hirose, K., Mizutani, M., Iwata, H., Miura, S., Xiang, J., Tokudome, S., & Tajima, K. (2003). Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer. *Breast Cancer*, 10(4), 307-311.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmuller, L., Grosse, F., & Deppert, W. (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci*, 55(1), 12-27.
- Jardines, L. H., BG; Fisher, P. (2005). Breast cancer overview. Risk factors, screening, genetic testing, and prevention. In L. R. C. Richard Pazdur, William J. Hoskins (Ed.), *Cancer Management* (9th Edition ed., pp. 175-202).
- Jayaraman, L., & Prives, C. (1999). Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci*, 55(1), 76-87.
- Jernstrom, H., Loman, N., Johannsson, O. T., Borg, K., & Olsson, H. (2005). Impact of teenage oral contraceptive use in a population-based series of early-onset breast cancer cases who have undergone BRCA mutation testing. *Eur J Cancer*.
- Kelsey, J. L., Gammon, M. D., & John, E. M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*, 15(1), 36-47.
- Khaliq, S., Hameed, A., Khaliq, T., Ayub, Q., Qamar, R., Mohyuddin, A., Mazhar, K., & Qasim-Mehdi, S. (2000). P53 mutations, polymorphisms, and haplotypes in Pakistani ethnic groups and breast cancer patients. *Genet Test*, 4(1), 23-29.
- Kirsh, V., & Kreiger, N. (2002). Estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and risk of postmenopausal breast cancer in Canada. *Cancer Causes Control*, 13(6), 583-590.
- Lane, D. P., & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278(5701), 261-263.
- Langerod, A., Bukholm, I. R., Bregard, A., Lonning, P. E., Andersen, T. I., Rognum, T. O., Meling, G. I., Lothe, R. A., & Borresen-Dale, A. L. (2002). The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(12), 1684-1688.

- Lester, S. y. C., RS. (2000). La Mama. In McGraw-Hill (Ed.), *Patologia Estructural y Funcional* (Sexta Edicion ed., pp. 1137-1164). Madrid.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323-331.
- Lodish, H. F. (2004). *Molecular cell biology* (5th ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Lozano, G., & Elledge, S. J. (2000). p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature*, 404(6773), 24-25.
- Mabrouk, I., Baccouche, S., El-Abed, R., Mokdad-Gargouri, R., Mosbah, A., Said, S., Daoud, J., Frikha, M., Jlidi, R., & Gargouri, A. (2003). No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 764-770.
- Mahasneh, A. A., & Abdel-Hafiz, S. S. (2004). Polymorphism of p53 gene in Jordanian population and possible associations with breast cancer and lung adenocarcinoma. *Saudi Med J*, 25(11), 1568-1573.
- Marchenko, N. D., Zaika, A., & Moll, U. M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, 275(21), 16202-16212.
- Matlashewski, G. J., Tuck, S., Pim, D., Lamb, P., Schneider, J., & Crawford, L. V. (1987). Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*, 7(2), 961-963.
- Newcomb, P. A., Titus-Ernstoff, L., Egan, K. M., Trentham-Dietz, A., Baron, J. A., Storer, B. E., Willett, W. C., & Stampfer, M. J. (2002). Postmenopausal estrogen and progestin use in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(7), 593-600.
- Niwa, Y., Hamajima, N., Atsuta, Y., Yamamoto, K., Tamakoshi, A., Saito, T., Hirose, K., Nakanishi, T., Nawa, A., Kuzuya, K., & Tajima, K. (2004). Genetic polymorphisms of p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p53 Arg72Pro and the risk of cervical cancer in Japanese. *Cancer Lett*, 205(1), 55-60.
- Noma, C., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., & Noguchi, S. (2004). Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Lett*, 210(2), 197-203.
- Ohayon, T., Gershoni-Baruch, R., Papa, M. Z., Distelman Menachem, T., Eisenberg Barzilai, S., & Friedman, E. (2005). The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *Br J Cancer*, 92(6), 1144-1148.
- Olsson, H. L., Ingvar, C., & Bladstrom, A. (2003). Hormone replacement therapy containing progestins and given continuously increases breast carcinoma risk in Sweden. *Cancer*, 97(6), 1387-1392.
- Papadakis, E. N., Dokianakis, D. N., & Spandidos, D. A. (2000). p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun*, 3(6), 389-392.
- Rosenberg, L., Palmer, J. R., Rao, R. S., Zauber, A. G., Strom, B. L., Warshauer, M. E., Harlap, S., & Shapiro, S. (1996). Case-control study of oral contraceptive use and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol*, 143(1), 25-37.

- Sjalander, A., Birgander, R., Athlin, L., Stenling, R., Rutegard, J., Beckman, L., & Beckman, G. (1995). P53 germ line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 16(7), 1461-1464.
- Sjalander, A., Birgander, R., Hallmans, G., Cajander, S., Lenner, P., Athlin, L., Beckman, G., & Beckman, L. (1996). p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis*, 17(6), 1313-1316.
- Spinelli, O. (2000). HPV, p53 y apoptosis: una interacción peligrosa. *Quirón*, 31, 21-30.
- Spinelli, O. V., C. (1996). Apoptosis: Una forma diferente de morir. *Pren Med Arg*, 83, 18-27.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I. M., Matlashewski, G., & Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, 393(6682), 229-234.
- Suspitsin, E. N., Buslov, K. G., Grigoriev, M. Y., Ishutkina, J. G., Ulibina, J. M., Gorodinskaya, V. M., Pozharisski, K. M., Berstein, L. M., Hanson, K. P., Togo, A. V., & Imyanitov, E. N. (2003). Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition. *Int J Cancer*, 103(3), 431-433.
- Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L., & Matlashewski, G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*, 19(2), 1092-1100.
- Tjonneland, A., Christensen, J., Thomsen, B. L., Olsen, A., Stripp, C., Overvad, K., & Olsen, J. H. (2004). Lifetime alcohol consumption and postmenopausal breast cancer rate in Denmark: a prospective cohort study. *J Nutr*, 134(1), 173-178.
- Tokino, T., & Nakamura, Y. (2000). The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 33(1), 1-6.
- Wang-Gohrke, S., Becher, H., Kreienberg, R., Runnebaum, I. B., & Chang-Claude, J. (2002). Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics*, 12(3), 269-272.
- Wang-Gohrke, S., Rebbeck, T. R., Besenfelder, W., Kreienberg, R., & Runnebaum, I. B. (1998). p53 germline polymorphisms are associated with an increased risk for breast cancer in German women. *Anticancer Res*, 18(3B), 2095-2099.
- Wang, X. W. (1999). Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res*, 19(6A), 4759-4771.
- Wang, X. W., & Harris, C. C. (1997). p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol*, 173(2), 247-255.
- Wang, Y. C., Chen, C. Y., Chen, S. K., Chang, Y. Y., & Lin, P. (1999). p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res*, 5(1), 129-134.
- Wang, Y. C., Lee, H. S., Chen, S. K., Chang, Y. Y., & Chen, C. Y. (1999). Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur J Cancer*, 35(2), 226-230.

- Weber, B. L., & Nathanson, K. L. (2000). Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer*, 36(10), 1193-1199.
- Welch, P. L., & King, M. C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*, 10(7), 705-713.
- Wu, X., Zhao, H., Amos, C. I., Shete, S., Maman, N., Hong, W. K., Kadlubar, F. F., & Spitz, M. R. (2002). p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J Natl Cancer Inst*, 94(9), 681-690.
- Zografos, G. C., Panou, M., & Panou, N. (2004). Common risk factors of breast and ovarian cancer: recent view. *Int J Gynecol Cancer*, 14(5), 721-740.



## ANEXO 1.

### COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO FACULTAD DE MEDICINA

### INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON  
EL OBJETO DE REALIZAR UN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**Estudio:**

POLIMORFISMO DEL GEN P53 EN CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN UNA  
POBLACIÓN COLOMBIANA

Usted (o su pariente) está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el instituto de Ciencias Básicas laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario con la participación de:

**Sandra Ramírez C y Yadira Pinto Q.**

Es muy importante que usted lea y entienda ciertos puntos importantes en la realización de este estudio:

- (a) La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- (b) La naturaleza de esta investigación, su propósito, sus limitaciones, sus riesgos, sus inconvenientes, incomodidades y cualquier información pertinente al resultado de este, le será explicada por el equipo de atención clínica
- (c) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas
- (d) **CONFIDENCIALIDAD:** Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la universidad del Rosario. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de atención clínica tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.
- (e) De acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio puede ser clasificado como una “Investigación con riesgo mínimo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Dras. Sandra Ramírez y Yadira Pinto. Laboratorio de Biología Celular y Molecular.

Instituto de Ciencias Básicas.

Facultad de Medicina.

Universidad del Rosario. Tel (57-1)3474570 (Ext340-311)

## **A. EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN AL INDIVIDUO**

### **OBJETIVO:**

El objetivo principal de este estudio es determinar la asociación entre algunas características genéticas que pueden predisponer a la aparición de cáncer de mama familiar, en población que como usted tienen antecedentes de cáncer personal y/o familiar y por consiguiente podrían contribuir al estudio de esta enfermedad.

### **PROCEDIMIENTO:**

Se realizará una entrevista clínica con usted y se tomará una muestra de aproximadamente 10 ml de sangre mediante punción en vena periférica respectivamente. En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto y almacenadas en nuestro laboratorio de Biología Celular y Molecular.

**RIESGOS E INCOMODIDADES** La participación en este estudio representa riesgo mínimo para su salud e integridad y las molestias y efectos adversos estarán representadas exclusivamente por la toma de muestra referida en el procedimiento, algunas molestias pueden ser: hematomas, enrojecimiento y/o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se extrae la muestra, sin embargo, estas serán de manera transitoria.

### **BENEFICIOS ADICIONALES:**

Este estudio nos ayudará a entender las causas y los mecanismos de herencia del cáncer de mama y/o ovario, además el desarrollo de una estrategia diagnóstica que permita un manejo temprano y oportuno de la enfermedad.

## **RESPONSABILIDAD DEL PACIENTE Y PRECAUCIONES**

Al tomar parte de este estudio es importante que usted contemple las siguientes responsabilidades y precauciones:

**El riesgo existente en una toma de muestra de sangre en vena periférica es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo en la salud del paciente.**

### **MANEJO DE RESULTADOS**

Los resultados que se obtengan de la investigación sólo tendrán sentido si son tomados en forma conjunta y no tendrán validez en forma individual por lo tanto se entregaran en una charla informativa al final del estudio

### **AUTORIZACION**

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

- Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio.**
- Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio , en las situaciones señaladas a continuación:**
  - En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, enviando la muestra al exterior a el(los) laboratorio(s) de el(los) instituto(s) antes mencionado(s).  Si  No
  - En estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia  Si  No
  - En estudios de investigación específicos para la(s) entidad(es), objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación:  Si  No
  - En estudios de investigación de entidades distintas a la(s) entidad(es) objeto de esta toma de muestra, siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación  Si  No

- En estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación Si No

**AUTORIZACION PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSION VOLUNTARIA EN EL ESTUDIO:  
POLIMORFISMO DEL CODON 72 DE P53 EN CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN UNA POBLACION  
COLOMBIANA**

Habiendo sido enterada(o) del contenido del presente estudio, informada(o) que no tendré ningún beneficio directo en el mismo y que se han resuelto todas mis dudas acerca de la investigación Yo, \_\_\_\_\_ con documento de identificación número: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, acepto voluntariamente que se me tome una muestra de sangre, o al menor \_\_\_\_\_, del que soy responsable, con el fin de realizar análisis de Cáncer de Mama Familiar. Así mismo, declaro que se me ha explicado la presencia de los riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_  
Firma Paciente o Acudiente / Representante legal

Índice derecho

Nombre \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Parentesco \_\_\_\_\_

Parentesco \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

CC.

CC.

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Investigador



**ANEXO 2**  
**HOJA DE REGISTRO**

**POLIMORFISMOS DEL GEN P53 EN CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN UNA POBLACION COLOMBIANA**

N° \_\_\_\_\_

Nombre: _____ Apellidos _____	
Sexo: Masculino _____	Femenino _____
Dirección: _____	Estrato 1__2__3__4__5__6__
Teléfono: _____	
<b>1- Datos Sociodemográficos</b>	
1.1 Fecha de nacimiento (D/M/A) _____	Municipio _____
Dpto. _____	
1.2 ¿Cuál es su edad, años cumplidos? _____	
1.3 ¿Ciudad en la que reside actualmente? _____ Dpto. _____	
1.4 ¿Estado civil actual? Soltero/a(1)___ Casado/a(2)___ Unión Libre(3)___ Viudo/a(4)	
1.5 ¿Cuál es su nivel educativo?	
Primaria(1)___ Secundaria(2)___ Técnico(3)___ Universitario(4)___ Postgrado(5)___	
1.6 ¿Principal ocupación en los últimos cinco años? _____	
1.7 ¿A que régimen se encuentra afiliado?	
Contributivo(1)___ Subsidiado(2)___ Vinculado(3)___ Particular(4)___	
1.8 EPS: _____	
1.9 ¿Peso actual?(Kg.) _____	
1.10 Estatura (Mts.): _____	IMC _____

**2- Antecedentes Clínicos:**

2.1 ¿Principales enfermedades que ha sufrido?

\_\_\_\_\_

2.2 ¿Consumes algún tipo de droga actualmente? SI(1)\_\_\_ NO(2)\_\_\_  
¿Cuál? \_\_\_\_\_

2.3 ¿Presenta algún tipo de reacción alérgica? \_\_\_\_\_

### 3. Antecedentes Gineco-obstétricos:

3.1 ¿Edad a la que presentó su primera menstruación? \_\_\_\_\_

3.2 Número de Gestaciones (1) \_\_\_\_\_, Partos (2) \_\_\_\_\_, Abortos (3) \_\_\_\_\_

3.3 ¿Edad del primer embarazo? \_\_\_\_\_

3.4 ¿Utilizo o utiliza algún método anticonceptivo? SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_\_

3.5 ¿Método utilizado para planificar? DIU (1) \_\_\_\_\_ Anticonceptivos Hormonales (2) \_\_\_\_\_

3.6 ¿Tiempo de uso? (Meses) \_\_\_\_\_

3.7 ¿Uso de terapia Hormonal? SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_\_ Cual? \_\_\_\_\_

¿Tiempo de uso? \_\_\_\_\_

3.8 Fecha última Menstruación \_\_\_\_\_

### 4. Antecedentes de Hábitos

4.1 ¿Fuma? SI (1) \_\_\_\_\_ NO(2)\_\_\_

Nunca\_\_\_ A veces\_\_\_ Siempre\_\_\_\_\_

4.2 ¿Consumes carnes ahumadas o asadas? SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2)\_\_\_

1 vez por semana\_\_\_ menos de 1 vez a la semana\_\_\_ menos de 1 vez al mes\_\_\_\_\_

4.3 ¿Consumes Enlatados? SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2) \_\_\_

1 vez por semana\_\_\_ menos de 1 vez a la semana\_\_\_ menos de 1 vez al mes\_\_\_\_\_

4.4 ¿Consumes Café? SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2) \_\_\_

1 vez al día\_\_\_ más de 1 vez al día\_\_\_\_\_

4.5 ¿Consumes Embutidos? SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2) \_\_\_

1 vez por semana\_\_\_ menos de 1 vez a la semana\_\_\_ menos de 1 vez al mes\_\_\_\_\_

4.6 ¿Ingiere Alcohol? SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2) \_\_\_

Nunca\_\_\_\_\_ a veces\_\_\_ Siempre\_\_\_\_\_

### 5- Antecedentes Familiares de Cáncer:

5.1. ¿Alguno de sus familiares, en primer o segundo grado, sufre o ha sufrido de cáncer?

SI (1) \_\_\_\_\_ NO (2) \_\_\_\_\_

5.2. ¿Qué tipo de Cáncer?

Mama (1) \_\_\_ Cuello Uterino (2) \_\_\_ Gástrico (3) \_\_\_ Piel (4) \_\_\_ Otro: SI \_\_\_ NO \_\_\_

¿Cuál? \_\_\_\_\_

### 6- Historia de la Enfermedad (Cáncer de Mama):

6.1. ¿Fecha de Diagnóstico? (D/M/A) \_\_\_\_\_

6.2. ¿Tipo de Cáncer de Mama? Carcinoma lobular in situ (1) \_\_\_ Carcinoma ductal in situ (2) \_\_\_  
Carcinoma lobular infiltrante (3) \_\_\_ Carcinoma ductal infiltrante(4) \_\_\_  
otros \_\_\_\_\_

6.3 Grado Histológico \_\_\_\_\_

6.4 Receptores Hormonales: Progestágenos \_\_\_\_\_ Estrógenos \_\_\_\_\_

6.5 Glandlios Linfáticos \_\_\_\_\_

6.6 Her-2 \_\_\_\_\_

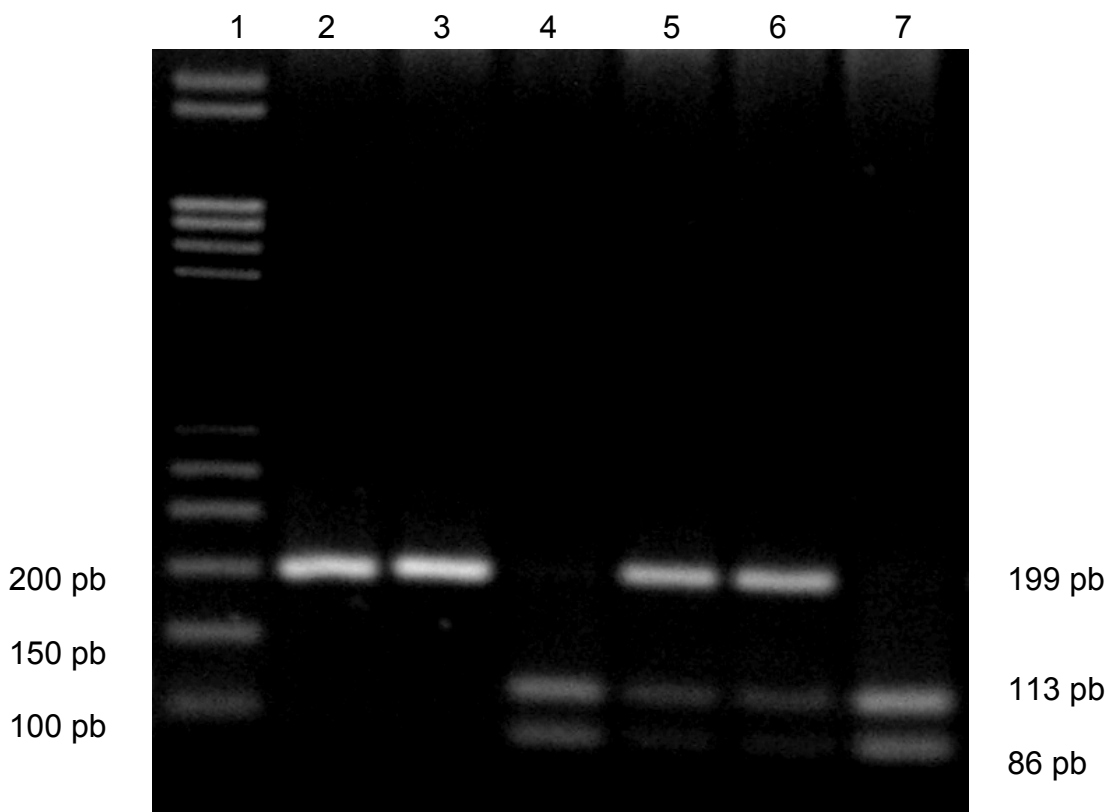
### ANEXO 3.

#### TECNICA DE EXTRACCION DE ADN "METODO PROBE"

1. En un tubo Falcon de 15 ml medir 6 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y sobre este adicionar con una pipeta de transferencia plástica 2 ml de sangre total. Mezclar muy bien y con mucha suavidad hasta completa homogenización.
2. Agitar fuertemente en una plataforma (shaker) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 3000 rpm durante 8 minutos sin freno.
4. Descartar el sobrenadante y conservar el pellet.
5. Mezclar vigorosamente el pellet (vortex) en el líquido residual.
6. Adicionar 2,5 ml de buffer de lisis celular y mezclar cuidadosamente con chupa plástica varias veces, hasta completa homogenización. Dejar al menos 30 minutos a temperatura ambiente. (En este paso se puede suspender el procedimiento incluso hasta el día siguiente, dejando los tubos a 4°C).
7. Adicionar 800 ul de solución precipitante de proteínas (aquí no se mezcla).
8. Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos, sin freno. (Se recomienda repetir este paso con la precaución de conservar el sobrenadante y descartar el precipitado).
9. Verter el sobrenadante sobre un tubo Falcon de 15 ml que contenga 2,4 ml de Isopropanol frío (alcohol isopropílico), dejar en reposo al menos unos 5 minutos.
10. Mezclar cuidadosamente por inversión hasta precipitar el DNA.
11. Envolver el DNA en una pipeta pasteur de vidrio y pasarlo rápidamente por Etanol 70% frío, dejar secar a temperatura ambiente por unos segundos y resuspender finalmente en T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (50 – 500 ml) dependiendo de la cantidad de DNA recuperado.
12. Colocar en plataforma (shaker) a velocidad lenta, toda la noche a temperatura ambiente para resuspender por completo el DNA.
13. Chequear al día siguiente en agarosa y almacenarlo a -20°C.

## ANEXO 4.

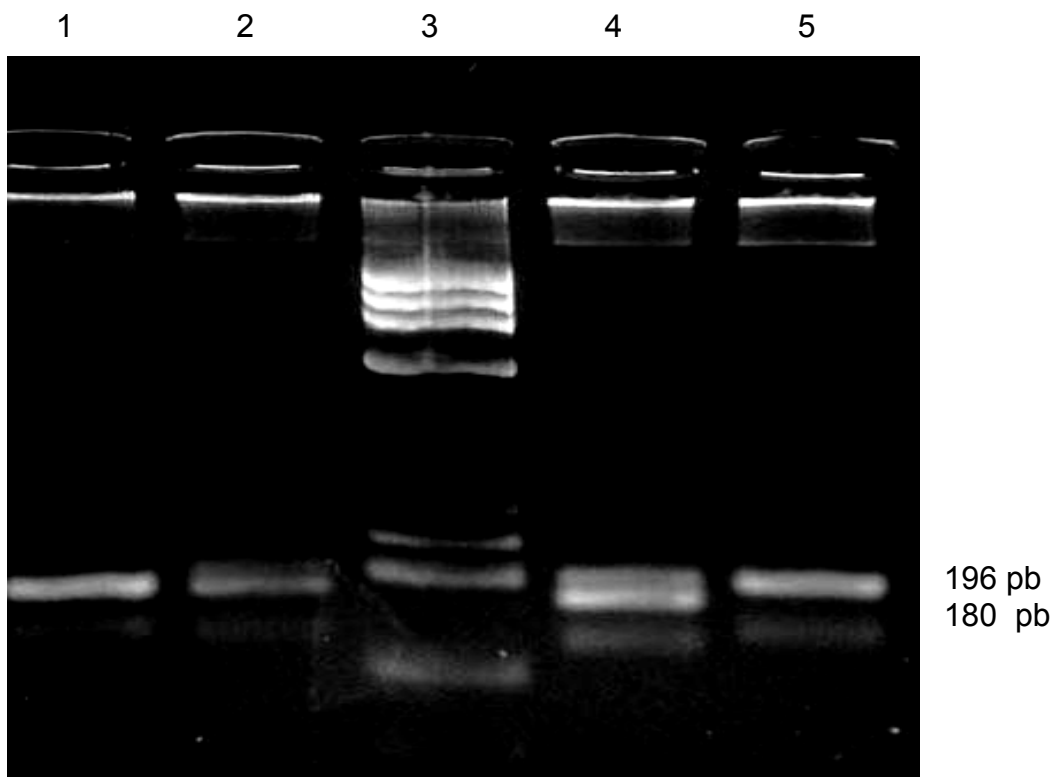
Fotografía de RFLP's del polimorfismo del codón 72 del gen p53



- Línea 1. Marcador de peso molecular 50 pb
- Línea 2. Muestra el genotipo Pro/Pro con 199 pb
- Línea 3. Muestra el genotipo Pro/Pro con 199 pb
- Línea 4. Muestra el genotipo Arg/Arg con 113 pb y 86 pb
- Línea 5. Muestra el genotipo Arg/Pro con 199 pb, 113 pb y 86 pb
- Línea 6. Muestra el genotipo Arg/Pro con 199 pb, 113 pb y 86 pb
- Línea 7. Muestra el genotipo Arg/Arg con 113 pb y 86 pb

## ANEXO 5

Fotografía del Polimorfismo del intrón 3. (Inserción de 16 pb)



Línea 1. Genotipo W/W con 180 pb

Línea 2. Genotipo W/M con 180pb y 196 pb (inserción de 16 pb)

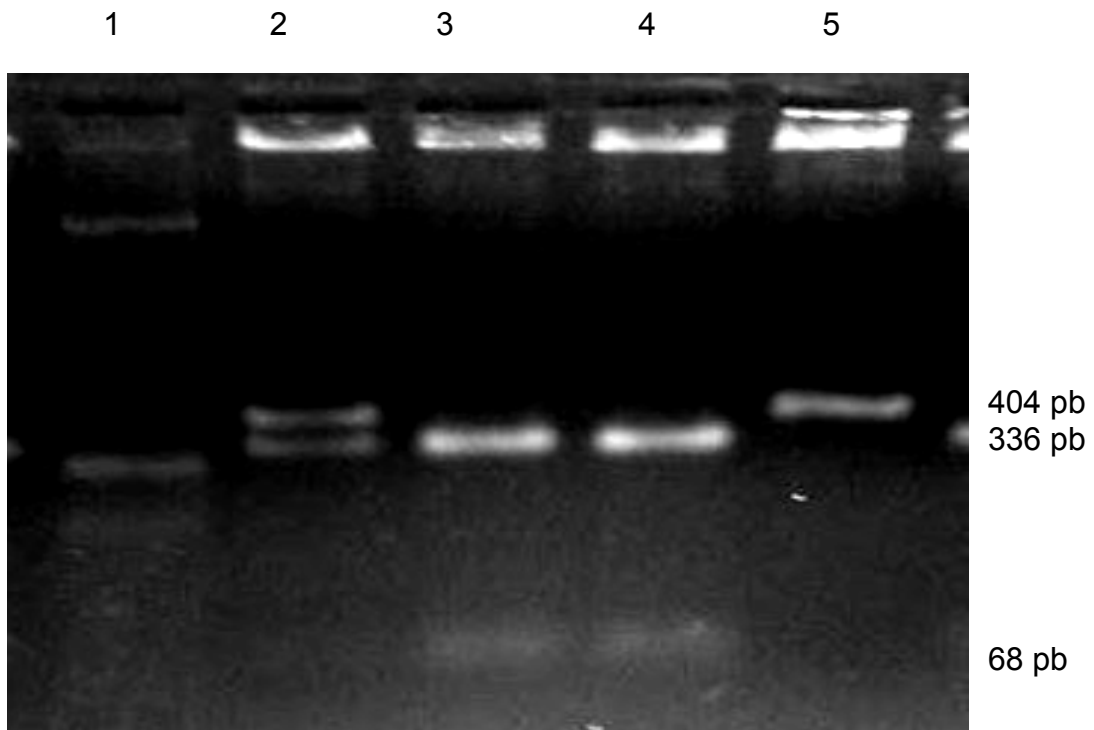
Línea 3. Marcado de peso molecular  $\varnothing$  174 DNA-Hae III

Línea 4. Genotipo W/M con 180pb y 196 pb (inserción de 16 pb)

Línea 5. Genotipo M/M 196 pb

## ANEXO 6

Fotografía de RFLP's del polimorfismo del intrón 6.



Línea 1. Marcado de peso molecular  $\varnothing$  174 DNA-Hae III

Línea 2. Genotipo W/M 404 pb, 336 pb y 68 pb

Línea 3. Genotipo W/W 336 pb y 68 pb

Línea 4. Genotipo W/W 336 pb y 68 pb

Línea 5. Genotipo M/M 404 pb