



Polimorfismos del gen P53 en cáncer mamario familiar en una población colombiana

YADIRA PINTO, Bact, MSc*, MILCIADES IBÁÑEZ, MD*, NELSON RANGEL, Biol, MSc*,
SANDRA RAMÍREZ, Biol, MSc, PhD*, WILLIAM SÁNCHEZ, MD**, DIEGO VANEGAS, MD**

Palabras clave: cáncer de mama, polimorfismo genético, genes p53, síndromes neoplásicos hereditarios.

Resumen

Introducción: El gen p53 codifica para una proteína de 53 KD con importante función reguladora en procesos celulares como la proliferación, la muerte celular y la preservación del material genético. Se le conoce como el “guardián del genoma” y frecuentemente se encuentra mutado en casi el 50% de los carcinomas humanos. Se han identificado variantes en su secuencia o polimorfismos genéticos (en diferentes regiones del gen), varios estudios han mostrado una asociación entre el riesgo de desarrollar cáncer mamario y la presencia de estas variantes. El objetivo del presente estudio de casos y controles fue analizar la asociación de los genotipos y las frecuencias alélicas de tres de los polimorfismos del gen p53 con el riesgo de desarrollar cáncer mamario familiar en una población colombiana. Los polimorfismos estudiados fueron: en el exón 4 del gen que corresponde al codón 72 de la proteína,

donde puede haber una arginina o una prolina (Arg72Pro); en el intrón 3 (duplicación de 16pb) y en el intrón 6, donde puede encontrarse una guanina o una adenina (G/A).

Materiales y métodos: Se analizaron 186 pacientes con cáncer mamario familiar y 186 individuos como controles, las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron por análisis de RFLPs 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% y con el programa estadístico SPSS 11,5.

Resultados: Las frecuencias genotípicas del codón 72 en la población estudiada fueron: 61,3% para Arg/Arg, 32,3% para Pro/Arg y 6,5% para Pro/Pro en los casos y 44,1, 45,7 y 10,2% respectivamente en los controles. La frecuencia alélica obtenida para arginina en los casos fue 77,4 y 67,0% en los controles ($P=0,004$). Se obtuvo un $OR=2,19$ con un IC de 95% (1,33-3,63). La frecuencia de los genotipos del intrón 6 fueron entre casos y controles W/W (75,3 frente a 82,3%), W/M (24,2 frente a 15,6%) y M/M (0,5 frente a 2,2%) mientras que los valores de las frecuencias genotípicas del intrón 3 en los casos fueron: 90,3% para W/W, 8,6% para W/M y 1,1% para M/M y en los controles 98,9% para W/W y 0,5% para W/M y M/M. Las frecuencias alélicas para el alelo silvestre (W) fueron en los casos 94,6% y en los controles 99,2%. Se obtuvo un $OR=17,86$ con un IC del 95% (2,25-141,84).

* Laboratorio de Biología celular y molecular. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia.

** Cirugía General, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia.

Fecha de recibo: Agosto 15 de 2006
Fecha de aprobación: Agosto 30 de 2006

Conclusiones: Los resultados obtenidos en la población colombiana estudiada muestran una importante asociación entre el genotipo Arg/Arg del codón 72 (dos veces más) y el genotipo W/M intrón 3 (18 veces más) del gen p53 con el riesgo de desarrollar cáncer mamario familiar.

Introducción

El cáncer de seno es una enfermedad común en países como el Reino Unido y Estados Unidos, donde su prevalencia es 1:12 y 1:8 mujeres, respectivamente (Dunning y cols., 1999). En Colombia, el cáncer mamario ocupa el tercer lugar en incidencia y es la tercera causa de muerte por cáncer después del gástrico y el de cuello uterino (Castro y Martínez, 2003). Del total de casos de cáncer mamario, el 10-15% son de origen familiar, de los cuales el 5% se puede asociar con mutaciones en genes de alta penetrancia y con un rol en la reparación del ADN, como BRCA1 y BRCA2. Adicionalmente, los individuos con antecedentes familiares de la enfermedad presentan un riesgo dos veces mayor de desarrollarla 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 con el desarrollo de la enfermedad, como los polimorfismos presentes en genes relacionados con cáncer mamario, como p53 (Coughlin y Piper, 1999; Khaliq y cols., 2000; Suspitsin y cols., 2003).

El gen p53 funciona como supresor de tumor y codifica para una proteína que tiene múltiples funciones, dentro de las que se destacan la regulación de apoptosis o muerte celular programada, el control del ciclo celular y la reparación del ADN, motivo por el cual se le denomina también “guardián del genoma” (Borresen-Dale, 2003; Arrowsmith, 1999). El p53 posee tres polimorfismos que han sido asociados con el cáncer de seno: en el codón 72 (Arg72Pro), en el intrón 6 (G/A) y en el intrón 3 se ha descrito una inserción de 16 pb (Buyru y cols., 2003; Coughlin y Piper, 1999; Dunning y cols., 1999; Khaliq y cols., 2000; Papadakis y cols., 2000; Sjalander y cols., 1996; Suspitsin y cols., 2003; Wang-Gohrke y cols., 2002). Sin embargo, muchos de estos estudios no tienen en cuenta el componente étnico, ya que las diferencias entre poblaciones puede determinar la influencia del legado genético en la carcinogénesis; por lo tanto, aunque hay estudios

estadísticamente significativos que describen la asociación existente entre los polimorfismos del gen p53 y el cáncer mamario, es importante analizar esta asociación en la población colombiana.

Según datos del Instituto Nacional de Salud, más del 60% de los casos de cáncer mamario que ingresan se encuentran en estadios clínicos tardíos (estadios III y IV) y tan sólo 4,8% lo hacen en estadios tempranos (*in situ* y I). Por tanto, es importante realizar investigaciones que conduzcan no sólo a la detección temprana de cáncer mamario sino además a la identificación de factores que contribuyan al desarrollo de la enfermedad, especialmente en la población más susceptible como lo es aquella con antecedentes familiares de cáncer de seno.

Materiales y métodos

Población de estudio

El estudio realizado es de tipo analítico de casos y controles. Un total de 186 pacientes con cáncer mamario heredofamiliar fueron contactados entre junio de 2004 y octubre de 2005. Igual número de personas sin cáncer (controles) fueron incorporadas al estudio en el mismo periodo, las cuales no tenían antecedentes de cualquier tipo de cáncer familiar en primer o segundo grado. El rango de edades para ambos grupos estuvo entre 23 y 83 años. Se diseñó una encuesta para obtener información sobre el estilo de vida, características sociodemográficas y antecedentes ginecoobstétricos. Todas las personas incluidas en el estudio diligenciaron el consentimiento informado, aprobado por los comités de ética de las diferentes instituciones participantes.

Extracción de ADN y genotipificación de los polimorfismos del gen p53

En tubos de 5 ml con EDTA se obtuvieron muestras de sangre de cada individuo participante, a partir de las cuales se extrajo el ADN mediante el método PROBE (Briceño, 1988). Con las muestras del ADN obtenido, mediante PCR, se amplificaron las regiones del gen p53 que contienen los tres polimorfismos estudiados.

Polimorfismo exón 4, codón 72 (Arg72Pro): Los primers utilizados para la evaluación de este polimorfismo

ubicado en el exón 4 del gen fueron tomados de Fan y cols., 2000 F. 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3' R. 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'); 100 – 300 ng de ADN fueron amplificados en un volumen final de 30 µl. La mezcla de PCR final contenía 3 µl de buffer de PCR (1X); 2,4 µl de MgCl₂ (2 µM); 1,5 µl de dNTPs (200 µM); 0,75 µl de cada primer (0,25 µM) y 0,4 U de Taq Polimerasa (Promega). Las condiciones de PCR fueron 95°C por 5 min, 30 ciclos a 95°C por 30 seg, 59°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, seguido por un paso de extensión final de 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron digeridos toda la noche a 60°C con 5U de la enzima BstUI (New England Biolabs) en volumen final de 15 µl. La presencia de un fragmento de 199 pb corresponde al genotipo Pro/Pro, mientras que la presencia de dos fragmentos de 113 pb y 86 pb corresponden al genotipo homocigoto Arg/Arg. Genotipos heterocigotos (Arg/Pro) contienen los tres fragmentos (figura 1a).

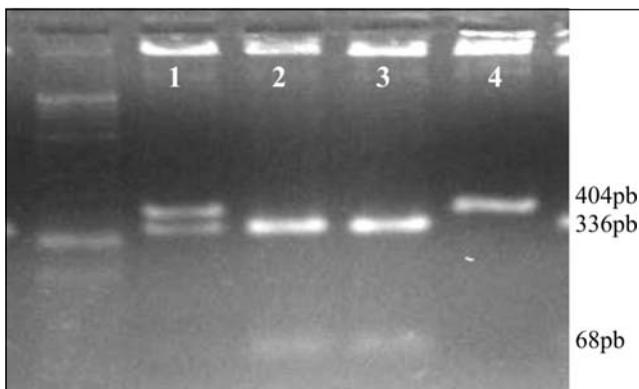
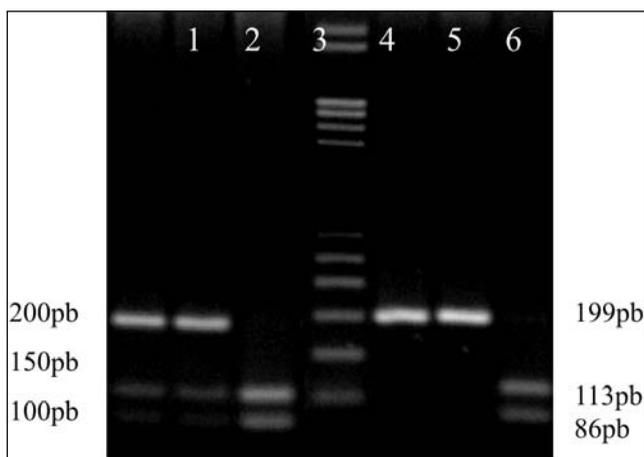


FIGURA 1. a) RFLPs del polimorfismo del codón 72: 1 y 2. Genotipo Pro/Pro; 3 y 6. Genotipo Arg/Arg; 4 y 5. Genotipo Arg/Pro. b) RFLPs del polimorfismo del intrón 6: 1. Genotipo W/M; 2 y 3. Genotipo W/W; 4. Genotipo M/M.

Polimorfismo intrón 6 (G/A): Los primers utilizados para evaluar el polimorfismo fueron F - 5' TGGCCATCTACAAGCAGTCA 3', R - 5' TTGCACATCTCATGGGGTTA 3' (Wu y cols., 2002). Las condiciones de PCR utilizadas fueran las mismas del polimorfismo Arg72Pro, excepto por la temperatura de anillaje que fue de 56°C. Los productos de PCR fueron digeridos toda la noche a 37°C con 10U de la enzima MspI (New England Biolabs) en volumen final de 15 µl. La presencia de un fragmento de 404 pb corresponde al genotipo A/A (homocigoto mutante, M/M), mientras que la presencia de dos fragmentos de 336 pb y 68 pb corresponde al genotipo G/G (homocigoto silvestre W/W). Genotipos heterocigotos, G/A (W/M) contenían los tres fragmentos (figura 1b).

Polimorfismo intrón 3: El polimorfismo se determinó por la presencia o ausencia de una inserción de 16 pb en los fragmentos analizados. Los primers utilizados fueron F - 5' TGGGACTGACTTTCTGCTCTT 3', R - 5' TCAAATCATCCATTGCTTGG 3' (Wu y cols., 2002). Las condiciones de PCR fueron las mismas del polimorfismo Arg72Pro, excepto por la temperatura de anillaje que fue de 57°C. La presencia de la inserción de 16 pb se detectó mediante la observación de una banda de 196 pb y la ausencia de la misma por la observación de una banda de 180 pb el gel de agarosa.

Todos los productos de PCR y los productos de la digestión enzimática para la evaluación de los polimorfismos del exón 4, intrón 6 e intrón 3 se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

La sistematización de los datos se hizo con la ayuda del paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5. La evaluación de los factores asociados con cáncer mamario hereditario se hizo mediante análisis bivariado, donde se utilizó ji-cuadrado 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 (IC) de 95%. 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 de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de seno

La población de estudio la conformaron 186 mujeres diagnosticadas con cáncer mamario (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. Las frecuencias de las características sociodemográficas de los casos y controles mostraron diferencias significativas en el estrato social ($P=0,000$) y el nivel educativo ($P=0,000$). Adicionalmente, se encontró asociación entre el comienzo de la menarquia ≤ 12 años ($P=0,006$), la edad del primer embarazo 26-29 años ($P=0,015$), el uso de terapia de remplazo hormonal ($P=0,008$) y el estado menopáusico ($P=0,047$) con el desarrollo de cáncer de seno familiar. Asimismo, el consumo de enlatados y embutidos reveló una relación significativa con el cáncer mamario, ($P=0,036$ y $0,029$), el OR indicó una probabilidad mayor de desarrollar cáncer de seno 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 respectivamente). Estos parámetros deben ser mejor evaluados en estudios posteriores, para establecer si la compra de enlatados y embutidos está relacionada con el estrato social. En nuestro estudio no se puede determinar; por tanto, a pesar de haber observado una asociación, estos resultados no son suficientes para realizar recomendaciones para la modificación o establecimiento de dietas.

Polimorfismos genéticos asociados con riesgo a cáncer de seno

La distribución del genotipo Arg/Arg fue significativamente superior en los casos (61,3%), com-

parado con los controles (44,1%) ($P=0,001$), mientras que el genotipo Pro/Arg fue significativamente inferior en los casos que en los controles ($P=0,011$). La frecuencia del alelo arginina (77,4%) mostró ser significativamente mayor en el grupo de los casos que en el grupo control (67,0%), suponiendo una clara asociación significativa del alelo arginina con el cáncer de seno hereditario (tabla 1) ($P=0,004$); dato corroborado con el OR indicando que pacientes que presentan el genotipo Arg/Arg tienen una probabilidad 2,2 veces mayor que los controles (OR=2,19 IC95% 1,33-3,63) de desarrollar cáncer de seno hereditario (tabla 2). Los dos grupos estudiados estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) casos ($\lambda^2=1,113$), controles ($\lambda^2=0,195$).

La distribución del genotipo del intrón 6 fue significativamente diferente entre los grupos de casos y controles, siendo más frecuente el genotipo W/W en el grupo de controles (82,3%) que en los casos (75,3%) ($P=0,055$). Asimismo, el genotipo W/M demostró diferencias significativas ($P=0,038$) entre el grupo de casos (24,2%) y controles (15,6%) indicando que pacientes que presentan el genotipo W/M tienen una probabilidad 1,5 veces mayor que los controles (OR=1,53 IC95% 0,89-2,82) de desarrollar cáncer de seno hereditario (tabla 3). La frecuencia del alelo mutante (M) (12,6%) fue estadísticamente igual en los grupos analizados (12,6% casos; 9,9% controles) (tabla 1) ($P=0,088$). La distribución genotípica de cada una de las poblaciones estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) casos ($\lambda^2=1,71$), controles ($\lambda^2=3,13$).

El genotipo del intrón 3 mostró diferencias significativas entre los grupos de casos y controles ($P=0,001$). En el análisis estadístico independientemente para cada uno de los genotipos, se encontró que existen diferencias significativas tanto para el genotipo W/W ($P=0,000$) como para el genotipo W/M ($P=0,000$) al comparar el grupo de casos con el de controles. De igual forma, la frecuencia del alelo mutante (M) (5,4%) fue significativamente mayor en el grupo de casos (0,08%) (tabla 1). El OR hallado mostró que el genotipo W/M es un probable factor de riesgo en el cáncer de seno hereditario, ya que los pacientes que lo portan tienen una mayor probabilidad (OR=18,24 IC95% 2,30-144,4) de desarrollar la enfermedad cuando fueron comparados con los controles (tabla 4). El análisis del ji-cuadrado (λ^2) para establecer si la población se encontraba en

equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) mostró que no lo estaban: para los casos $\lambda^2=4,44$ y para los controles $\lambda^2=81,99$).

TABLA 1
Frecuencias alélicas de los polimorfismos del gen p53 en casos y controles

	Casos	Controles	Valor -P
Alelos codón 72	N (%)	N (%)	0,001
Arg	288 (77,4)	249 (67,0)	
Pro	84 (22,6)	123 (33,0)	
Alelos intrón 6			0,246
W	325 (87,4)	335 (90,1)	
M	47 (12,6)	37 (9,9)	
Alelos intrón 3			0,003
W	352 (94,6)	369 (99,2)	
M	20 (5,4)	3 (0,08)	

TABLA 2
Asociación entre el genotipo del codón 72 de p53 y el riesgo de cáncer de seno

Genotipos codón 72	Cáncer de seno n= 186 (%)	Controles n=186 (%)	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
Arg/Arg	114 (61,3)	82 (44,1)	1,97 (1,27 -3,05)	2,19 (1,33-3,63)
Arg/Pro	60 (32,3)	85 (45,7)	1 referencia	1 referencia
Pro/Pro	12 (6,5)	19 (10,2)	0,89 (0,40-1,98)	1,18 (0,48-2,88)

TABLA 3
Asociación entre el genotipo del intrón 6 de p53 y el riesgo de cáncer de seno

Genotipos intrón 6	Cáncer de seno n= 186 (%)	Controles n=186 (%)	OR (IC95%)	OR Ajustado* (IC95%)
W/W	140 (75,3)	153 (82,3)	1 referencia	1 referencia
W/M	45 (24,2)	29 (15,6)	1,7 (1,08-2,85)	1,53 (0,89-2,82)
M/M	1 (0,5)	4 (2,2)	0,27 (0,03-2,47)	0,36 (0,03-3,81)

TABLA 4
Asociación entre el genotipo del intrón 3 del gen p53 y el riesgo de cáncer de seno

Genotipos intrón 3	Cáncer de seno n= 186 (%)	Controles n=186 (%)	OR (IC95%)	OR ajustado* (IC95%)
W/W	168 (90,3)	184 (98,9)	1 referencia	1 referencia
W/M	16 (8,6)	1 (0,5)	17,53 (2,29-133,57)	18,24 (2,30-144,4)
M/M	2 (1,1)	1 (0,5)	2,19 (0,19-24,38)	No aplica

Discusión

Los polimorfismos del gen p53 han sido asociados tanto con cáncer mamario, como con otros tipos de cáncer (Birgander y cols., 1995; Sjalander y cols., 1995-1996; Wu y cols., 2002; Boltze y cols., 2002; Mabrouk y cols., 2003; Niwa y cols., 2004); en este estudio se analizó la presencia de tres polimorfismos del gen P53: el que se encuentra en el exón 4 ubicado más exactamente en el codón 72, otro en el intrón 3 y en el intrón 6.

La literatura registra diferentes opiniones acerca de cuál es el genotipo del polimorfismo del codón 72 asociado con el desarrollo de cáncer mamario. Algunos autores muestran que el genotipo Pro/Pro está relacionado con la enfermedad, otros dicen que es el genotipo Pro/Arg (Bonafe y cols., 2003; Dunning y cols., 1999; Huang y cols., 2003; Wang-Gohrke y cols., 2002). Otros reportan que es el genotipo Arg/Arg (Buyru y cols., 2003; Ohayon y cols., 2005; Papadakis y cols., 2000).

En el presente estudio se halló una asociación significativa con el polimorfismo del codón 72 en los casos que portan el genotipo Arg/Arg; esto es consistente con el estudio de Ohayon y cols. realizado en judías askenazi y no askenazi con antecedentes familiares de cáncer mamario, en quienes encontraron que individuos homocigotos para el alelo arginina tienen un riesgo dos veces más alto de desarrollar cáncer mamario que los heterocigotos u homocigotos para el alelo prolina (OR= 2,18 IC95% (1,08-4,39) (Ohayon y cols., 2005). El aminoácido arginina se encuentra ubicado en la región hidrofóbica de la proteína codificada por el gen p53, contribuyendo en la determinación de su conformación

espacial, la cual puede afectar la unión al ADN y su actividad transcripcional (Greenblatt y cols., 1994; Wang y cols., 1999); esto puede alterar la función de la proteína 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. Adicionalmente, se sabe que los tumores que poseen células cuyo genotipo es Pro/Pro tienen un crecimiento más lento y son de un tamaño más pequeño que aquellos constituidos por células portadoras del genotipo Arg/Arg (Matlashewski y cols., 1987). Asimismo, la proteína que porta en su codón 72 la prolina parece inducir la transcripción de manera más eficientemente que aquella que porta en el mismo codón una arginina. La variante Arg72 parece actuar como supresora de la transformación celular e induce la apoptosis de manera más eficiente que Pro72 (Dumont y cols., 2003; Thomas y cols., 1999). Aunque ambas formas producen cambios tumorigénicos, el genotipo Arg/Arg es más oncogénico que Pro/Pro (Papadakis y cols., 2000).

Las frecuencias alélicas halladas en este estudio para arginina (77,4% casos; 67,0% controles) y prolina (22,6% casos; 33,0% controles) fueron similares a las encontradas por Ohayon y cols. en la población askenazi (Ohayon y cols., 2005). Se ha visto que las frecuencias alélicas varían de una población a otra; esto se refleja en otros estudios realizados en cáncer de seno no heredofamiliares en las poblaciones japonesa, turca, rusa, jordana y suiza (Papadakis y cols., 2000; Buyru y cols., 2003; Huang y cols., 2003; Mahasneh y Abdel-Hafiz, 2004; Noma y cols., 2004; Suspitsin y cols., 2003; Sjalander y cols., 1996). Sin embargo, en un estudio realizado en Noruega en cáncer de seno no familiar las frecuencias alélicas para los alelos arginina y prolina obtenidos para los casos (24% prolina; 71% arginina) fueron muy similares a las obtenidas en este estudio (Langerod y cols., 2002). Los resultados obtenidos en este estudio para las frecuencias alélicas de los casos y los controles están más cercanos a los hallados en la población judía askenazi; sin embargo, la influencia étnica de esa población es muy baja en la nuestra, ya que la población colombiana es mestiza conformada por ancestros españoles, amerindios y africanos.

En el presente estudio no se encontró asociación del polimorfismo del codón 72 con las características clinicopatológicas, la nuliparidad y el índice de masa corporal como lo han demostrado otros estudios realiza-

dos en cáncer mamario esporádico (Noma y cols., 2004; Papadakis y cols., 2000); sin embargo, en el estudio de Han y cols., se encontró que el alelo prolina estaba asociado con características tales como nódulos linfáticos negativos y por consiguiente con la sobrevida del paciente (Han y cols., 2004). El inicio de la menarquia, la edad del primer embarazo y el uso de terapia de remplazo hormonal, al igual que lo mencionado en la literatura, se asociaron con aumento del riesgo de desarrollar cáncer mamario en la población colombiana estudiada (Zografos y cols., 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 mamario en la posmenopausia de la población danesa. En el estudio realizado en Dinamarca el consumo del alcohol está asociado más fuertemente con el cáncer lobular que con el cáncer ductal y aumenta el riesgo en tumores con células positivas para la presencia de receptores hormonales ER+/PR+, pero no en tumores ER+/PR- o ER-/PR+; en el estudio efectuado por nosotros no se observó tal asociación. (Zografos y cols., 2004). No se ha dilucidado totalmente si el hábito de fumar está asociado con el desarrollo de cáncer mamario; sin embargo, algunos estudios indican que este hábito tiene poco o ningún efecto sobre el riesgo de desarrollo de cáncer mamario. Por otro lado, la cafeína tampoco parece ejercer efecto alguno en el desarrollo de la enfermedad; los resultados obtenidos en el presente estudio están en la misma dirección de los estudios publicados con anterioridad (Hamajima y cols., 2002; Zografos y cols., 2004).

Como lo reporta la literatura, en nuestro estudio el estrato social, el nivel de educación, el consumo de embutidos, el consumo de embutidos y el uso de terapia hormonal también fueron factores relacionados con el riesgo de desarrollar cáncer mamario (Hamajima y cols., 2002; Zografos y cols., 2004; Dano y cols., 2003; Barbone y cols., 1996). De igual manera, estos factores mostraron una fuerte asociación del genotipo Arg/Arg en los individuos con cáncer de seno heredofamiliar (OR=1,75 IC95% 1,04-2,92); esta información, aunque se presenta por primera vez como factores de riesgo en una población colombiana con cáncer de seno heredofamiliar, debe ser ampliada y estudiada en más detalle para analizar específicamente estos factores. A pesar de haber

encontrado una asociación positiva entre los factores mencionados y la enfermedad, nuestros datos no son suficientes para llegar a conclusiones que permitan hacer recomendaciones orientadas a cambiar los hábitos alimenticios.

En cuanto a los polimorfismos de los intrones 3 y 6 del gen p53 se ha mostrado en diferentes estudios que son los genotipos W/M y M/M los asociados con el riesgo de desarrollo de cáncer mamario. (Dunning y cols., 1999; Khaliq y cols., 2000; Sjalander y cols., 1996). Para el intrón 3, en el estudio de Wan-Gohrke y cols., se observó una asociación positiva y significativa estadísticamente para el genotipo W/M del intrón 3 (OR= 1,3 IC95% 1,0-1,7), pero no para el intrón 6 (OR ajustado por el número de embarazos, 1,2 IC95% 0,9-1,6) (Wang-Gohrke y cols., 2002). En el presente estudio los resultados 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 existe un riesgo cinco veces mayor para desarrollar cáncer de seno heredo-familiar si se tiene el genotipo W/M para el intrón 6 y de 18 mayor cuando se tiene este genotipo para el intrón 3. Para este último genotipo es conveniente en estudios posteriores hacer los ajustes pertinentes para tener una población que esté en equilibrio de Hardy-Weinberg para establecer con mayor confiabilidad el riesgo relativo. El genotipo M/M no mostró asociación con cáncer para ninguno de los dos intrones, contrariamente a lo indicado en la literatura (Barbone y cols., 1996; Dunning y cols., 1999; Sjalander y cols., 1996; Suspitsin y cols., 2003).

Las frecuencias alélicas para el intrón 3 en los casos de cáncer de seno heredo-familiar 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% en otros estudios (Khaliq y cols., 2000; Mahasneh y Abdel-Hafiz, 2004; Sjalander y cols., 1996; Suspitsin y cols., 2003; Wang-Gohrke y cols., 2002). Estos estudios fueron realizados en individuos con cáncer mamario esporádico, por lo tanto la información referida de las frecuencias alélicas del presente trabajo cobra mayor valor por tratarse exclusivamente de cáncer de seno heredo-familiar. 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 como se refiere 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 y cols., 2000; Mahasneh y Abdel-Hafiz, 2004; Sjalander y cols., 1996; Suspitsin y cols., 2003; Wang-Gohrke y cols., 2002). A partir del análisis de las frecuencias alélicas, se obtuvo que el genotipo W/M del intrón 3 está presente en 16 casos (8,6%) mientras que en los controles se encontró en un solo caso (0,5%). Esto podría indicar que el riesgo de desarrollar cáncer mamario con antecedentes familiares 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 encontrados en otros estudios de cáncer de seno no heredo-familiar 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 y cols., 2000; Mahasneh y Abdel-Hafiz, 2004; Sjalander y cols., 1996; Suspitsin y cols., 2003; Wang-Gohrke y cols., 2002). Esto muestra que no hay diferencia entre las frecuencias alélicas W y M del intrón 6 entre los casos y controles de los estudios citados que han sido realizados en individuos con cáncer de seno familiar y esporádico. Para el genotipo heterocigoto W/M, en el estudio realizado por Wang-Gohrke al comparar el polimorfismo del intrón 6 en mujeres con antecedentes familiares en primer grado halló una asociación aunque no significativa (OR=3,8 IC95% [0,8-19,3]) de este genotipo con la enfermedad (Wang-Gohrke y cols., 2002). En nuestro estudio los resultados fueron similares con un OR=1,53 IC95% (0,89-2,82), indicando que para la población colombiana el genotipo heterocigoto tiene asociación aunque no significativa con el riesgo de desarrollar cáncer de seno heredo-familiar. El análisis de la asociación entre las características clinicopatológicas con los diferentes genotipos tanto del intrón 3 como del intrón 6 no mostró diferencias significativas.

Dado que en Colombia no se ha realizado ningún estudio en cáncer de seno heredo-familiar que analice los polimorfismos del gen p53 como factores de riesgo asociados con este tipo de enfermedad, el análisis y la

información obtenida de los polimorfismos del codón 72 e intrón 3 y 6, se convierte en el primer registro de la relación de la frecuencia de dichas variantes en pacientes con cáncer de seno heredofamiliar colombianos.

Agradecimientos

A los doctores José Joaquín Caicedo, MD, José Fernando Robledo, MD, cirujanos de la Unidad Oncológica de la Clínica del Country; Fabio Torres, MD, cirujano de la Fundación Santa Fe de Bogotá; Alfredo Ballén, MD,

cirujano del Hospital Militar Central y Gabriel Bernal, MD, de la Clínica San Pedro Claver por su apoyo en la obtención de las pacientes incluidas en el estudio. Igualmente a los doctores Ignacio Briceño, MD, PhD y Diana Torres, PhD, de la Pontificia Universidad Javeriana por su ayuda en el planteamiento inicial del estudio y su desarrollo y a la doctora Victoria Villegas, MSc, por su colaboración en el desarrollo experimental. Asimismo, a la Fundación ONES por facilitar el contacto con los pacientes y a todas y cada una de estas personas quienes amablemente participaron y colaboraron en el desarrollo de la investigación.

Polymorphism of the P53 gen in familial breast cancer in a colombian population study group

Abstract

Introduction: Gen p53 codifies a 53 KD protein, an important regulator of cell processes such as proliferation, cellular death (apoptosis), and the preservation of the genetic material. It is known as the “guardian of the genoma” and is frequently encountered in a mutated stated in as much as 50% of the human carcinomas. Variants in its sequence, or genetic polymorphism (in various regions of the gen), have been identified, and diverse studies have shown an association of the risk of developing breast cancer with the presence of such variants. The purpose of this cases-controls study was to analyze the association of the genotypes and the allelic frequencies of three of the polymorphisms of gen p53 with the risk of developing familial mammary cancer in a population group in Colombia. Polymorphisms studied were: in the gen’s exon 4, corresponding to codon 72 of the protein, where there may be an aginine or a proline (Arg72Pro); in the intron 3 (duplication of 16pb); and in the intron 6, where there could be found a guanine or an adenine (G/A).

Materials and methods: 186 patients with familial breast cancer were studied, with 186 subjects as controls, determining the allelic and genotype frequencies by RFLPS analyses and measurement the force of association by the Odds Ratio (OR), with a significance of the association utilizing a Confidence Interval (CI) of 95% and the statistical program SPSS 11.5.

Results. The genotype frequencies of codon 72 in the study population were: 61.3% for Arg/Arg, 32.3% for Pro/Arg, and 6.5% for Pro/Pro in the cases studied, and 44.1%, 45.7% and 10.2%, respectively, for the control subjects. The allelic frequency obtained for arginine in the cases studied were 77.4%, and 67.0% in the control subjects (P=0.004). An OR=2.19 with a 95% CI (1.33-3.63) was observed. The frequency of the genotypes of intron 6 were between the cases and the W/W controls (75.3% versus 82.3%), W/M (24.2% versus 15.6%), and M/M (0.5% versus 2.2%), while the values of the genotype intron 3 frequencies in the cases were: 90.3% for W/W, 8.6% for W/M, and 1.1% for M/M, and in the controls: 98.9% for W/W and 0.5% for W/M and M/M. The allelic frequencies for the silvester allele (W) were 94.6% in the cases and 99.2% in the controls. An OR=17.86 with a 95% CI (2.25-141.84) was achieved.

Conclusions: Our results in the Colombian population group studied show an important association of the Arg/Arg genotype of codon 72 (2 x) and the W/M intron 3 genotype (18 x) of gen p53 with the risk of developing familial mammary cancer.

Key words: breast neoplasms, genetic polymorphism, gene p53, hereditary neoplastic syndromes.

Referencias

- ARROWSMITH CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ* 1999; 6 12: 1169-1173.
- BARBONE F, FILIBERTI R, FRANCESCHI S, TALAMINI R, CONTI E, MONTELLA M, LA VECCHIA C. Socioeconomic status, migration and the risk of breast cancer in Italy. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 479-487.
- BIRGANDER R, SJALANDER A, RANNUG A, ALEXANDRIE AK, SUNDBERG MI, SEIDEGARD J, TORNLING G, *et al.* P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. *Carcinogenesis*, 1995; 16: 2233-2236.
- BOLTZE C, ROESSNER A, LANDT O, SZIBOR R, PETERS B, SCHNEIDER-STOCK R. Homozygous proline at codón 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 21: 1151-1154.
- BONAFE M, CECCARELLI C, FARABEGOLI F, SANTINI D, TAFFURELLI M, BARBI C, MARZI E, *et al.* 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* 2003; 9: 4860-4864.
- BORRESEN-DALE AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 2003; 21: 292-300.
- BRICEÑO I. Histocompatibility antigens and mitochondrial genome serological and molecular genetics studies of amerindian in Colombia. New Castle, New Castle, 1988.
- BUYRU N, TIGLI H, DALAY N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep* 2003; 10: 711-714.
- CASTRO MIGUEL ÁNGEL PM, MARTÍNEZ T. Mortalidad en el Instituto Nacional de Cancerología, Colombia, 2002. *Rev Col Cancerol* 2003; 20-32.
- COUGHLIN SS, PIPER M. Genetic polymorphisms and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 1023-1032.
- DANO H, ANDERSEN O, EWERTZ M, PETERSEN JH, LYNGE E. Socioeconomic status and breast cancer in Denmark. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 218-224.
- DUNNING AM, HEALEY CS, PHAROAH PD, TEARE MD, PONDER BA, EASTON DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 843-854.
- FAN R, WU MT, MILLER D, WAIN JC, KELSEY KT, WIENCKE JK, CHRISTIANI DC. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1037-1042.
- GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
- HAMAJIMA N, HIROSE K, TAJIMA K, ROHAN T, CALLE EE, HEATH CW, JR, COATES RJ, *et al.* 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: 1234-1245.
- HAN W, KANG D, PARK IA, KIM SW, BAE JY, CHUNG KW, NOH DY. Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (1 Pt 1): 124-130.
- HUANG XE, HAMAJIMA N, KATSUDA N, MATSUO K, HIROSE K, MIZUTANI M, IWATA H, *et al.* Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer. *Breast Cancer* 2003; 10: 307-311.
- KHALIQ S, HAMEED A, KHALIQ T, AYUB Q, QAMAR R, MOHYUDDIN A, MAZHAR K, *et al.* P53 mutations, polymorphisms, and haplotypes in Pakistani ethnic groups and breast cancer patients. *Genet Test* 2000; 4: 23-29.
- LANE DP, CRAWFORD LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263.
- LANGEROD A, BUKHOLM IR, BREGARD A, LONNING PE, ANDERSEN TI, ROGNUM TO, MELING GI, *et al.* The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1684-1688.
- MABROUK I, BACCOUCHE S, EL-ABED R, MOKDAD-GARGOURI R, MOSBAH A, SAID S, DAUD J, *et al.* No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 764-770.
- MAHASNEH AA, ABDEL-HAFIZ SS. Polymorphism of p53 gene in Jordanian population and possible associations with breast cancer and lung adenocarcinoma. *Saudi Med J* 2004; 25: 1568-1573.
- MATLASHIEWSKI GJ, TUCK S, PIM D, LAMB P, SCHNEIDER J, CRAWFORD LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 961-963.
- NIWA Y, HAMAJIMA N, ATSUTA Y, YAMAMOTO K, TAMAKOSHI A, SAITO T, HIROSE K, *et al.* Genetic polymorphisms of p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p53 Arg72Pro and the risk of cervical cancer in Japanese. *Cancer Lett* 2004; 205: 55-60.
- NOMA C, MIYOSHI Y, TAGUCHI T, TAMAKI Y, NOGUCHI S. Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Lett* 2004; 210: 197-203.
- OHAYON T, GERSHONI-BARUCH R, PAPA MZ, DISTELMAN MENACHEM T, EISENBERG BARZILAI S, FRIEDMAN E. The R72P P53 mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *Br J Cancer* 2005; 92: 1144-1148.
- PAPADAKIS EN, DOKIANAKIS DN, SPANDIDOS DA. p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3: 389-392.
- SJALANDER A, BIRGANDER R, ATHLIN L, STENLING R, RUTEGARD J, BECKMAN L, BECKMAN G. P53 germ line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1461-1464.
- SJALANDER A, BIRGANDER R, HALLMANS G, CAJANDER S, LENNER P, ATHLIN L, BECKMAN G, *et al.* p53 polymorphisms and haplotypes in breast cancer. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1313-1316.

- STOREY A, THOMAS M, KALITA A, HARWOOD C, GARDIOL D, MANTOVANI F, BREUER J, *et al.* Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-234.
- SUSPITSIN EN, BUSLOV KG, GRIGORIEV MY, ISHUTKINA JG, ULIBINA JM, GORODINSKAYA VM, POZHARISSKI KM, *et al.* Evidence against involvement of p53 polymorphism in breast cancer predisposition. *Int J Cancer* 2003; 103: 431-433.
- THOMAS M, KALITA A, LABRECQUE S, PIM D, BANKS L, MATLASHEWSKI G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1092-1100.
- WANG-GOHRKE S, BECHER H, KREIENBERG R, RUNNEBAUM IB, CHANG-CLAUDE J. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 269-272.
- WANG XW. Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res* 1999; 19: 4759-4771.
- WANG YC, CHEN CY, CHEN SK, CHANG YY, LIN P. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 129-134.
- WANG YC, LEE HS, CHEN SK, CHANG YY, CHEN CY. Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur J Cancer* 1999; 35: 226-230.
- WU X, ZHAO, H, AMOS CI, SHETE S, MAKAN N, HONG WK, KADLUBAR FF, SPITZ MR. p53 Genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 681-690.
- ZOGRAFOS GC, PANOU M, PANOU N. Common risk factors of breast and ovarian cancer: recent view. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14: 721-740.

Correspondencia:

SANDRA ROCÍO RAMÍREZ CLAVIJO, MSc, PhD
Correo electrónico: sramire@urosario.edu.co
Bogotá, D.C. Colombia