

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Estudio de asociación entre los alelos de baja penetrancia  
rs3803662 (TOX3), rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24) y  
aumento del riesgo para cáncer de mama, en población  
Chilena”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en  
Bioquímica Clínica Aplicada por:

***ISABEL PATRICIA ELEMATORE  
CARRASCO***

DIRECTOR DE TESIS  
Dra. Lilian Jara Sosa

Santiago-Chile  
ENERO 2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

**ISABEL PATRICIA ELEMATORE CARRASCO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: en Bioquímica Clínica Aplicada, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

**Dra. Lilian Jara Sosa**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Carmen Romero Osses**

---

**Dr. Julio Tapia Pineda**

---

**Dr. Sergio Lobos Camus**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, y muy especialmente, quiero agradecer a la Dra. Lilian Jara, por permitirme desarrollar este trabajo de tesis en su laboratorio. Por todos los conocimientos entregados, por su constante apoyo, por su confianza y por esas largas conversaciones que iban más allá de lo estrictamente académico y que me dejaron muchas enseñanzas.

Al Dr. Patricio González, por su gran apoyo y orientación (principalmente en la parte experimental y análisis estadísticos), por su buena disposición para responder todas mis dudas y ayudarme siempre que lo necesité.

A Lorena Seccia por su buena disposición para orientarme en el laboratorio, y por su ayuda siempre que la necesité (principalmente con los datos de las muestras).

A mis compañeros del laboratorio de Genética Humana, Yessica, Cristián, Gaby, y especialmente a Kerube, por la “buena onda” y palabras de apoyo.

A mis compañeros de trabajo, especialmente a Blanca, Rolando, Sra. Celia e Irene, por sus palabras de apoyo y ayuda con los “cambios de turno” para poder asistir a clases.

Y por supuesto, un especial agradecimiento a mis padres y abuelita por su incondicional apoyo siempre...

## **ABREVIATURAS**

<b>AP</b>	: Proporción atribuible
<b>CM</b>	: Cáncer de mama
<b>CO</b>	: Cáncer de ovario
<b>CONAC</b>	: Corporación nacional del cáncer
<b>DNA</b>	: Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	: Dinucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	: Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>ER</b>	: Receptor de estrógeno
<b>GWAS</b>	: Estudio de asociación de genoma extenso
<b>IC</b>	: Intervalo de confianza
<b>OR</b>	: Odd ratio
<b>PCR</b>	: Reacción de la polimerasa en cadena
<b>RNA</b>	: Ácido ribonucleico
<b>SNP</b>	: Polimorfismo de nucleótido simple

## ÍNDICE.

<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b> .....	13
- Aspectos genéticos del CM.....	13
- Panorama actual de susceptibilidad al cáncer de mama.....	14
- Gen <i>TOX3</i> .....	17
- Región cromosómica 2q35.....	19
- Región cromosómica 8q24.....	20
<b>II.- HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>III.- OBJETIVOS</b> .....	22
1.- Objetivos generales.....	22
2. - Objetivos específicos.....	22
<b>IV.- METODOLOGÍA</b> .....	23
1.- Grupos muestrales.....	23
1.1.- Definición de grupos muestrales.....	23
1.2.- Obtención de los grupos muestrales.....	24
1.3.- Criterios de exclusión.....	24
2.- Métodos moleculares.....	25
2.1.- Extracción de DNA genómico.....	25
2.2.- Genotipificación de los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ), rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24).....	25
3.- Análisis estadístico de los datos.....	26
<b>V.- RESULTADOS</b> .....	29
1.- Características de los casos con CM.....	29
2.- Genotipificación de los SNPs.....	29
3.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3803662 ( <i>TOX3</i> ).....	33
4.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13387042 (2q35).....	35
5.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13281615 (8q24).....	37
6.- Análisis de genotipos combinados para el rs3803662 ( <i>TOX 3</i> ) y	

rs13387042 (2q35).....	40
7.- Análisis de genotipos combinados para el rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13281615 (8q24).....	46
8.- Análisis de genotipos combinados para el rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24).....	51
<b>VI.- DISCUSIÓN</b> .....	56
- Asociación del SNP rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) con CM.....	56
- Asociación del SNP rs13387042 (2q35) con CM.....	58
- Asociación del SNP rs13281615 (8q24) con CM.....	60
- Análisis de genotipos combinados:.....	61
- Genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13387042 (2q35).....	62
- Genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13281615 (8q24).....	63
- Genotipos combinados entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24).....	64
<b>VII.- CONCLUSIONES</b> .....	65
<b>VIII.- ANEXOS</b> .....	68
- Anexo 1: Encuesta casos con CM .....	68
- Anexo 2: Consentimiento informado casos con CM.....	78
- Anexo 3: Encuesta controles.....	82
- Anexo 4: Consentimiento informado controles.....	85
<b>IX.- REFERENCIAS</b> .....	89

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Distribución de casos, según criterios de inclusión.....	30
<b>Tabla 2.</b> Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3803662 ( <i>TOX3</i> ).....	34
<b>Tabla 3.</b> Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13387042 (2q35).....	36
<b>Tabla 4.</b> Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13281615 (8q24).....	39
<b>Tabla 5.</b> Distribución de la frecuencia de genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13387042 (2q35).....	41
<b>Tabla 6.</b> Efecto aditivo de los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13387042 (2q35) sobre el riesgo para CM.....	44
<b>Tabla 7.</b> Análisis de interacción aditiva y multiplicativa entre los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13377042 (2q35).....	45
<b>Tabla 8.</b> Distribución de la frecuencia de genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13281615 (8q24).....	47
<b>Tabla 9.</b> Efecto aditivo de los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13281615 (8q24) sobre el riesgo para CM.....	49
<b>Tabla 10.</b> Análisis de interacción aditiva y multiplicativa entre los SNPs rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) y rs13281615 (8q24).....	50
<b>Tabla 11.</b> Distribución de la frecuencia de genotipos combinados entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24).....	52
<b>Tabla 12.</b> Efecto aditivo de los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24) sobre el riesgo para CM.....	54
<b>Tabla 13.</b> Análisis de interacción aditiva y multiplicativa entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24).....	55

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diseño del estudio.....	28
<b>Figura 2.</b> Curvas de fluorescencia para los distintos genotipos del SNP rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) .....	31
<b>Figura 3.</b> Discriminación alélica para el SNP rs3803662 ( <i>TOX3</i> ).....	32



## RESUMEN.

A nivel mundial, el cáncer de mama (CM), es el más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, representando el 23% del total de casos nuevos de cáncer y el 14% del total de muertes por cáncer. En Chile, también constituye la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, y la mortalidad por esta causa, ha ido en aumento en las últimas dos décadas.

Aún cuando la etiología exacta del CM es desconocida, existen múltiples factores de riesgo asociados al desarrollo de esta patología, siendo la historia familiar de CM el más importante. Actualmente se ha establecido que la predisposición heredada al CM, involucra la participación de 3 categorías de alelos de susceptibilidad, de acuerdo al perfil de riesgo que ellos confieren: 1.- Genes de alta penetrancia, 2.- Genes de moderada penetrancia y 3.- Alelos de baja penetrancia. Estos últimos, han sido objeto de gran interés por distintos grupos investigadores. Se trata de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) que confieren bajo riesgo para el desarrollo de CM y que son relativamente comunes en la población, razón por la cual podrían explicar hasta el 22% de los casos de CM que no presentan mutaciones en los genes de alta y moderada penetrancia conocidos en la actualidad. Los SNPs rs3803662 (*TOX3*), rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24) se han identificado como alelos de susceptibilidad de baja penetrancia para CM en diversos trabajos realizados principalmente en población Europea y Asiática, estableciéndose como alelo de riesgo a aquel que presenta menor frecuencia poblacional y describiéndose aumentos de riesgo para el desarrollo de la enfermedad que varían entre 1.05 – 1.65 veces.

En el presente trabajo, mediante un estudio caso-control, se analizó la asociación entre estos SNPs y riesgo para CM familiar en población Chilena. Para esto, se realizó genotipificación de los SNPs rs3803662, rs13387042 y rs13281615 en 347 casos de CM y en 801 controles. Los casos de CM, se dividieron según historia familiar de CM (215 casos con CM familiar (subgrupo A), y 132 casos sin antecedentes familiares de CM, y con edad de diagnóstico temprano ( $\leq 50$  años) (subgrupo B)). Se establecieron las frecuencias alélicas y genotípicas de cada polimorfismo, y se analizó su asociación con aumento del riesgo para CM, aplicando software estadísticos. Además se realizaron genotipos combinados entre los distintos SNPs en estudio y se analizó el efecto de estos, sobre el riesgo para CM.

Los resultados obtenidos, mostraron que el alelo T del SNP rs3803662 y el alelo A del SNP rs13387042, se asociaron significativamente con aumento del riesgo para CM (OR: 1.44; IC95%: [1.20-1.74];  $p < 0.0001$  y OR: 1.34; IC95%: [1.11-1.61];  $p = 0.0009$ , respectivamente). Además, se encontró que el alelo G del SNP rs13281615 (8q24), descrito en la literatura como el alelo de riesgo para CM, fue el alelo de mayor frecuencia en población Chilena. Sin embargo, este alelo no se asoció con aumento del riesgo para CM.

En relación a los genotipos combinados, entre los SNPs rs3803662 y rs13387042, rs3803662 y rs13281615, y rs13387042 y rs13281615, se observó que el riesgo para CM aumentó a medida que aumentaba el número de alelos de riesgo. Además, en el subgrupo B, el genotipo combinado doble homocigoto de riesgo entre los SNPs rs3803662 y rs13387042 (T/T-A/A), presentó interacción génica en escala aditiva.

Como conclusión de este trabajo se postula que, en población Chilena, el alelo T del SNP rs3803662 y el alelo A del SNP rs13387042, son alelos de susceptibilidad de baja penetrancia para el desarrollo de CM; que el riesgo que estos confieren, aumenta a medida que aumenta el número de alelos de riesgo; y que en mujeres jóvenes ( $\leq 50$  años), sin antecedentes familiares de CM, existe interacción génica entre los SNP rs3803662 y rs13387042.

## ABSTRACT.

Worldwide, breast cancer (BC) is the most common and the leading cause of death by cancer in women, accounting for 23% of all new cancer cases and 14% of all cancer deaths. In Chile, it is also the leading cause of death by cancer in women, and mortality from this cause, has been increasing in the last two decades.

Although the exact etiology of BC is unknown, there are many risk factors associated with the development of this disease, family history of BC being the most important. It has now been established that the inherited predisposition to BC, involves the participation of three categories of susceptibility genes, according to the risk profile they give: 1.- High penetrance genes, 2.- Moderate penetrance genes and 3.- Low-penetrance alleles. The latter have been the subject of great interest in various research groups. It relates to single nucleotide polymorphisms (SNPs) that confer low risk for the development of BC and are relatively common in the population; this could explain up to 22% of BC cases where there are no mutations in the genes of high and moderate penetrance currently known. The SNPs rs3803662 (TOX3), rs13387042 (2q35) and rs13281615 (8q24) have been identified as susceptibility alleles with low penetrance for BC in various studies done primarily in European and Asian population, establishing as risk allele the one with the lowest population frequency and describing increases on the risk for development of the disease ranging between 1.05 - 1.65 times.

In this thesis, through a case-control study, it was examined the association between these SNPs and the risk of family BC on the Chilean population. For this, it was performed genotyping of SNPs rs3803662, rs13387042 and rs13281615 in 347 cases of BC and on 801 controls. BC cases were divided according to family history of BC (215 cases with family BC (subgroup A), and 132 cases with no family history of BC, and early diagnosis age ( $\leq 50$  years) (subgroup B)). Using statistical software were established genotypic and allelic frequencies of each polymorphism, and analyzed their association with increased risk of BC. Combined genotypes were also carried out between different SNPs studied and the effect of these on the risk of BC was analyzed.

The results obtained showed that the T allele of SNP rs3803662 and allele A of SNP rs13387042, were significantly linked with increased risk of BC (OR: 1.44; IC95%: [1.20-

1.74];  $p < 0.0001$  and OR: 1.34; IC95%: [1.11-1.61];  $p = 0.0009$ , respectively). Furthermore, it was found that the G allele of SNP rs13281615 (8q24), described in the literature as the risk allele for BC, was the most frequent allele in Chilean population. However, this allele was not associated with increased risk of BC.

Regarding combined genotypes among SNPs rs13387042 and rs3803662, rs13281615 and rs3803662, rs13387042 and rs13281615, it was observed that the risk of BC increased as the number of risk alleles increased. Furthermore, in subgroup B, double homozygous risk combined genotype between SNPs rs3803662 and rs13387042 (T/T-A/A), presented additive scale gene interaction.

As conclusion of this studies it is postulated that, in Chilean population, the T allele of SNP rs3803662 and A allele of SNP rs13387042, are susceptibility alleles of low penetrance for the development of BC; that the risk they confer increases as it increase the number of risk alleles; and that on young women ( $\leq 50$  years) with no family history of BC, gene interaction exists between rs3803662 and rs13387042.

## I. INTRODUCCIÓN.

El cáncer de mama (CM) constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial. Es el más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, representando el 23% del total de casos nuevos de cáncer y el 14% del total de muertes por cáncer (1).

En Chile, el CM es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres. La mortalidad por CM en nuestro país ha ido en aumento en las últimas dos décadas. En 1990 se registraba una tasa de mortalidad de 12.4 por 100000 mujeres, y en el año 2009 la tasa de mortalidad fue de 15.8 por 100000 mujeres, equivalente a 1338 muertes (2). Respecto de la incidencia, en Chile no existe un registro nacional de incidencia de CM, por lo cual estas tasas son sólo estimaciones en base a registros del sistema público de salud chileno. En base a estos registros, la incidencia nacional estimada el año 2009 para CM, fue cercana a los 3100 casos nuevos equivalente a una incidencia de 26 por 100000 mujeres (3).

Si bien, la etiología exacta de CM aún es desconocida, existen múltiples factores de riesgo asociados al desarrollo de esta patología, dentro de los cuales, la historia familiar de CM es el más importante. Estudios realizados en gemelos monocigotos y dicigotos, han establecido que el riesgo de CM es mayor en gemelos monocigotos, sugiriendo una base genética para el desarrollo de esta patología (4, 5, 6). Estudios epidemiológicos estiman que el CM es dos veces más común entre familiares de primer grado de pacientes con CM que en la población general (4, 7) y que el riesgo relativo aumenta con el número de familiares afectados, cuando la enfermedad es bilateral y cuando el familiar afectado ha sido diagnosticado a edad temprana (5, 6, 8).

### ASPECTOS GENÉTICOS DEL CÁNCER DE MAMA.

*BRCA 1* y *BRCA 2* son los genes de susceptibilidad más importantes asociados a CM. Las mutaciones en estos genes confieren alto riesgo para el desarrollo de CM, CO y síndrome mama-ovario. Diferentes estudios han mostrado que las mutaciones puntuales en *BRCA 1* y *BRCA 2* son responsables de una baja proporción de casos de CM familiar, la que varía entre un 16 a 20% (9, 10). La búsqueda de otros genes de alta penetrancia del

tipo *BRCA*, no han encontrado un gen *BRCA 3* y esto, sumado a los resultados obtenidos en complejos análisis de segregación que exploran la existencia de nuevos genes, postulan y favorecen un modelo poligénico de susceptibilidad para explicar la gran proporción de casos de CM que presentan agregación familiar y que son negativos para mutaciones en los genes *BRCA* (7, 8, 11, 12). El modelo poligénico establece que gran parte de la predisposición heredada al CM, sería consecuencia de la combinación de múltiples variantes genéticas en diferentes loci, cada uno de los cuales conferiría un pequeño efecto sobre el riesgo, en forma aditiva o multiplicativa (13, 14, 49). Ya en 1999, Easton y col. (15) plantearon la participación de genes de moderada y baja penetrancia en el CM familiar basándose en que: 1) no existirían otros genes con penetrancia comparable a las de *BRCA 1* y *BRCA 2*, o de existir, las mutaciones predisponentes en estos genes serían muy raras; 2) un modelo recesivo es muy poco probable; 3) algunos genes involucrados en la susceptibilidad al CM muestran efectos edad-específicos. El aumento del riesgo relativo con la edad, no puede ser explicado sólo por *BRCA 1* y *BRCA 2*, por lo tanto, otros genes deben también conferir riesgos relativos para los casos con edad de diagnóstico temprano; 4) de acuerdo a la hipótesis de Knudson (16), la carcinogénesis requiere de varios impactos mutacionales sucesivos en diferentes genes; 5) los genes involucrados en CM en general no confieren un riesgo importante para el desarrollo de otros cánceres; 6) a la heterogeneidad clínica podría subyacer una heterogeneidad genética, afirmación que se plantea debido a que existen algunas evidencias que el CM lobulillar (infiltrante) y el carcinoma lobulillar in situ, presentan riesgos familiares mayores que otros tipos histológicos de CM. Este efecto no parece ser consecuencia sólo de mutaciones en *BRCA 1* y *BRCA 2*.

#### PANORAMA ACTUAL DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE MAMA.

Actualmente el CM es considerado una enfermedad multifactorial compleja, determinada por el efecto combinado de varias, o incluso muchas, variantes genéticas y la acción de factores medioambientales (17, 18). Hoy en día, se describen 3 categorías de genes de susceptibilidad involucrados en el desarrollo de esta patología, de acuerdo al

perfil de riesgo que estos confieren (5, 12): 1.- Genes de alta penetrancia; 2.- Genes de moderada penetrancia; y 3.- Alelos de baja penetrancia.

### **1.- Genes de alta penetrancia:**

Esta categoría incluye los genes *BRCA 1*, *BRCA 2* y *TP53* entre otros. La principal característica de este tipo de genes es que son raros en la población, con frecuencias menores o igual al 0.1% y que confieren un alto riesgo relativo, del orden de 10 a 20 veces. Se han identificado a través de análisis de ligamiento y clonamiento posicional (5, 9, 12).

Los genes *BRCA 1* y *BRCA 2*, ubicados en los cromosomas 17q21 y 13q12 respectivamente, son los genes de alta penetrancia más importantes asociados a CM. Mutaciones en estos genes constituyen el desorden genético autosómico dominante más frecuente relacionado con CM familiar (9, 18). Ambos genes tienen un rol muy importante en la mantención de la estabilidad genómica, entre otros, por su participación en la reparación de rupturas de doble hebra en el DNA (8, 12).

Además de *BRCA 1* y *BRCA 2*, existen otros genes de alta penetrancia asociados a CM. Sin embargo, las mutaciones en estos genes son muy raras en la población, contribuyen en una baja proporción al riesgo de CM familiar y la predisposición al CM se presenta sólo como parte de síndromes de cánceres hereditarios en los cuales están involucrados (5, 8, 9, 18): *TP53* (Síndrome de Li Fraumeni), *PTEN* (Síndrome de Cowden), *STK1* (Síndrome de Peutz – Jeghers) y *CDHI* (Síndrome de cáncer gástrico hereditario difuso).

### **2.- Genes de moderada penetrancia:**

Las principales características de este tipo de genes son: baja frecuencia poblacional (menor o igual a 0.6%), su moderado riesgo para CM con riesgo relativo entre 2 a 4 veces, y que todos los genes identificados en esta categoría están involucrados en los mecanismos de reparación del DNA (5, 9, 12). Su asociación con aumento del riesgo para CM, se realiza básicamente por tamizaje de mutaciones en genes candidatos, en extensos estudios caso-control enriquecidos en CM familiar (9, 11). Dentro de los genes de moderada penetrancia descritos en la actualidad, se encuentran: *ATM*, *PALB2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *RAD50*, *BARD1*.

Los portadores de mutaciones en genes de moderada penetrancia tienen un riesgo de aproximadamente 6 a 10% de desarrollar CM a los 60 años, comparado con un 3% en la población general (9). Se estima que los genes de moderada penetrancia mencionados, en conjunto contribuyen al riesgo de CM familiar en menos de un 3%, comparado con el 20 a 25% de los genes de alta penetrancia (5).

### **3.- Alelos de baja penetrancia:**

Con la incorporación del modelo poligénico, en los últimos años la búsqueda de variantes genéticas de susceptibilidad se ha enfocado intensamente a la identificación de alelos comunes en la población, definidos como aquellos con frecuencia mayor al 5%. Estos alelos están asociados a discretos aumentos en el riesgo de CM (9, 11, 17).

La identificación de estos alelos de baja penetrancia se basa principalmente en estudios de asociación de genoma extenso (GWAS), donde se comparan las frecuencias de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en grandes series caso-control. Los GWAS tienen la ventaja de identificar alelos de baja penetrancia sin un conocimiento previo de su ubicación y/o función. Además se han realizado meta análisis que involucran cientos a miles de casos y controles no relacionados, generalmente provenientes de diferentes estudios en distintas poblaciones y grupos étnicos, los que minimizan falsos positivos y/o limitaciones que pudieran encontrarse en series individuales (9, 11, 17, 19).

Actualmente, para CM, se han publicado alrededor de 10 GWAS y se han identificados al menos 13 loci independientes implicados en el riesgo de la enfermedad (19). Estos loci corresponden todos a SNPs con dos alelos: un alelo de riesgo y un alelo normal, y el riesgo que confiere cada uno de estos loci, presentaría un efecto de dosis: homocigotos para el alelo de riesgo presentan riesgos más altos que los heterocigotos (4, 9, 11). Sin embargo, los riesgos que confieren todos los alelos de baja penetrancia identificados a la fecha son muy bajos y varían entre 1.05 a 1.30 en heterocigotos, y 1.20 a 1.65 en los homocigotos para el alelo de riesgo (17, 18). A pesar de los bajos riesgos que confieren estos alelos, al ser relativamente comunes en la población, presumiblemente podrían explicar una proporción mucho mayor de CM que las mutaciones germinales en *BRCA 1* y *BRCA 2*. Se ha estimado que, debido a sus altas frecuencias alélicas (560/1000), el riesgo poblacional atribuible sería del 22% (20).



A diferencia de los genes de alta y moderada penetrancia, varios de los alelos de baja penetrancia identificados a la fecha no están involucrados directamente en la vía de reparación del DNA e incluso algunos, presentan funciones conocidas no relacionadas con el desarrollo del cáncer. Otra diferencia a destacar de los alelos de baja penetrancia respecto a los de alta y moderada penetrancia, es que los homocigotos para el alelo de riesgo no presentan diferencias fenotípicas con heterocigotos o con homocigotos para el alelo normal, excepto en el riesgo para CM que ellos confieren. Por último, es importante destacar que los loci identificados a la fecha, se encuentran tanto en regiones codificantes del genoma, como en regiones no codificantes, lejos de algún gen conocido (5, 9, 11, 17, 19). Dentro de los que se encuentran en regiones codificantes, destacan el SNPs rs2981582 en el gen *FGFR2*, rs889312 en *MAP3K1*, rs3803662 asociado al gen *TOX3* y rs3817198 en *LSP1*, todos ellos identificados el año 2007 por Easton y col. (21) en un gran GWAS en el cual se evaluaron miles de SNPs en miles de muestras de casos y controles provenientes de 22 estudios internacionales, que posteriormente han sido replicados en otros estudios y que a su vez han identificados nuevos SNPs. Es el caso del estudio publicado por Stacey y col. (22), realizado en 1600 casos de CM y 11563 controles en población de Islandia, el cual confirmó la asociación del SNP rs3803662 con riesgo de CM e identificó un nuevo SNP, rs13387042, ubicado en el locus 2q35, el cual forma parte de los loci identificados en región no codificante. Otro de los SNP identificado por Easton y col. en región no codificante, es rs13281615 ubicado en el locus 8q24.

Se estima que todos los loci identificados a la fecha, explicarían alrededor de un 8 a 10% de la agregación familiar observada para CM (5, 11, 19).

### Gen *TOX3*

El gen *TOX3*, también conocido como *TNRC9* (Trinucleotide Repeat Containing 9 gene), se encuentra en el cromosoma 16q y codifica una proteína de 576 aminoácidos (aa) y peso molecular (PM) de 63.3 KDa. Esta proteína pertenece a la superfamilia de proteínas HMG (High Mobility Group) - BOX, subfamilia TOX (Thymocyte Selection-associated HMG-BOX), que corresponden a proteínas cromosómicas no histonas que ayudan a la remodelación del nucleosoma (23-25). La principal característica del gen *TOX3*, es una

secuencia repetida de trinucleótidos CAG hacia la región 3'OH, originando una proteína con un extremo C-terminal rico en glutaminas (23, 24). La función de TOX3 no se encuentra bien definida, sin embargo, estudios recientes señalan que podría actuar como un factor de transcripción, lo que se ha demostrado en neuronas (24, 26). Además, este gen se ha implicado en el desarrollo de metástasis óseas en pacientes con CM (27).

En *TOX3* se ha identificado variación polimórfica y se ha estudiado la posible asociación de distintos SNPs de este gen, con aumento del riesgo para CM. Dentro de los SNPs estudiados, el rs3803662 (C/T), es el primero para el cual se describe una asociación significativa (21, 25). Easton y col. (21), en un estudio caso - control publicado el año 2007, encontraron que el alelo de menor frecuencia para rs3803662 (T), aumentaba el riesgo para CM en 1.20 veces. Posteriormente, Stacey y col. (22) confirmaron la asociación entre este SNP y aumento del riesgo para CM, encontrando que el alelo T aumentaba el riesgo para CM en 1.28 veces. En este estudio también se encontró que los individuos homocigotos para el alelo T, presentaban un aumento del riesgo de 1.64 veces, y además, demostraron que el riesgo conferido por rs3803662, se observaba en tumores positivos para receptor de estrógenos (ER+). Estudios epidemiológicos en diferentes poblaciones, han analizado la asociación entre rs3803662 y riesgo de CM, obteniendo resultados diversos (10, 28-33). Mientras que en estudios realizados en individuos con ancestros Europeos (10, 28) los resultados son similares a los obtenidos por Easton y col. (21), aquellos realizados en poblaciones Asiáticas presentan resultados controversiales (29-31) y en población Afroamericana, los resultados no muestran relación entre rs3803662 y riesgo de CM (32, 33). Recientemente se publicó un meta-análisis (25) que incluye 8 publicaciones y un total de 25828 casos de CM y 36177 controles, cuyos resultados permiten a los autores concluir que rs3803662 se asocia significativamente con riesgo de CM y que el alelo T es un alelo de riesgo de baja penetrancia para el desarrollo de CM.

En relación a los resultados encontrados por Stacey y col. (22) respecto a la asociación entre rs3803662 y tumores ER+, éstos han sido confirmados en otros estudios que incluyen gran número de casos y controles (28, 34).

El mecanismo por el cual rs3803662 sería responsable del aumento del riesgo para CM, no se ha dilucidado. Este SNP, se ubica en un bloque de desequilibrio de ligamiento que contiene: el extremo 5' del gen *TOX3*, una pequeña región intergénica y un gen

hipotético poco caracterizado denominado *LOC64371* (35, 36, 37). Actualmente, se postula que el SNP rs3803662 aumentaría el riesgo para CM, modulando la expresión de genes cercanos e incluso, de genes más distantes en *cis* o *trans*, asociados a CM (36, 37). Bajo esta hipótesis, Udler y col. (2010) (36) analizaron en 38 muestras de mama normal y 77 muestras de tumores de mama, la asociación de los distintos genotipos de rs3803662 con los niveles de RNAm de *TOX3*, sin encontrar diferencias significativas entre los niveles de RNAm de *TOX3* de tejido normal comparado con tejido tumoral para ninguno de los genotipos del SNP rs3803662 (C/C, C/T, T/T). Por lo anterior, los autores analizaron la expresión de genes más distantes, encontrando que los distintos genotipos portadores del alelo de riesgo de rs3803662 (C/T y T/T), se asociaban con niveles aumentados de RNAm del gen *RBL2* (gen involucrado en la regulación del ciclo celular), y que esta asociación era dosis-dependiente. Sin embargo, debido al tamaño de la muestra analizada, los autores sugieren la necesidad de nuevos estudios para investigar esta asociación. Posteriormente, en el año 2011, Riaz y col (37) publicaron un estudio en el cual se evaluó la expresión de *TOX3* y su asociación con los distintos genotipos de rs3803662, en 1401 muestras de pacientes con CM primario. Los autores mostraron que los individuos portadores del alelo de riesgo (C/T y T/T), presentaban disminución de los niveles de RNAm de *TOX3*, y que esta disminución era dosis-dependiente según el número de alelos de riesgo presentes en el genotipo. Considerando estos resultados y los antecedentes existentes respecto de las características y posible función de *TOX3*, los autores plantean que este gen podría actuar como un gen supresor de tumor, y sugieren la realización de estudios funcionales adicionales, tanto en muestras normales como en tumores mamarios, para determinar en forma más clara el rol del gen *TOX3*.

#### Región cromosómica 2q35

La región cromosómica 2q35 y su asociación con aumento de riesgo para CM, fue descrita por primera vez por Stacey y col. (22), quienes encontraron que el alelo A (alelo de menor frecuencia) del SNP rs13387042 (G/A) ubicado en esta región, aumentaba el riesgo para CM en 1.20 veces y que este riesgo aumentaba a 1.44 veces en individuos homocigotos para este alelo. Estos resultados estaban restringidos a tumores ER+.

Posteriormente, Milne y col. (38), en mujeres caucásicas Europeas, confirmaron la asociación entre el SNP rs13387042 y riesgo para CM, encontrando que el alelo A aumentaba el riesgo para CM en 1.12 veces. Sin embargo, este aumento del riesgo, se evidenciaba tanto en tumores ER+, como en ER -, siendo discretamente mayor en ER+. En el año 2010 Reeves y col. (28), ratificaron la asociación entre el alelo A del SNP rs13387042 y aumento del riesgo para CM. Además, estos autores estudiaron la asociación de distintos SNPs con subtipos de CM, encontrando que el alelo A de este SNP se asociaba significativamente con CM bilateral y con CM de tipo lobulillar, y no encontraron asociación significativa según receptor de estrógenos.

La asociación entre el alelo A del SNP rs13387042 y tumores ER+, fue corroborada recientemente por Broeks y col. (34) en un estudio que incluyó sobre 30040 casos de CM y 53692 controles. Los autores determinaron, en población de origen Europeo, un aumento del riesgo para CM, de 1.16 veces para los tumores ER+ y de 1.09 veces para los tumores ER-, estableciendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de tumor.

Estudios realizados en otras poblaciones muestran resultados diferentes (30, 32). Mientras que en un estudio realizado en población Afroamericana (32), los resultados son coincidentes con los obtenidos en población Europea, la asociación entre 2q35 y aumento del riesgo para CM no ha sido encontrada en población Asiática (30).

Actualmente, se desconoce el mecanismo por el cual rs13387042 aumenta el riesgo para CM. Este SNP se ubica en un bloque de desequilibrio de ligamiento de 90 Kb, en el cual no se ha demostrado existencia de genes ni RNAs no codificantes (22, 38, 39), lo cual dificulta el esclarecimiento de su rol en la carcinogénesis mamaria. Sin embargo, al explorar las regiones vecinas a este bloque de desequilibrio de ligamiento, los genes más cercanos conocidos son: *TNP1* a 181 Kb de distancia proximal, *IGFBP5* e *IGFBP2* a una distancia proximal de 345 Kb y 376 Kb respectivamente, y *TNS1* a 761 Kb de distancia distal (22, 34).

#### Región cromosómica 8q24

Esta región cromosómica ha sido ampliamente estudiada debido a su asociación con distintos tipos de cáncer, incluyendo mama, próstata, colon y ovario. Se trata de una región

en la que no se han identificado genes, compuesta por 5 bloques distintos de haplotipos: uno asociado sólo con CM, tres asociados con cáncer de próstata y uno asociado con cáncer de próstata, colon y ovario (35, 40).

La asociación entre 8q24 y CM fue descrita por primera vez por Easton y col. (21) el año 2007, al determinar que el SNP rs13281615 (A/G) ubicado en 8q24, se asociaba con aumento del riesgo para CM. Los autores encontraron que el alelo de menor frecuencia de este SNP (alelo G), aumentaba el riesgo para CM en 1.08 veces, y que los individuos homocigotos para este alelo, presentaban un aumento del riesgo para CM de 1.18 veces. Posteriormente, Fletcher y col (41) confirmaron estos resultados en población Europea, determinando que el alelo G se asociaba con un aumento del riesgo para CM de 1.24 veces, mientras que los individuos homocigotos G/G aumentaban el riesgo en 1.54 veces. Además, estos autores señalan que el riesgo conferido por este SNP, sería mayor en casos de CM con historia familiar. Otros estudios realizados en población Europea han obtenido resultados similares respecto a la asociación del SNP rs13281615 y aumento del riesgo para CM (10, 28, 40, 42). En relación al subtipo de tumor, se ha encontrado una mayor asociación entre rs13281615 y tumores ER+ (34, 43).

El SNP rs13281615 (A/G), se ubica en una región cromosómica (8q24) en la cual no se han identificado genes (21, 35, 40). Sin embargo, se sabe que los genes más cercanos a esta región son: el proto-oncogén *c-MYC*, cuya sobreexpresión se ha observado en CM, y está ubicado a más de 350 kb de rs13281615; *FAM84B* (Family with sequence similarity 84, member B), que se ha descrito como una proteína de membrana asociada a CM, cuya función es desconocida; y el pseudogen *POU5F1P1* (35, 37, 40). Actualmente, se desconoce el mecanismo por el cual, las variantes ubicadas en esta región, se asocian con los distintos cánceres. Se postula que estas variantes afectarían a elementos regulatorios de la transcripción (enhancers) tejido-específicos, ubicados en esta región, modulando la expresión de genes cercanos (35). Riaz y col. (37) evaluaron en población Europea, la expresión de *c-MYC* y *POU5F1P1* y su asociación con los distintos genotipos del SNP rs13281615. Los autores no encontraron niveles alterados de RNAm de ambos genes, en relación a los genotipos portadores del alelo considerado de riesgo (A/G y G/G), postulando que este SNP no actuaría a través de la modulación de la expresión de estos genes.

## **II.- HIPOTESIS.**

En población chilena, las variantes de susceptibilidad de baja penetrancia (SNPs) rs3803662 asociado a *TOX3*, rs13387042 en 2q35 y/o rs13281615 en 8q24 se asocian con riesgo de CM.

## **III.- OBJETIVOS.**

### **1.- Objetivos generales**

**1.1.-** Determinar si existe asociación entre las variantes de baja penetrancia rs3803662 en *TOX3*, rs13387042 en 2q35 y rs13281615 en 8q24 con aumento del riesgo para CM.

**1.2.-** Determinar el efecto de los genotipos combinados de los SNPs en análisis, sobre el riesgo para CM.

### **2.- Objetivos específicos**

**2.1.-** Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs: rs3803662 (*TOX3*), rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24), en casos con CM que incluyen: a) Pacientes con CM familiar (n=215) y b) mujeres con diagnóstico temprano de la enfermedad, sin antecedentes familiares de CM y/o cáncer de ovario (CO) ( $\leq 50$  años) (n=132).

**2.2.-** Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs: rs3803662 (*TOX3*), rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24) en mujeres sanas sin antecedentes familiares de CM (Grupo control, n=801).

**2.3.-** Comparar estadísticamente las frecuencias alélicas de los SNPs analizados en casos versus controles.

**2.4.-** Comparar estadísticamente las frecuencias genotípicas de los SNPs analizados en casos versus controles.

**2.5.-** Establecer si los SNPs analizados aumentan el riesgo para CM en casos que incluyen: a) Pacientes con CM familiar y b) mujeres con diagnóstico temprano de la enfermedad sin antecedentes familiares de CM y/o CO ( $\leq 50$  años).

**2.6.-** Analizar el efecto de los genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 y rs13387042, rs3803662 y rs13281615, y rs13387042 y rs13281615, sobre el riesgo para CM.

#### **IV.- METODOLOGIA.**

##### **1.- Grupos muestrales:**

###### **1.1.- Definición de los grupos muestrales**

**a).- Casos:** Los casos de CM considerados para este estudio, incluyen:

1.- Casos con CM familiar (Subgrupo A; n=215): Se consideraron casos con CM familiar a aquellos que cumplieran con al menos uno de los siguientes criterios:

A.- Familias con 3 o más parientes con CM y/u ovario.

B.- Familias con 2 parientes con CM.

C.- Familias con 1 caso con CM y 1 con cáncer de ovario.

2.- Casos de con CM con edad de diagnóstico temprano ( $\leq 50$  años) y sin historia familiar para CM y/o cáncer de ovario (CO) (Subgrupo B; n=132): Considerando que lo más frecuente es que el cáncer se presente en edades tardías de la vida ( $> 50$  años), a toda mujer con diagnóstico temprano de cáncer se le debe realizar estudio genético a objeto de obtener conocimiento en relación con las bases genéticas de su enfermedad y de la probabilidad de la transmisión de estos factores a la descendencia. Considerando que la literatura está informando que las mujeres con diagnóstico temprano y sin historia familiar de CM son negativas para mutaciones en los genes de alta penetrancia *BRCA 1* y *BRCA 2*, es muy relevante analizar en ellas la asociación de la patología con variantes de baja penetrancia.

Todos los casos incluidos en este estudio corresponden a pacientes negativos para mutaciones patogénicas en los genes de alta penetrancia *BRCA 1* y *BRCA 2*.

**b).- Controles:** Mujeres sanas, sin antecedentes familiares para CM, con características similares a los casos en relación a edad, sexo y residencia.

## **1.2.- Obtención de los grupos muestrales**

Los casos con CM se seleccionaron a partir de los registros de diferentes servicios del área metropolitana, tanto públicos como privados, que han colaborado con los proyectos FONDECYT desarrollados y en desarrollo en el tema (FONDECYT 1010800, 1060094 y 1110081), y que incluyen: Unidad de Patología Mamaria del Servicio de Ginecología del Hospital Clínico San Borja Arriarán (Dr. Octavio Peralta); Servicio de Ginecología y Obstetricia Hospital El Salvador (Dr. Alonso Uribe); Servicio de Ginecología y Obstetricia Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Clínica Las condes, y Corporación Nacional del Cáncer (CONAC). Todos los pacientes tienen diagnóstico definitivo confirmado con estudio histológico. A todos los pacientes seleccionados, se les explicó en qué consiste el estudio y los objetivos de éste. Se les aplicó una encuesta que incluyó preguntas relacionadas con su historia médica, reproductiva, etnia y factores de riesgo (Anexo 1) y se les solicitó firmar un consentimiento informado, declarando que aceptan voluntariamente ser parte del estudio (Anexo 2).

- El grupo control se obtuvo de mujeres que asisten a exámenes de laboratorio a la CONAC, y que no tienen historia familiar de cánceres relacionados con los genes BRCA 1 y 2 (cáncer de mama, ovario, próstata, páncreas y melanoma). A este grupo, también se les explicó los objetivos del estudio, se les aplicó una encuesta (Anexo 3) y se les solicitó la firma de un consentimiento informado (Anexo 4).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y la información de cada individuo participante en el estudio, se mantiene en forma confidencial.

## **1.3.- Criterios de exclusión**

Se excluyó a todos los individuos que presentaban ancestros de primera y segunda generación de otras etnias, por ejemplo, europeos y asiáticos, ya que este estudio se enfoca a la búsqueda de los factores genéticos de susceptibilidad para CM en población chilena. Este criterio se aplicó para los dos grupos muestrales incorporados (casos y controles).

En el caso de la muestra control, se excluyó a aquellos individuos que tenían antecedentes familiares de otros tipos de cánceres asociados a mutaciones patogénicas en los genes *BRCA* 1 y 2, tales como cáncer de próstata, páncreas y melanoma.



## **2.- Métodos moleculares:**

### **2.1.- Extracción de DNA genómico**

A cada participante del estudio, se le extrajeron 10 ml de sangre periférica, la que fue colectada en tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra se obtuvo DNA genómico total, utilizando una técnica estándar basada en el método de Chomczynski (50).

Una vez obtenidas las muestras de DNA genómico, estas se cuantificaron por medición de absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro modelo Shimatzu, con la finalidad de conocer la cantidad de DNA existente en cada muestra, la que se calculó considerando que 1 unidad de absorbancia a 260nm, equivale a 50 ng/μl. A partir de los stocks se realizaron diluciones con la concentración requerida para la genotipificación.

### **2.2.- Genotipificación de los SNPs rs3803662 (*TOX3*), rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24)**

Se utilizó el ensayo TaqMan® (Applied Biosystems), el que actualmente es el método de elección para la genotipificación de SNPs, ya que permite el análisis de un gran número de muestras con una adecuada relación costo-eficiencia. Este método se basa en el uso de un par de sondas alelo-específica marcadas con un fluorocromo diferente para cada alelo. Luego de la hibridación, se realiza una reacción de PCR utilizando una Taq polimerasa con actividad 5' nucleasa, la cual degrada a la sonda alelo-específica que hibridó con el DNA genómico, liberando al fluorocromo para que emita fluorescencia. Los partidores y sondas marcadas para cada polimorfismo son diseñados y comercializados como kits por Applied Biosystems. La reacción de PCR y la lectura de fluorescencia se realizan en un termociclador RealTime (StepOnePlus®), el cual mediante un software discrimina los alelos de acuerdo a la fluorescencia emitida.

El kit comercial para la genotipificación de cada SNPs incluye:

- 1.- TaqMan® Genotyping Master Mix (común para todos los ensayos) que contiene: dNTPs, buffer, ampliTaq Gold®DNA polimerasa y ROX (fluoróforo de referencia interna).
- 2.- TaqMan® SNP Genotyping Assay que contiene los partidores y 2 sondas específicas para cada SNPs. Una de las sondas está marcada con el fluorocromo o reportero VIC y la otra, con el fluorocromo 6FAM, ambas en el extremo 5'.

La genotipificación de los 3 SNPs se realizó siguiendo el mismo protocolo de trabajo:

- H2O libre de nucleasas : 2.75  $\mu$ l
- Master Mix : 5.0  $\mu$ l
- TaqMan assay : 0.25  $\mu$ l
- DNA genómico 2.5 ng/ $\mu$ l : 2.0  $\mu$ l
- Volumen final : 10.0  $\mu$ l

El programa de la reacción de PCR, fue el siguiente:

- 60°C /30 seg
- 95°C/10 min.
- (92°C/15 seg. + 60°C/ 1 min.) x 50 ciclos
- 60°C/30 seg.

Para realizar la discriminación alélica, se utilizó el software Step One V. 2.1, el cual en base a una curva de aumento de fluorescencia. El programa discrimina entre individuos heterocigotos, generando una curva de aumento de fluorescencia tanto para VIC como para 6FAM, y homocigotos, caso en el cual genera una curva de aumento de fluorescencia sólo para VIC ó sólo para 6FAM, dependiendo si es homocigoto para un alelo o para el otro.

### **3.- Análisis estadístico de los datos**

Una vez determinadas las frecuencias alélicas y genotípicas de cada SNPs en casos y controles, se aplicó Test de bondad de ajuste ( $X^2$ ) a los controles, utilizando el programa Stata V 8.2 (StataCorp, Texas, USA), para establecer equilibrio de Hardy-Weinberg. El test se aplicó para los 3 SNPs en estudio.

La comparación estadística de las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles, se realizó aplicando Test exacto de Fisher de una cola, con  $\alpha = 0,05$ , utilizando el programa Stata V 8.2. La fuerza de asociación de cada polimorfismo con CM, se estimó utilizando la razón de productos cruzados u Odd Ratio (OR), con un intervalo de confianza (IC) al 95%. La interpretación estadística para los valores obtenidos de OR fue la siguiente:

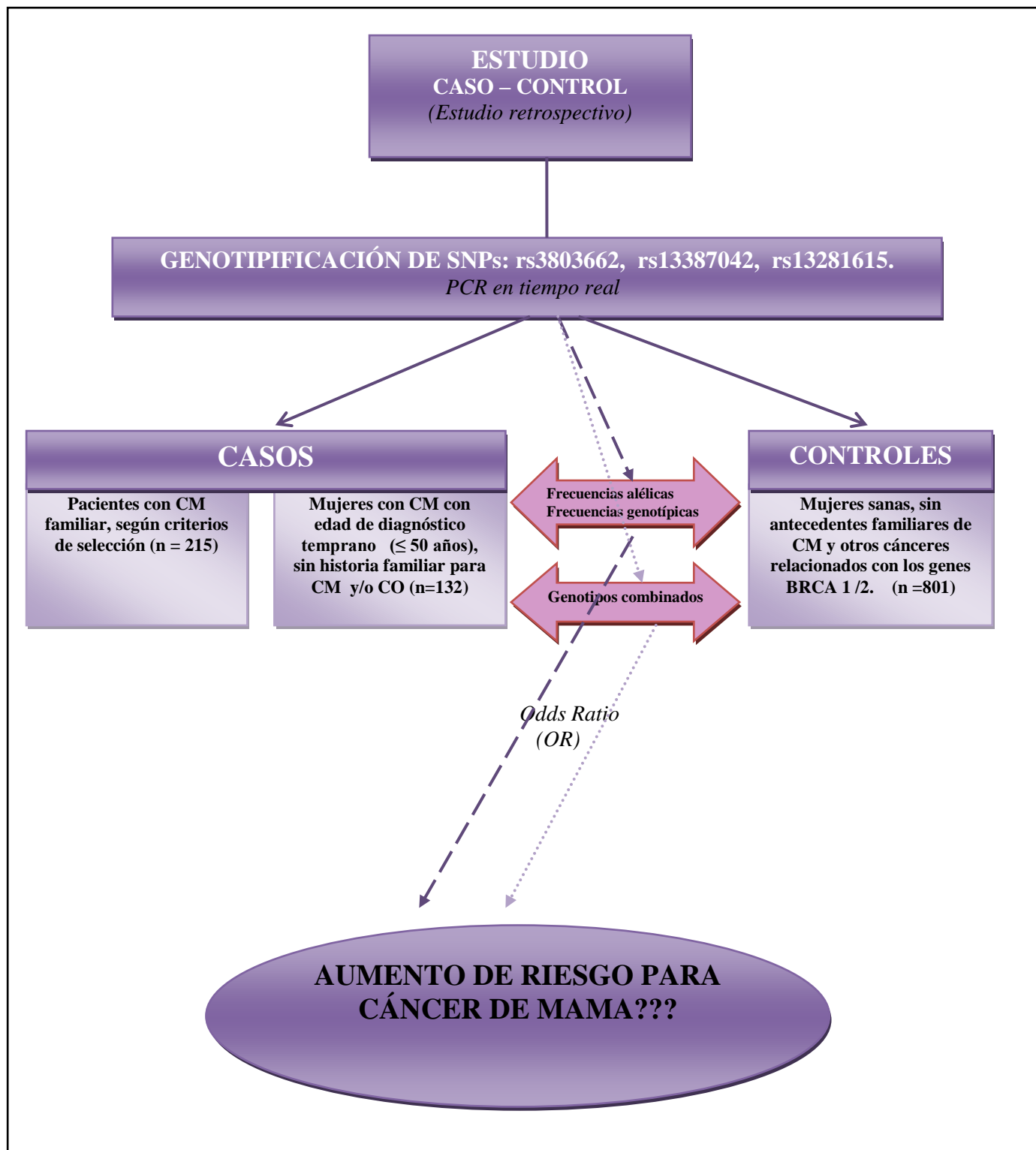
- OR > 1.00 → Asociación positiva (Aumenta el riesgo para CM)
- OR = 1.00 → Sin asociación
- OR < 1.00 → Asociación negativa (Disminuye el riesgo para CM, efecto protector)

Para cada SNP se evaluó efecto aditivo aplicando test de tendencia Cochran-Armitage ( $p$ -trend), utilizando software estadístico R versión 2.15.1 (The R Project for Statistical Computing). Se consideraron estadísticamente significativos, valores de  $p$ -trend  $\leq 0.05$ .

Respecto a los genotipos combinados, la comparación de las frecuencias entre casos y controles, se realizó aplicando análisis de regresión logística. Se consideraron estadísticamente significativos, valores de  $p \leq 0.05$ . La asociación con aumento del riesgo para CM se determinó calculando OR, con un IC al 95%. Valores de OR superiores a 1.00 indicaron asociación con aumento del riesgo para CM. El efecto aditivo del número de alelos de riesgo presentes en los distintos genotipos combinados, se evaluó aplicando test de tendencia ( $p$ -trend) y cálculo de  $p$ -global, utilizando el programa Stata V 8.2. Se consideraron estadísticamente significativos, valores de  $p$ -trend y  $p$ -global  $\leq 0.05$ . La interacción génica en la escala aditiva se analizó calculando la proporción atribuible a la interacción (AP), cuyo intervalo de confianza (IC) y valor de  $p$ , se calcularon de acuerdo a Hosmer y col. (51). Se consideró existencia de interacción génica aditiva cuando el valor de AP fue superior a 0 (valor esperado de acuerdo a la hipótesis nula=0). La interacción génica en la escala multiplicativa se calculó utilizando análisis de regresión logística, determinando la relación entre el OR combinado, dividido por los ORs independientes de los SNPs considerados en el estudio (Razón de ORs). Una razón de ORs superior a 1.00, fue indicativa de interacción génica multiplicativa entre los SNPs (valor esperado para la hipótesis nula = 1). Se utilizó un valor de  $p \leq 0.05$  como criterio de significancia estadística. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Stata V 8.2.

La figura 1 muestra el diseño del estudio.

**Figura 1.**  
Diseño del estudio.



## V.- RESULTADOS.

### 1.- Características de los casos con CM

Como se mencionó anteriormente, a todos los casos con CM se les realizó tamizaje de mutaciones en la secuencia codificante completa y regiones intrónicas circundantes de los genes BRCA 1 y BRCA 2, seleccionando para este estudio sólo aquellos casos negativos para mutaciones patogénicas en ambos genes.

La Tabla 1 muestra la distribución de los casos con CM según criterios de inclusión.

### 2.- Genotipificación de los SNPs

Los 3 SNPs en estudio se genotipificaron en 347 casos y 801 controles. Las frecuencias genotípicas observadas para los 3 SNPs están en equilibrio de Hardy Weinberg en los controles ( $p=0.78$  para el rs3803662 (*TOX3*),  $p=0.97$  para el rs13387042 (2q35) y  $p=0.99$  para el rs13281615 (8q24)).

Las curvas de fluorescencia obtenidas en la PCR en tiempo real y la discriminación alélica realizada mediante el software Step one V2.1, se muestran en las figuras 2 y 3, respectivamente. Los resultados corresponden al análisis del SNP rs3803662 (*TOX3*). Resultados similares se observaron en el análisis de rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24).

**Tabla 1**

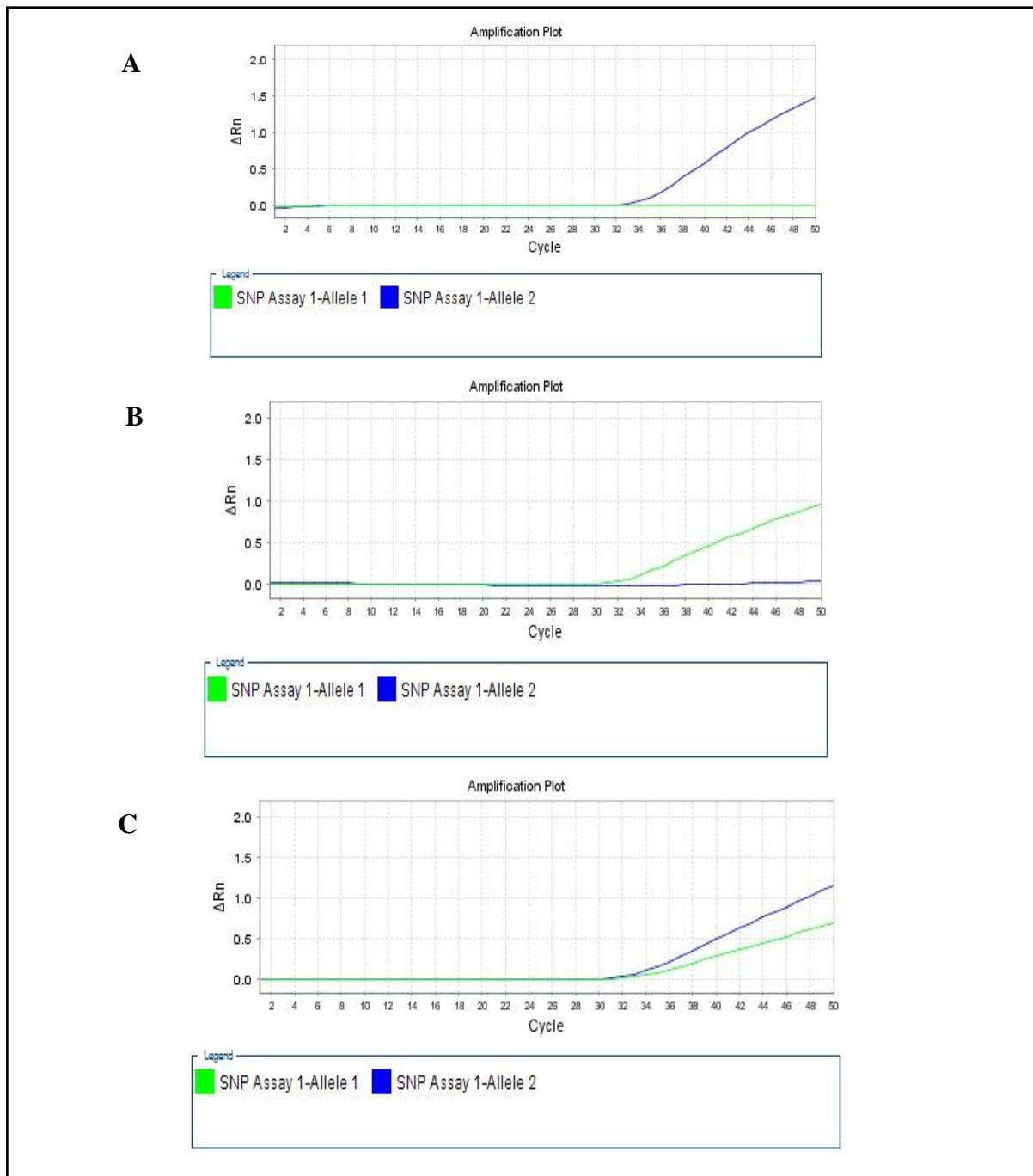
Distribución de casos, según criterios de inclusión

	<b>N</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
<b>1.- Casos con CM familiar</b>		
A.- Familias con 3 o más casos con CM y/o CO	<b>87</b>	<b>25.4%</b>
B.- Familias con 2 casos con CM	<b>116</b>	<b>33.2%</b>
C.- Familias con 1 caso con CM y 1 caso con CO	<b>12</b>	<b>3.4%</b>
<b>2.- Casos con CM con edad de diagnóstico temprano (<math>\leq 50</math> años), sin antecedentes familiares de CM y/o CO.</b>	<b>132</b>	<b>38%</b>

*CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario.*

**Figura 2.**

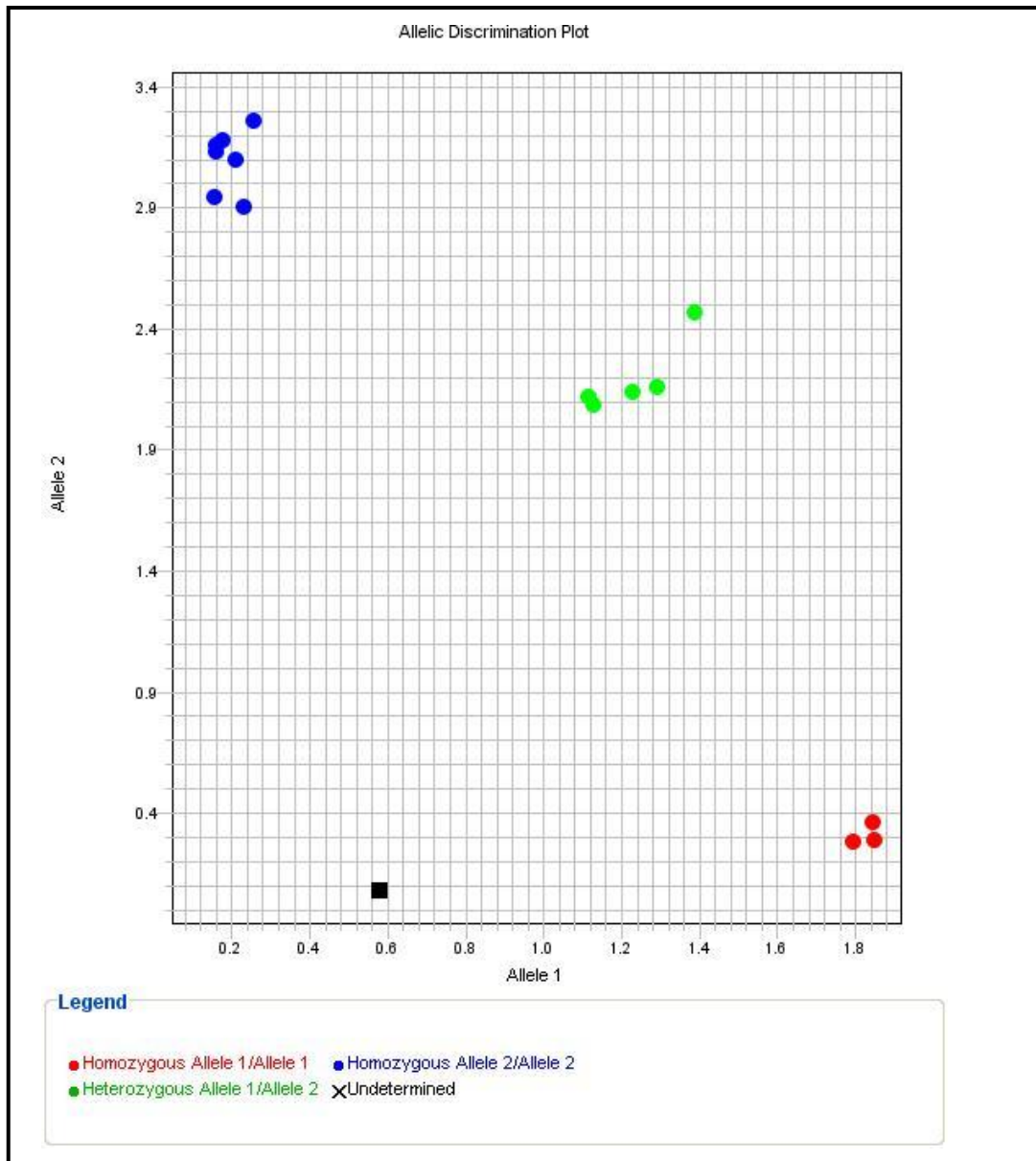
Curvas de fluorescencia para los distintos genotipos del SNP rs3803662(*TOX3*).



**A)** Homocigoto para el alelo 2 (CC); **B)** Homocigoto para el alelo 1 (TT), **C)** Heterocigoto (CT).

**Figura 3.**

Discriminación alélica para el SNP rs3803662 (*TOX3*).



Los puntos rojos corresponden a individuos homocigotos para el alelo T (T/T), los verdes a individuos heterocigotos (T/C) y los azules a individuos homocigotos para el alelo C (C/C). El cuadro negro corresponde a un control negativo.



### 3.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3803662 (TOX3)

EL SNP rs3803662 (TOX3) presenta 2 alelos, C y T. En la literatura se ha descrito que en población Europea, el alelo C es el de mayor frecuencia y el alelo T (alelo de menor frecuencia) se asocia con aumento de riesgo para CM.

La tabla 2 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3803662 (TOX3) en la muestra completa de casos con CM (n=347) y en los subgrupos de casos con CM familiar (n=215) (subgrupo A) y mujeres afectadas con CM, sin historia familiar para CM o CO y con edad de diagnóstico temprano ( $\leq 50$  años) (n=132) (subgrupo B). La frecuencia del alelo T (alelo de menor frecuencia) fue mayor en los casos cuando se consideró la muestra completa (0.45) respecto de los controles (0.36), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ; OR: 1.44; IC95%: [1.20 – 1.74]). Este resultado permite concluir que el alelo T aumenta el riesgo para CM en 1.44 veces. Al realizar este mismo análisis en los subgrupos A y B, también se observó mayor frecuencia del alelo T en los casos respecto de los controles, siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ; OR: 1.57; IC95%: [1.25 – 1.95] y  $p = 0.0456$ ; OR: 1.26; IC95%: [0.96 – 1.66], respectivamente).

Respecto de las frecuencias genotípicas, se observó mayor frecuencia de heterocigotos (C/T) y de homocigotos para el alelo T en casos respecto de controles en a) la muestra completa y b) el subgrupo A, siendo las diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2). Sin embargo, no se alcanzó significancia estadística en las frecuencias de los genotipos C/T y T/T, al comparar los casos del subgrupo B con los controles (Tabla 2). Los resultados también muestran que los portadores del alelo de riesgo T (C/T + T/T) fueron más frecuentes en los casos, en la muestra total y en el subgrupo A (71.1% y 74.9%, respectivamente) respecto de los controles (58,8%) siendo las diferencias, estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ , OR: 1.73, IC95%: [1.30 – 2.29] y  $p < 0.0001$ , OR: 2.08, IC95%: [1.47 – 2.98], respectivamente). Estos resultados permiten concluir que el genotipo portador de alelo T, aumenta en 1.73 veces el riesgo de CM al considerar la muestra total y en 2.08 veces en el subgrupo de casos con CM familiar. No se observó aumento del riesgo en los portadores del alelo T en el subgrupo de mujeres con edad de diagnóstico  $\leq 50$  años, sin antecedentes familiares de CM y/o CO ( $p = 0.0993$ ).

**Tabla 2**Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs3803662 (*TOX3*)

Genotipo	Controles (N=801)	Total de casos con CM (N=347)	OR (IC: 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC: 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N=132)	OR (IC: 95%)	P
C/C	330 (41.2%)	100 (28.8%)	Ref.		54 (25.1%)	Ref.		46 (34.9%)	Ref.	
C/T	371 (46.3%)	185 (53.3%)	<b>1.64</b> (1.22 – 2.21)	<b>0.0004</b>	122 (56.7%)	<b>2.00</b> (1.39 – 2.91)	<b>0.0001</b>	63 (47.7%)	1.21 (0.79 – 1.87)	0.1990
T/T	100 (12.5%)	62 (17.9%)	<b>2.04</b> (1.35 – 3.06)	<b>0.0002</b>	39 (18.2%)	<b>2.38</b> (1.44 – 3.90)	<b>0.0003</b>	23 (17.4%)	1.65 (0.90 – 2.93)	0.0519
<i>p</i> -trend				<b>&lt;0.0001</b>			<b>&lt;0.0001</b>			0.0768
C/T + T/T	471 (58.8%)	247 (71.1%)	<b>1.73</b> (1.30 – 2.29)	<b>&lt;0.0001</b>	161 (74.9%)	<b>2.08</b> (1.47 – 2.98)	<b>&lt;0.0001</b>	86 (65.1%)	1.30 (0.87 – 1.96)	0.0993
Alelo C	0.64	0.55	Ref.		0.53	Ref.		0.59	Ref.	
Alelo T	0.36	0.45	<b>1.44</b> (1.20 – 1.74)	<b>&lt;0.0001</b>	0.47	<b>1.57</b> (1.25 – 1.95)	<b>&lt;0.0001</b>	0.41	1.26 (0.96 – 1.66)	<b>0.0456</b>

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza.

Tanto en el total de casos como en los casos con CM familiar, al analizar los ORs obtenidos en heterocigotos y homocigotos para el alelo T, se puede observar el efecto de dosis característico de los alelos de susceptibilidad de baja penetrancia, siendo los ORs, mayores en individuos homocigotos para el alelo de riesgo (alelo T) (Tabla 2). Además, el test de *p*-trend para los genotipos del SNP rs3803662, muestra que la asociación para las variantes alélicas fue dosis-dependiente en la muestra total y en el subgrupo A (*p*-trend<0.0001, en ambos casos). Lo anterior permite concluir que el riesgo para CM aumenta a medida que aumenta el número de alelos de riesgo presentes en el genotipo (efecto aditivo).

#### **4.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13387042 (2q35)**

La tabla 3 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en los distintos grupos en estudio. Se puede observar que el alelo A, descrito en distintos estudios como el alelo de menor frecuencia y de riesgo para CM, presenta mayor frecuencia en el total de casos (0.43) , en los casos con CM familiar (subgrupo A) (0.44) y en los casos con edad de diagnóstico  $\leq 50$  años, sin antecedentes familiares de CM y/o CO (subgrupo B) (0.42), respecto de la frecuencia observada en el grupo control (0.36), siendo las diferencias estadísticamente significativas tanto en la muestra completa (*p*=0.0009, OR: 1.34, IC95%: [1.11 – 1.61]), como en los subgrupos A y B (*p*= 0.0018, OR: 1.38, IC95%: [1.11 – 1.73]); *p*= 0.0421, OR: 1.27, IC95%: [0.96 – 1.67], respectivamente).

El análisis de las frecuencias genotípicas, mostró mayor frecuencia de heterocigotos (G/A) y de homocigotos para el alelo A (A/A) en la muestra completa, respecto de las frecuencias observadas en el grupo control, siendo las diferencias estadísticamente significativas (*p*=0.0165 y *p*=0.0018, respectivamente). También se observó mayor frecuencia del genotipo homocigoto A/A en el subgrupo A (20.9%) respecto de los controles (12.8%), siendo la diferencia estadísticamente significativa (*p*=0.0015, OR: 1.99, IC95%: [1,25-3.14]). Los resultados muestran además, que la condición portadora del alelo A (G/A + A/A) fue más frecuente en los casos versus lo controles, en la muestra total y en ambos subgrupos. Estos resultados permiten concluir que el genotipo portador aumenta en 1.46 veces el riesgo de CM en la muestra total (*p*=0.0029, OR: 1.46, IC95%: [1.11–1.92]);

**Tabla 3**

Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13387042 (2q35)

Genotipo	Controles (N=801)	Total de Casos con CM (N=347)	OR (IC: 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC: 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes familiares de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC: 95%)	P
G/G	329 (41.1%)	112 (32.3%)	Ref.		72 (33.5%)	Ref.		40 (30.3%)	Ref.	
G/A	369 (46.1%)	172 (49.6%)	<b>1.36</b> <b>(1.02 – 1.83)</b>	<b>0.0165</b>	98 (45.6%)	1.21 (0.85 – 1.72)	0.1502	74 (56.1%)	<b>1.64</b> <b>(1.07 – 2.55)</b>	<b>0.0105</b>
A/A	103 (12.8%)	63 (18.1%)	<b>1.79</b> <b>(1.20 – 2.66)</b>	<b>0.0018</b>	45 (20.9%)	<b>1.99</b> <b>(1.25 – 3.14)</b>	<b>0.0015</b>	18 (13.6%)	1.43 (0.74 – 2.69)	0.1515
<i>p</i> -trend				<b>0.0014</b>			<b>0.0032</b>			0.0682
G/A+A/A	472 (58.9%)	235 (67.7%)	<b>1.46</b> <b>(1.11 – 1.92)</b>	<b>0.0029</b>	143 (66.5%)	<b>1.38</b> <b>(1.00 – 1.92)</b>	<b>0.0254</b>	92 (69.7%)	<b>1.60</b> <b>(1.06 – 2.44)</b>	<b>0.0115</b>
Alelo G	0.64	0.57	Ref.		0.56	Ref.		0.58	Ref.	
Alelo A	0.36	0.43	<b>1.34</b> <b>(1.11 – 1.61)</b>	<b>0.0009</b>	0.44	<b>1.38</b> <b>(1.11 – 1.73)</b>	<b>0.0018</b>	0.42	1.27 (0.96 – 1.67)	<b>0.0421</b>

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confianza.

en 1.38 veces en el subgrupo de casos con CM familiar ( $p=0.0254$ , OR: 1.38, IC95%: [1.00 – 1.92]) y en 1.60 veces en el subgrupo de mujeres con edad de diagnóstico  $\leq 50$  años, sin antecedentes familiares de CM y/o CO ( $p= 0.0115$ , OR: 1.60, IC95%: [1.06 – 2.44]).

Al observar los ORs obtenidos en la muestra completa y en el subgrupo A para heterocigotos (G/A) y homocigotos para el alelo de riesgo (A/A), se puede observar el efecto de dosis característico del modelo aditivo propuesto para los alelos de susceptibilidad de baja penetrancia. Además, los valores obtenidos al aplicar el test de  $p$ -trend, permiten confirmar que el riesgo para CM es mayor en los portadores de 2 alelos de riesgo, respecto a quienes portan 1 alelo de riesgo, tanto en la muestra completa como en el subgrupo A ( $p$ -trend=0.0014 y  $p$ -trend=0.0032, respectivamente).

#### **5.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13281615 (8q24)**

El SNP rs13281615 (8q24) presenta 2 alelos, A y G. En distintos estudios realizados principalmente en población Europea, se ha descrito al alelo G como alelo de menor frecuencia y de riesgo para CM. En poblaciones Asiáticas (Japonesa y China) (29, 48, 49), el alelo de menor frecuencia es el alelo A, sin embargo, consideran al alelo G (de mayor frecuencia) como alelo de riesgo para CM.

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos para las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13281615 (8q24), en los distintos grupos en estudio. El alelo G, considerado en distintas poblaciones como el alelo de riesgo para CM, resultó ser el alelo de mayor frecuencia en población Chilena. Sin embargo, no se observó asociación de este alelo con aumento del riesgo para CM. Aunque las frecuencias alélicas observadas para el alelo G en el total de los casos con CM (0,59) y en los subgrupos A (0.58) y B (0.61), fueron mayores a la frecuencia en controles (0.56), no se alcanzó significancia estadística ( $p=0.1288$ ,  $p=0.3109$ ;  $p=0.0934$ , respectivamente).

El análisis de las frecuencias genotípicas, mostró menor frecuencia de los individuos heterocigotos A/G en los casos totales (42.6%) y en los subgrupos A (45.1%) y B (38.6%), respecto de los controles (49.2%), aunque las diferencias no alcanzaron significancia estadística (tabla 4). Tanto en los homocigotos para el alelo de riesgo (G/G), como en los

portadores del alelo de riesgo (A/G + G/G), no se observaron diferencias significativas al comparar la muestra total y los subgrupos A y B, con el grupo control (tabla 4).

**Tabla 4.**

Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs13281615 (8q24)

Genotipo	Controles (N=801)	Total de Casos con CM (N=347)	OR (IC: 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC: 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes familiares de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC: 95%)	P
A/A	152 (19.0%)	68 (19.6%)	Ref.		42 (19.5%)	Ref.		26 (19.7%)	Ref.	
A/G	394 (49.2%)	148 (42.6%)	0.83 (0.58 – 1.20)	0.1808	97 (45.1%)	0.89 (0.58 – 1.37)	0.3239	51 (38.6%)	0.75 (0.44 – 1.31)	0.1724
G/G	255 (31.8%)	131 (37.8%)	1.14 (0.79 – 1.66)	0.2508	76 (35.4%)	1.07 (0.69 – 1.96)	0.4070	55 (41.7%)	1.26 (0.74 – 2.18)	0.2218
<i>p</i> -trend				0.2417			0.5858			0.1715
A/G + G/G	649 (81.0%)	279 (80.4%)	0.96 (0.69 – 1.34)	0.4325	173 (80.5%)	0.96 (0.65 – 1.44)	0.4606	106 (80.3%)	0.95 (0.59 – 1.58)	0.4628
Alelo A	0.44	0.41	Ref.		0.42	Ref.		0.39	Ref.	
Alelo G	0.56	0.59	1.11 (0.92 – 1.34)	0.1288	0.58	1.06 (0.85 – 1.32)	0.3109	0.61	1.20 (0.91 – 1.59)	0.0934

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza

## 6.- Análisis de genotipos combinados para el rs3803662 (*TOX3*) y rs13387042 (2q35)

La tabla 5 muestra la distribución de los genotipos combinados entre el SNP rs3803662 ubicado en una región cercana al extremo 5' del gen *TOX3* y el SNP rs13387042 ubicado en la región cromosómica 2q35, en 347 casos con CM *BRCA* 1/2 negativos, en los subgrupos A y B (n= 215 y n=132, respectivamente) y en 801 controles.

En la muestra completa el genotipo doble heterocigoto para ambos SNPs (C/T – G/A) se asoció significativamente con aumento de riesgo para CM (p<0.001, OR: 2.49, IC95%: [1.53 – 4.06]). Además el genotipo doble homocigoto para los alelos de menor frecuencia de ambos SNPs (T/T – A/A) aumenta el riesgo para CM en 5.33 veces (p=0.002, OR: 5.33, IC95%: [1.88 – 15.07]). Los datos obtenidos para la muestra total muestran que los valores de OR van aumentando a medida que aumenta el número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado. Específicamente, cuando el genotipo combinado incluye 1 alelo de riesgo se obtienen ORs de 1.63 y 1.90; para 2 alelos de riesgo los ORs obtenidos fueron de 2.00, 2.49 y 2.32; para 3 alelos de riesgo se obtuvieron ORs de 3.31 y 3.19, y para 4 alelos de riesgo (doble homocigoto para los alelos de menor frecuencia) el OR fue de 5.33. En consecuencia los resultados de la tabla 5 muestran un aumento del riesgo de desarrollar CM a medida que aumenta el número de alelos de riesgo en el genotipo combinado. Al analizar el subgrupo A que incluye casos con historia familiar para CM, también se observó un aumento de la frecuencia del genotipo doble heterocigoto y del doble homocigoto para los alelos de riesgo respecto de la frecuencia observada en los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa (p=0.002, OR: 2.53, IC95%: [1.41 – 4.57] y p=0,046, OR: 3.76, IC95%: [1.02 – 13.84], respectivamente). En este subgrupo también se observó un aumento significativo del OR a medida que aumenta el número de alelos de riesgo en el genotipo combinado (tabla 5). En el subgrupo B que incluye casos con CM con edad de diagnóstico temprano ( $\leq 50$  años) y sin historia familiar para CM y/o CO, nuevamente el genotipo doble heterocigoto y el genotipo doble homocigoto para los alelos de menor frecuencia se asociaron significativamente con aumento del riesgo para CM (p=0.020, OR: 2.42, IC95%: [1.14 – 5.11] y p=0,002, OR: 8.0, IC95%: [2.20 – 29.04], respectivamente). En este grupo también se observó un aumento del valor de OR a medida que aumenta el número de alelos de riesgo en el genotipo combinado. Es



**Tabla 5**

Distribución de la frecuencia de genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13387042 (2q35)

Genotipos combinados rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) - rs13387042 (2q35)	Controles (N = 801)	Total de casos (N= 347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC 95%)	P
C/C – G/G	128 (16%)	27 (7.8%)	Ref.		17 (7.9%)	Ref.		10 (7.6%)	Ref.	
C/C – G/A	157 (19.6%)	54 (15.6%)	1.63 (0.97 – 2.73)	0.064	21 (9.8%)	1.00 (0.50 – 1.98)	0.984	33 (25.0%)	<b>2.69</b> ( <b>1.27-5.66</b> )	<b>0.009</b>
C/C – A/A	45 (5.6%)	19 (5.5%)	<b>2.00</b> ( <b>1.01 – 3.94</b> )	<b>0.045</b>	16 (7.4%)	<b>2.67</b> ( <b>1.24 – 5.73</b> )	<b>0.011</b>	3 (2.3%)	0.85 (0.22 – 3.23)	0.816
C/T – G/G	152 (19%)	61 (17.6%)	<b>1.90</b> ( <b>1.14 – 3.16</b> )	<b>0.014</b>	40 (18.6%)	<b>1.98</b> ( <b>1.07 – 3.66</b> )	<b>0.029</b>	21 (15.9%)	1.76 (0.80 – 3.89)	0.157
C/T – G/A	169 (21.1%)	89 (25.6%)	<b>2.49</b> ( <b>1.53 – 4.06</b> )	<b>&lt; 0.001</b>	57 (26.5%)	<b>2.53</b> ( <b>1.41 – 4.57</b> )	<b>0.002</b>	32 (24.2%)	<b>2.42</b> ( <b>1.14 – 5.11</b> )	<b>0.020</b>
C/T – A/A	50 (6.2%)	35 (10.1%)	<b>3.31</b> ( <b>1.82 – 6.04</b> )	<b>&lt; 0.001</b>	25 (11.6%)	<b>3.76</b> ( <b>1.87 – 7.56</b> )	<b>&lt; 0.001</b>	10 (7.6%)	<b>2.56</b> ( <b>1.00 – 6.52</b> )	<b>0.049</b>
T/T – G/G	49 (6.1%)	24 (6.9%)	<b>2.32</b> ( <b>1.22 – 4.40</b> )	<b>0.010</b>	15 (7.0%)	<b>2.30</b> ( <b>1.06 – 4.97</b> )	<b>0.033</b>	9 (6.8%)	2.35 (0.90 – 6.13)	0.081
T/T – G/A	43 (5.4%)	29 (8.3%)	<b>3.19</b> ( <b>1.70 – 5.98</b> )	<b>&lt; 0.001</b>	20 (9.3%)	<b>3.50</b> ( <b>1.68 – 7.28</b> )	<b>0.001</b>	9 (6.8%)	<b>2.67</b> ( <b>1.02 – 7.02</b> )	<b>0.045</b>
T/T – A/A	8 (1.0%)	9 (2.6%)	<b>5.33</b> ( <b>1.88–15.07</b> )	<b>0.002</b>	4 (1.9%)	<b>3.76</b> ( <b>1.02–13.84</b> )	<b>0.046</b>	5 (3.8%)	<b>8.0</b> ( <b>2.20-29.04</b> )	<b>0.002</b>

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio, IC: Intervalos de confianza.

importante destacar que las mujeres de este grupo con 4 alelos de menor frecuencia aumentan el riesgo de desarrollar CM en 8 veces.

Considerando el aumento de los ORs a medida que aumenta el número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado, se evaluó efecto aditivo agrupando los genotipos combinados según el número de alelos de riesgo (0, 1, 2, 3 y 4 alelos de riesgo). Se consideró como referencia al grupo portador de 0 alelo de riesgo (genotipo doble homocigoto para el alelo de mayor frecuencia). La tabla 6 muestra las frecuencias obtenidas para cada grupo de portadores de alelos de riesgo, tanto en los controles como en el total de casos y en los subgrupos A y B, y los valores para *p*-trend asociados a cada grupo en estudio. Los valores para *p*-trend obtenidos en la muestra completa y en los subgrupos A y B (*p*-trend<0.0001, *p*-trend<0.0001 y *p*-trend= 0.0091, respectivamente), permiten confirmar estadísticamente que el riesgo para CM es mayor a medida que aumenta el número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13387042 (2q35) (efecto aditivo).

Además del efecto aditivo, se analizó interacción aditiva y multiplicativa. Para este análisis, los genotipos combinados se agruparon según el número de alelos de riesgo que portaban (2, 3 o 4 alelos de riesgo). Se consideró como genotipo combinado de referencia, al genotipo portador de 2 alelos de riesgo, uno para cada SNP (C/C + C/T para rs3803662 y G/G + G/A para rs13387042). La tabla 7 muestra las frecuencias de los genotipos combinados según número de alelos de riesgo para análisis de interacción génica. Al analizar el total de casos, en este grupo se observó mayor frecuencia de portadores de 3 y 4 alelos de riesgo (15.3%, 15.5% y 2.6%, respectivamente) respecto de la frecuencia observada en los controles (11.5%, 11.9% y 1.0%, respectivamente), siendo las diferencias estadísticamente significativas (*p*=0.029, OR: 1.51, IC95%: [1.04 – 2.18]; *p*=0.033, OR: 1.49, IC95%: [1.03 – 2.15] y *p*=0.028, OR: 2.95, IC95%: [1.12 – 7.74], respectivamente). Se observó además, que los valores de OR son similares en los portadores de 3 alelos de riesgo, independientemente de si dos de los alelos de riesgo son aportados por el SNP rs3803662 o si son aportados por el SNP rs13387042, y que el valor aumenta aproximadamente al doble en los portadores de 4 alelos de riesgo (tabla 7). Lo anterior, valida el efecto aditivo mostrado por el *p*-trend. Resulta interesante entonces, analizar si además del efecto aditivo existe interacción entre ambos SNPs. Al evaluar en la muestra

completa la interacción aditiva (AP: 0.32, IC95%: [-0.50 – 1.14, p=0.445]) y multiplicativa (razón de OR: 1.31, IC95%: [0.44 – 3.83], p=0.623), los valores obtenidos para los intervalos de confianza y p, no permiten concluir interacción entre ambos SNPs en este grupo.

El mismo tipo de análisis se realizó para el subgrupo A. Los resultados mostraron que las frecuencias de los portadores de 3 alelos de riesgo fue mayor en los casos (16.3% y 19.1%) respecto de los controles (11.5% y 11.9%), siendo las diferencias estadísticamente significativas (tabla 6). Sin embargo, cuando se comparó la frecuencia de portadores de 4 alelos de riesgo entre los casos del subgrupo A y los controles (1.8% y 1.0%, respectivamente), no se alcanzó significancia estadística (p= 0.192, OR: 2.24, IC95%: [0.66 – 7.56]). Al analizar interacción aditiva y multiplicativa, los resultados permiten concluir que no existe interacción entre el SNP rs3803662 (TOX 3) y el SNP rs13387042 (2q35), en el subgrupo de casos con CM familiar (AP: -0.18, IC95%: [-1.95 – 1.59], p=0.84 y razón de OR: 0.68, IC95%: [0.17 – 2.55], p=0.567, respectivamente).

En el subgrupo B (mujeres con CM sin historia familiar para CM y/o CO y con edad de diagnóstico temprano), se observó que las frecuencias de los genotipos combinados portadores de 3 alelos de riesgo, no presentan diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan con las frecuencias obtenidas en el grupo control (tabla 6). Sin embargo, al analizar la frecuencia del genotipo combinado portador de 4 alelos de riesgo (doble homocigoto de riesgo), se observó mayor frecuencia en el subgrupo B (3.8%) respecto de la observada en controles (1.0%), siendo la diferencia estadísticamente significativa (p=0.018, OR: 3.94, IC95%: [1.26 – 12.31]). El análisis de interacción entre el SNP rs3803662 (TOX 3) y el SNP rs13387042 (2q35) fue estadísticamente significativo para interacción aditiva (AP: 0.72, IC95%: [0.28 – 1.16], p=0.001) y negativo para interacción multiplicativa (razón de OR: 3.69, IC95%: [0.93 – 14.60], p=0.062). En consecuencia, los resultados obtenidos para AP, permiten concluir que existe interacción entre ambos SNPs en el subgrupo B y que esta interacción actúa en forma aditiva.

**Tabla 6**

Efecto aditivo de los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13387042 (2q35) sobre el riesgo para  
CM

Número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado (a)	Controles (N=801)	Total de casos (N= 347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC 95%)	P
0 alelos de riesgo	128 (16.0%)	27 (7.8%)	Ref.		17 (7.9%)	Ref.		10 (7.6%)	Ref.	
1 alelo de riesgo	309 (38.6%)	115 (33.1%)	<b>1.76</b> <b>(1.10-2.81)</b>	<b>0.017</b>	61 (28.4%)	1.48 (0.83-2.64)	0.177	54 (40.9%)	<b>2.23</b> <b>(1.10-4.52)</b>	<b>0.025</b>
2 alelos de riesgo	263 (32.8%)	132 (38.1%)	<b>2.37</b> <b>(1.49 – 3.78)</b>	<b>&lt;0.001</b>	88 (40.9%)	<b>2.51</b> <b>(1.43-4.41)</b>	<b>0.001</b>	44 (33.3%)	<b>2.14</b> <b>(1.04-4.39)</b>	<b>0.038</b>
3 alelos de riesgo	93 (11.6%)	64 (18.4%)	<b>3.26</b> <b>(1.93 – 5.50)</b>	<b>&lt;0.001</b>	45 (20.9%)	<b>3.64</b> <b>(1.96 – 6.76)</b>	<b>&lt;0.001</b>	19 (14.4%)	<b>2.61</b> <b>(1.16-5.88)</b>	<b>0.020</b>
4 alelos de riesgo	8 (1.0%)	9 (2.6%)	<b>5.33</b> <b>(1.8 –15.07)</b>	<b>0.002</b>	4 (1.9%)	<b>3.76</b> <b>(1.02-13.84)</b>	<b>0.046</b>	5 (3.8%)	<b>8.0</b> <b>(2.20-29.04)</b>	<b>0.002</b>
<i>p</i> -trend				<b>&lt;0.0001</b>			<b>&lt;0.0001</b>			<b>0.0091</b>
<i>p</i> -Global				<b>&lt;0.001</b>			<b>&lt;0.001</b>			<b>0.013</b>

(a): 0 alelo de riesgo: C/C - G/G; 1 alelo de riesgo: C/C – G/A, C/T – G/G; 2 alelos de riesgo: C/C – A/A, C/T – G/A, T/T – G/G; 3 alelos de riesgo: C/T – A/A, T/T – G/A; 4 alelos de riesgo: T/T – A/A.

CM: Cáncer de mama, CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza.

**Tabla 7**

Análisis de interacción aditiva y multiplicativa entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13387042 (2q35)

Genotipos combinados rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) - rs13387042 (2q35)	Controles (N = 801)	Total de casos (N= 347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC 95%)	P
(C/C+C/T)-(G/G+G/A)	606 (75.6%)	231 (66.6%)	Ref.		135 (62.8%)	Ref.		96 (72.7%)	Ref.	
T/T-(G/G + G/A)	92 (11.5%)	53 (15.3%)	<b>1.51</b> <b>(1.04 – 2.18)</b>	<b>0.029</b>	35 (16.3%)	<b>1.70</b> <b>(1.10-2.62)</b>	<b>0.015</b>	18 (13.6%)	1.23 (0.71 – 2.13)	0.451
(C/C + C/T)-A/A	95 (11.9%)	54 (15.5%)	<b>1.49</b> <b>(1.03 – 2.15)</b>	<b>0.033</b>	41 (19.1%)	<b>1.93</b> <b>(1.28 – 2.92)</b>	<b>0.002</b>	13 (9.9%)	0.86 (0.46 – 1.60)	0.643
T/T-A/A	8 (1.0%)	9 (2.6%)	<b>2.95</b> <b>(1.12 – 7.74)</b>	<b>0.028</b>	4 (1.8%)	2.24 (0.66 – 7.56)	0.192	5 (3.8%)	<b>3.94</b> <b>(1.26-12.31)</b>	<b>0.018</b>
Medición de la interacción aditiva (AP)	0.32 (-0.50 – 1.14), p=0.445				-0.18 (-1.95 – 1.59), p=0.843			<b>0.72 (0.28 – 1.16), p=0.001</b>		
Medición de la interacción multiplicativa (Razón de ORs)	1.31 (0.44 – 3.83), p=0.623				0.68 (0.17 – 2.55), p=0.567			3.69 (0.93 – 14.60), p=0.062		

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; AP: Proporción atribuible a la interacción.

## 7.- Análisis de genotipos combinados para el rs3803662 (*TOX3*) y rs13281615 (8q24)

La tabla 8 muestra la distribución de las frecuencias de los genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13281615 (8q24), en 347 casos con CM *BRCA* 1/2 negativos, en los subgrupos A y B (n=215 y n=132, respectivamente) y en 801 controles.

En la muestra completa, el genotipo combinado heterocigoto para rs3803662 (C/T) y homocigoto de riesgo para rs13281615 (G/G) (genotipo combinado portador de 3 alelos de riesgo), se asoció significativamente con aumento de riesgo para CM (p=0.034, OR 1.85, IC95%: [1.04 – 3.28]). No se observaron diferencias estadísticamente significativas, ni asociación con aumento del riesgo para CM en los demás genotipos combinados. Tampoco se observa aumento de los ORs, al aumentar el número de alelos de riesgo presentes en los genotipos combinados.

Al analizar los casos con CM familiar (subgrupo A), se observaron diferencias significativas en la frecuencia del genotipo combinado portador de 2 alelos de riesgo homocigoto de riesgo para rs3803662 y homocigoto normal para rs1328615 (T/T-A/A) (p=0.041, OR: 2.93, IC95%: [1.04 – 8.23]). Además, también se observó diferencia significativa para los genotipos portadores de 3 alelos de riesgo: C/T-G/G (p=0.046, OR: 2.09, IC95%: [1.01 - 4.32]) y T/T-A/G (p=0.032, OR: 2.50, IC95%: [1.08 – 5.81]). Sin embargo, se puede observar que los valores de OR no aumentan a medida que aumenta el número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado.

En el subgrupo B (casos con CM con edad de diagnóstico  $\leq 50$  años sin antecedentes familiares de CM y/o CO), no se observaron diferencias estadísticamente significativas, ni asociación con aumento del riesgo para CM, para ninguno de los genotipos combinados (tabla 8).

Tanto en la muestra total como en los subgrupos A y B, si bien los valores de OR obtenidos para los distintos genotipos combinados no presentan aumento en base al número de alelos de riesgo, se evaluó el efecto aditivo que pudiera tener el número de alelos de riesgo presentes en cada genotipo, sobre el riesgo para CM. Para realizar este análisis, se calculó *p*-trend agrupando a los genotipos combinados en 5 categorías en base al número de alelos de riesgo (0, 1, 2, 3 y 4 alelos), considerando como referencia al grupo portador de 0 alelo de riesgo. La tabla 9 muestra las frecuencias de los genotipos

**Tabla 8**

Distribución de la frecuencia de genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13281615 (8q24)

Genotipos combinados rs3803662 (TOX3) – rs13281615 (8q24)	Controles (N = 801)	Total de casos (N=347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO. (N = 132)	OR (IC 95%)	P
C/C – A/A	61 (7.6%)	21 (6.1%)	Ref.		11 (5.1%)	Ref.		10 (7.6%)	Ref.	
C/C – A/G	177 (22.1%)	48 (13.8%)	0.78 (0.43- 1.42)	0.428	24 (11.2%)	0.75 (0.34 – 1.62)	0.468	24 (18.2%)	0.82 (0.37 – 1.82)	0.639
C/C – G/G	92 (11.5%)	31 (8.9%)	0.97 (0.51 – 1.85)	0.948	19 (8.8%)	1.14 (0.50 – 2.57)	0.743	12 (9.1%)	0.79 (0.32 – 1.95)	0.618
C/T – A/A	74 (9.2%)	34 (9.8%)	1.33 (0.70 – 2.53)	0.377	22 (10.2%)	1.64 (0.74 – 3.66)	0.220	12 (9.1%)	0.98 (0.40 – 2.44)	0.981
C/T – A/G	175 (21.9%)	73 (21.0%)	1.21 (0.68 – 2.13)	0.506	54 (25.1%)	1.71 (0.84 – 3.48)	0.139	19 (14.4%)	0.66 (0.29 – 1.50)	0.324
C/T – G/G	122 (15.2%)	78 (22.5%)	<b>1.85 (1.04 – 3.28)</b>	<b>0.034</b>	46 (21.4%)	<b>2.09 (1.01 – 4.32)</b>	<b>0.046</b>	32 (24.2%)	1.60 (0.73 – 3.46)	0.234
T/T – A/A	17 (2.1%)	13 (3.8%)	2.22 (0.92 – 5.33)	0.074	9 (4.2%)	<b>2.93 (1.04 – 8.23)</b>	<b>0.041</b>	4 (3.0%)	1.43 (0.39 – 5.15)	0.579
T/T – A/G	42 (5.2%)	27 (7.8%)	1.86 (0.93 – 3.73)	0.077	19 (8.8%)	<b>2.50 (1.08 – 5.81)</b>	<b>0.032</b>	8 (6.1%)	1.16 (0.42 – 3.18)	0.771
T/T – G/G	41 (5.1%)	22 (6.3%)	1.55 (0.76 – 2.19)	0.225	11 (5.1%)	1.48 (0.59 – 3.75)	0.400	11 (8.3%)	1.63 (0.63 – 4.20)	0.306

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio, IC: Intervalos de confianza.

combinados según el número de alelos de riesgos en el grupo control, en la muestra completa y en los subgrupos A y B, y los valores para  $p$ -trend en los distintos grupos en estudio. Tanto en la muestra completa como en los subgrupos A y B, los valores de  $p$ -trend obtenidos ( $p$ -trend=0.0004,  $p$ -trend=0.0013 y  $p$ -trend=0.0329), muestran un efecto aditivo entre los SNPs rs3803882 (TOX 3) y rs13281615 (8q24), así, a medida que aumenta el número de alelos de riesgo, también aumenta el riesgo de CM.

Posteriormente se evaluó interacción aditiva y multiplicativa, agrupando a los genotipos combinados en portadores de 2, 3 y 4 alelos de riesgo. Para realizar el análisis se consideró el genotipo combinado portador de 2 alelos de riesgo como genotipo de referencia ((C/C + C/T) – (A/G + A/A)). La tabla 10 muestra los resultados del análisis de interacción aditiva y multiplicativa entre el SNP rs3803662 (TOX 3) y el SNP rs13281615 (8q24). Los valores obtenidos para la interacción aditiva y multiplicativa en la muestra completa (AP: -0.53, IC95%: [-1.52 – 0.44],  $p$ =0.284 y razón de ORs: 0.56, IC95%: [0.27 – 1.14],  $p$ =0.114, respectivamente), en el subgrupo A (AP: -1.05, IC95%: [-2.69 – 0.59],  $p$ =0.210 y razón de ORs: 0.42, IC95%: [0.17 – 1.01],  $p$ =0.055, respectivamente) y en el subgrupo B (AP: -0.02, IC: [-0.92 – 0.86],  $p$ = 0.953 y razón de ORs: 0.85, IC95%: [0.31 – 2.32],  $p$ =0.761), descartan interacción entre ambos SNPs.



**Tabla 9**

Efecto aditivo de los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13281615 (8q24) sobre el riesgo para CM

Número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado (a)	Controles (N=801)	Total de casos (N=347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC 95%)	P
0 alelos de riesgo	61 (7.6%)	21 (6.1%)	Ref.		11 (5.1%)	Ref.		10 (7.6%)	Ref.	
1 alelo de riesgo	251 (31.3%)	82 (23.6%)	0.94 (0.54–1.65)	0.853	46 (21.4%)	1.01 (0.49–2.07)	0.965	36 (27.3%)	0.87 (0.41–1.86)	0.728
2 alelos de riesgo	284 (35.5%)	117 (33.7%)	1.19 (0.69–2.05)	0.515	82 (38.1%)	1.60 (0.80–3.18)	0.180	35 (26.5%)	0.75 (0.35–1.59)	0.459
3 alelos de riesgo	164 (20.5%)	105 (30.3%)	<b>1.85 (1.06–3.23)</b>	<b>0.028</b>	65 (30.2%)	<b>2.19 (1.08–4.44)</b>	<b>0.028</b>	40 (30.3%)	1.48 (0.70–3.15)	0.301
4 alelos de riesgo	41 (5.1%)	22 (6.3%)	1.55 (0.76–3.19)	0.225	11 (5.1%)	1.48 (0.59–3.75)	0.400	11 (8.3%)	1.63 (0.63–4.20)	0.306
<i>p</i> -trend				<b>0.0004</b>			<b>0.0013</b>			<b>0.0329</b>
<i>p</i> -Global				<b>0.002</b>			<b>0.005</b>			<b>0.035</b>

(a): 0 alelo de riesgo: C/C - G/G; 1 alelo de riesgo: C/C – G/A, C/T – G/G; 2 alelos de riesgo: C/C – A/A, C/T – G/A, T/T – G/G; 3 alelos de riesgo: C/T – A/A, T/T – G/A; 4 alelos de riesgo: T/T – A/A.

CM: Cáncer de mama, CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza.

**Tabla 10**

Análisis de interacción aditiva y multiplicativa entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13281615 (8q24)

Genotipos combinados rs3803662 ( <i>TOX3</i> ) - rs13281615 (8q24)	Controles (N=801)	Total de casos (N= 347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC 95%)	P
(C/C+C/T)-(A/G+A/A)	487 (60.8%)	176 (50.7%)	Ref.		111 (51.6%)	Ref.		65 (49.2%)	Ref.	
T/T-(A/G+A/A)	59 (7.4%)	40 (11.5%)	<b>1.87</b> ( <b>1.21 – 2.90</b> )	<b>0.005</b>	28 (13.0%)	<b>2.08</b> ( <b>1.26 – 3.41</b> )	<b>0.004</b>	12 (9.1%)	1.52 (0.77 – 2.98)	0.220
(C/C + C/T)-G/G	214 (26.7%)	109 (31.4%)	<b>1.40</b> ( <b>1.05 – 1.87</b> )	<b>0.020</b>	65 (30.2%)	1.33 (0.94 – 1.88)	0.104	44 (33.3%)	<b>1.54</b> ( <b>1.01 – 2.33</b> )	<b>0.041</b>
T/T-G/G	41 (5.1%)	22 (6.3%)	1.48 (0.86 – 2.56)	0.156	11 (5.1%)	1.17 (0.58 – 2.36)	0.646	11 (8.3%)	2.01 (0.98 – 4.10)	0.055
Medición de la interacción aditiva (AP)	-0.53 (-1.52 – 0.44); p=0.284				-1.05 (-2.69 – 0.59); p=0.210			-0.02 (-0.92 – 0.86); p=0.953		
Medición de la interacción multiplicativa (Razón de ORs)	0.56 (0.27 – 1.14); p=0.114				0.42 (0.17 – 1.01); p=0.055			0.85 (0.31 – 2.32); p=0.761		

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; AP: Proporción atribuible a la interacción.

## 8.- Análisis de genotipos combinados para el rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24)

La tabla 11 muestra la distribución de las frecuencias de los genotipos combinados entre los SNPs rs13387042 ubicado en la región cromosómica 2q35 y rs13281615 en la región cromosómica 8q24, en 347 casos con CM *BRCA* 1/2 negativos, en los subgrupos A y B (n=215 y n=132, respectivamente) y en 801 controles.

En la muestra completa, el genotipo combinado doble homocigoto de riesgo (A/A-G/G), se asoció significativamente con aumento de riesgo para CM ( $p=0.013$ , OR: 2.49, IC95%: [1.20 – 5.16]). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y la muestra completa en la frecuencia de los demás genotipos combinados.

Al analizar el subgrupo de casos con CM familiar (subgrupo A), los resultados fueron similares a los obtenidos en la muestra completa: el genotipo combinado A/A – G/G, aumentó el riesgo para CM en 2.70 veces ( $p=0.017$ , OR: 2.70, IC95%: [1.19 – 6.13]). Los restantes genotipos combinados, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles.

En el subgrupo B (casos con CM sin antecedentes familiares de CM y/o CO y diagnóstico temprano de CM), no se observaron diferencias significativas ni asociación con aumento de riesgo para CM, en los distintos genotipos combinados respecto de las frecuencias obtenidas en el grupo control. Los valores de OR no presentaron aumento al aumentar el número de alelos de riesgo presentes en cada genotipo combinado.

Además, se evaluó efecto aditivo entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24) sobre el riesgo para CM. Para este análisis, los genotipos combinados se agruparon según el número de alelos de riesgo presentes (0, 1, 2, 3 y 4 alelos) y se consideró como referencia al grupo portador de 0 alelo de riesgo. La tabla 12 muestra las frecuencias de los distintos grupos de portadores de alelos de riesgo para controles, total de casos con CM y subgrupos A y B, así como los resultados obtenidos para *p*-trend en cada grupo en estudio. Los valores obtenidos para *p*-trend tanto en la muestra completa como en los subgrupos A y B (*p*-trend= 0.0021, *p*-trend=0.0137 y *p*-trend=0.0227, respectivamente) muestran efecto aditivo entre el número de alelos presentes en los distintos genotipos combinados entre rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24), sobre el riesgo para CM. Con estos antecedentes,

**Tabla 11**

Distribución de la frecuencia de genotipos combinados entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24)

Genotipos combinados Rs13387042 (2q35) – rs13281615 (8q24)	Controles (N = 801)	Total de casos (N=347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO. (N = 132)	OR (IC 95%)	P
G/G – A/A	58 (7.2%)	19 (5.5%)	Ref.		13 (6.1%)	Ref.		6 (4.5%)	Ref.	
G/G – A/G	162 (20.2%)	46 (13.3%)	0.86 (0.56 – 1.59)	0.648	31 (14.4%)	0.85 (0.41 – 1.74)	0.664	15 (11.4%)	0.89 (0.33 – 2.41)	0.827
G/G – G/G	109 (13.6%)	47 (13.5%)	1.31 (0.70 – 2.44)	0.386	28 (13.0%)	1.14 (0.55 – 2.38)	0.715	19 (14.4%)	1.68 (0.63 – 4.45)	0.293
G/A – A/A	76 (9.5%)	35 (10.1%)	1.40 (0.73 – 2.70)	0.308	20 (9.3%)	1.17 (0.53 – 2.55)	0.686	15 (11.4%)	1.90 (0.69 – 5.22)	0.208
G/A – A/G	180 (22.5%)	80 (23.1%)	1.35 (0.75 – 2.42)	0.304	50 (23.3%)	1.23 (0.62 – 2.44)	0.535	30 (22.7%)	1.61 (0.63 – 4.06)	0.312
G/A – G/G	113 (14.1%)	57 (16.4%)	1.53 (0.83 – 2.82)	0.164	28 (13.0%)	1.10 (0.53 – 2.29)	0.788	29 (22.0%)	2.48 (0.97 – 6.31)	0.057
A/A – A/A	18 (2.3%)	14 (4.0%)	2.37 (0.99 – 5.66)	0.051	9 (4.2%)	2.23 (0.81 – 6.06)	0.116	5 (3.8%)	2.68 (0.73 – 9.84)	0.136
A/A – A/G	52 (6.5%)	22 (6.3%)	1.29 (0.62 – 2.65)	0.486	16 (7.4%)	1.37 (0.60 – 3.12)	0.450	6 (4.5%)	1.11 (0.33 – 3.67)	0.857
A/A – G/G	33 (4.1%)	27 (7.8%)	<b>2.49 (1.20 – 5.16)</b>	<b>0.013</b>	20 (9.3%)	<b>2.70 (1.19 – 6.13)</b>	<b>0.017</b>	7 (5.3%)	2.05 (0.63 – 6.61)	0.229

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio, IC: Intervalos de confianza.

se evaluó interacción entre ambos SNPs, en el modelo de interacción aditiva y multiplicativa. La tabla 13 muestra los resultados obtenidos para ambos tipos de interacción, en la muestra total y en los subgrupos A y B. Los valores obtenidos para AP y razón de ORs en la muestra total y en ambos subgrupos, descartan interacción entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24).

**Tabla 12**

Efecto aditivo de los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24) sobre el riesgo para  
CM

Número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado (a)	Controles (N=801)	Total de casos (N=347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC 95%)	P
0 alelos de riesgo	58 (7.2%)	19 (5.5%)	Ref.		13 (6.0%)	Ref.		6 (4.6%)	Ref.	
1 alelo de riesgo	238 (29.7%)	81 (23.3%)	1.03 (0.58 – 1.84)	0.897	51 (23.7%)	0.95 (0.48 – 1.87)	0.896	30 (22.7%)	1.21 (0.48 – 3.06)	0.675
2 alelos de riesgo	307 (38.3%)	141 (40.6%)	1.40 (0.80 – 2.44)	0.233	87 (40.5%)	1.26 (0.66 – 2.41)	0.477	54 (40.9%)	1.70 (0.69 – 4.13)	0.242
3 alelos de riesgo	165 (20.6%)	79 (22.8%)	1.46 (0.81 – 2.61)	0.202	44 (20.5%)	1.18 (0.59 – 2.36)	0.620	35 (26.5%)	2.05 (0.82 – 5.12)	0.125
4 alelos de riesgo	33 (4.1%)	27 (7.8%)	<b>2.49 (1.20 – 5.16)</b>	<b>0.013</b>	20 (9.3%)	<b>2.70 (1.19 – 6.13)</b>	<b>0.017</b>	7 (5.3%)	2.05 (0.63 – 6.61)	0.229
<i>p</i> -trend				<b>0.0021</b>			<b>0.0137</b>			<b>0.0227</b>
<i>p</i> -Global				0.019			0.022			0.236

(a): 0 alelo de riesgo: G/G - G/G; 1 alelo de riesgo: G/G - G/A, G/A - G/G; 2 alelos de riesgo: G/G - A/A, G/A - G/A, A/A - G/G; 3 alelos de riesgo: G/A - A/A, A/A - G/A; 4 alelos de riesgo: A/A - A/A.

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de confianza.

**Tabla 13**

Análisis de interacción aditiva y multiplicativa entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24)

Genotipos Combinados rs13387042 (2q35) - rs13281615 (8q24)	Controles (N = 801)	Total de casos (N= 347)	OR (IC 95%)	P	Casos con CM familiar (N=215)	OR (IC 95%)	P	Casos con edad de diagnóstico ≤ 50 años, sin antecedentes de CM y/o CO (N = 132)	OR (IC 95%)	P
(G/G+G/A)-(A/G+A/A)	476 (59.4%)	180 (51.9%)	Ref.		114 (53.0%)	Ref.		66 (50.0%)	Ref.	
A/A-(A/G+A/A)	70 (8.7%)	36 (10.4%)	1.36 (0.87 – 2.10)	0.168	25 (11.6%)	1.49 (0.90 – 2.45)	0.117	11 (8.3%)	1.13 (0.57 – 2.25)	0.721
(G/G + G/A)-G/G	222 (27.7%)	104 (29.9%)	1.23 (0.92 – 1.65)	0.147	56 (26.1%)	1.05 (0.73 – 1.50)	0.776	48 (36.4%)	<b>1.55</b> <b>(1.04 – 2.33)</b>	<b>0.031</b>
A/A-G/G	33 (4.1%)	27 (7.8%)	<b>2.16</b> <b>(1.26 – 3.70)</b>	<b>0.005</b>	20 (9.3%)	<b>2.53</b> <b>(1.40 – 4.57)</b>	<b>0.002</b>	7 (5.3%)	1.52 (0.65 – 3.59)	0.330
Medición de la interacción aditiva (AP)	0.26 (-0.24 – 0.76); p=0.309				0.38 (-0.06 – 0.84); p=0.091			-0.10 (-1.36 – 1.15); p=0.868		
Medición de la interacción multiplicativa (Razón de ORs)	1.28 (0.63 – 2.61); p=0.490				1.61 (0.72 – 3.59); p=0.244			0.86 (0.28 – 2.62); p=0.799		

CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; AP: Proporción atribuible a la interacción.

## VI.- DISCUSIÓN.

El panorama actual de susceptibilidad al CM involucra 3 categorías de genes, de acuerdo al perfil de riesgo que confieren (5, 9, 12):

- 1.- Genes de alta penetrancia: Confieren un alto riesgo relativo para CM, del orden de 10 a 20 veces (5, 9), pero las mutaciones en estos genes son poco frecuente.
- 2.- Genes de moderada penetrancia: Confieren un riesgo relativo para CM del orden de 2 a 4 veces (9).
- 3.- Alelos de baja penetrancia: Confieren aumentos discretos del riesgo para CM, que varían entre 1.10 a 1.60 veces (5, 11).

En los últimos años, los estudios de asociación de genoma extenso (GWAS) han permitido la búsqueda, en todo el genoma, de variantes de susceptibilidad al CM, centrándose en la identificación de alelos de baja penetrancia. Estos alelos, al ser comunes en la población, podrían ser responsables de un porcentaje importante de casos de CM BRCA 1/2 negativos (4, 9, 17). Actualmente, se han identificado alrededor de 20 alelos de baja penetrancia asociados al desarrollo de CM, principalmente en población Europea, Asiática y Afroamericana (23, 24, 31, 32, 34). Sin embargo, no se han publicado trabajos similares realizados en población Latinoamericana. En esta tesis, se estudiaron en población Chilena, tres de los alelos descritos en la literatura como variantes de susceptibilidad de baja penetrancia (23, 24) y se analizó su asociación con el riesgo de CM. Las variantes analizadas fueron las siguientes: el SNP rs3803662 asociado al gen *TOX3* en el cromosoma 16, el SNP rs13387042 ubicado en la región cromosómica 2q35, y el SNP rs13281615 ubicado en la región cromosómica 8q24.

### - Asociación del SNP rs3803662 (*TOX3*) con CM:

El SNP rs3803662 (C/T), ubicado en una región cercana al extremo 5' del gen *TOX3* en el cromosoma 16, se ha asociado con aumento del riesgo para CM en distintos estudios realizados principalmente en población Europea y Asiática, y se ha propuesto al alelo T como un alelo de riesgo de baja penetrancia que aumenta el riesgo del desarrollo de esta patología (21, 22, 25, 29, 30). Easton y col. (21), fueron los primeros autores en describir la asociación de este SNP con CM. Estos autores describieron aumento del



riesgo para CM de 1.23 y 1.39 veces en individuos heterocigotos (C/T) y homocigotos para el alelo de riesgo (T/T) respectivamente. Estudios posteriores en población Europea y Asiática, han replicado los resultados obtenidos por Easton y col., obteniendo aumentos del riesgo para CM que varían entre 1.12 y 2.39 veces, y observándose siempre, mayor aumento del riesgo en individuos homocigotos para el alelo T (10, 22, 29, 30, 44). Sin embargo, estudios realizados en población Afroamericana, no muestran asociación de este SNP con aumento del riesgo para CM (32, 33).

En relación con los resultados obtenidos en esta tesis, éstos concuerdan con los obtenidos por Easton y col (21). En la muestra total de casos con CM de población Chilena, se observó aumento del riesgo tanto en heterocigotos (OR: 1.64) como en homocigotos (OR: 2.04), siendo los valores de OR mayores que los descritos por Easton y col (21). La literatura señala que existe una mayor probabilidad de identificar genes de susceptibilidad en casos con historia familiar de CM, y que en las mujeres con edad de diagnóstico temprano ( $\leq 50$  años) y sin antecedentes de CM, existiría una susceptibilidad genética asociada a otros genes distintos a *BRCA 1* y *BRCA 2*. Por lo anterior, en este trabajo los casos se clasificaron en 2 subgrupos, considerando la historia familiar de CM, lo que es importante ya que la mayoría de los estudios publicados en relación con el SNP rs3803662 y riesgo de CM, no han clasificado los casos por historia familiar de CM. Latif y col. (10) analizaron la asociación entre este SNP y CM en 674 individuos *BRCA 1/2* negativos con fuerte historia familiar de CM. Los autores encontraron mayor frecuencia del alelo T en los casos respecto de los controles, siendo la diferencia significativa (OR: 1.50; IC95%: [1.22-1.85];  $p < 0.001$ ). Además, observaron aumento del riesgo para CM en los heterocigotos C/T y en los homocigotos T/T (OR: 1.46, OR: 2.39, respectivamente). Los resultados de esta tesis, muestran que el alelo T del SNP rs3803662 se asocia significativamente con aumento del riesgo para CM en los casos con historia familiar de CM (OR: 1.57), siendo mayor la asociación en los homocigotos T/T (OR: 2.38) que en los heterocigotos C/T (OR: 2.00). Estos resultados son similares a los obtenidos por Latif y col (10). En cambio, en el grupo de casos sin historia familiar de CM y diagnóstico temprano ( $\leq 50$  años) el riesgo de CM no se ve influenciado por la exposición al alelo de riesgo (alelo T).

Además, en esta tesis también se observó el efecto de dosis descrito para algunos alelos de baja penetrancia, observándose mayor aumento del riesgo a medida que aumenta el número de alelos de riesgo de este SNP (alelo T).

En consecuencia, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten postular que: a) el SNP rs3803662 se asocia con aumento de riesgo para CM en población Chilena; b) el alelo T es un alelo de riesgo de baja penetrancia para el desarrollo de CM en población Chilena; c) La asociación de rs3803662 con aumento del riesgo para CM, afecta a mujeres con historia familiar de CM; y d) El rs3803662 no produce aumento del riesgo en las mujeres con diagnóstico temprano de CM, sin historia familiar para la enfermedad. Sin embargo, este último resultado, podría ser consecuencia del n muestral del subgrupo B.

#### **- Asociación del SNP rs13387042 (2q35) con CM:**

El SNP rs13387042 (G/A), ubicado en la región cromosómica 2q35, se ha asociado con riesgo para CM principalmente en población Europea, y se ha propuesto al alelo A como un alelo de riesgo de baja penetrancia para el desarrollo de esta patología (22, 38).

Stacey y col (22), fueron los primeros en describir asociación entre el SNP rs13387042 y CM. Los autores encontraron que, en población Europea, el alelo A (alelo de menor frecuencia) aumenta el riesgo para CM en 1.20 veces, y que los heterocigotos G/A y los homocigotos para el alelo de riesgo (A/A), aumentan el riesgo para CM en 1.11 y 1.44 veces, respectivamente. Además, describieron aumento del riesgo para CM en los casos positivos para el receptor de estrógenos (ER+). Posteriormente, Milne y col. (38), también en población Europea, obtuvieron resultados similares respecto a la asociación entre el alelo A del SNP rs13387042, pero con valores de OR más discretos: 1.12 para el alelo A, 1.07 para heterocigotos G/A y 1.25 para homocigotos A/A. Lo interesante de este estudio, es que se observó aumento del riesgo tanto en mujeres ER+ y ER- (discretamente mayor en ER+) y en casos esporádicos y con historia familiar de CM, siendo significativamente mayor en este último grupo (OR: 1.12 y OR: 1.20, respectivamente; p=0.02). Estudios posteriores también realizados en población Europea (28, 34, 44), han obtenido resultados similares a los de Milne y col. (38). Sin embargo, los resultados obtenidos en otras poblaciones, son diferentes. En población China (30) y Japonesa (45), no se encontró asociación del SNP rs13387042 con aumento del riesgo para CM. En cambio, estudios

recientes realizados en población China (46) y Taiwanesa (39) sí muestran asociación entre el alelo A de este SNP y aumento del riesgo para CM. Una situación similar se observa en estudios realizados en población con ancestros Africanos (32, 47).

Los resultados obtenidos en esta tesis, concuerdan con los obtenidos por Stacey y col (22). En población Chilena se observó mayor frecuencia del alelo de riesgo (alelo A) en casos versus controles, siendo la diferencia significativa y la fuerza de la asociación mayor que la descrita por Stacey y col. (22), tanto para la frecuencia del alelo A, como para heterocigotos G/A y homocigotos A/A (OR: 1.34, OR: 1.36 y OR: 1.79, respectivamente). Cabe destacar que los valores de ORs obtenidos en este trabajo, son mayores a los descritos en los estudios realizados en población Europea, los que varían entre 1.07 y 1.44 (20, 27, 34, 33, 46). En relación con el análisis en los subgrupos, los resultados obtenidos en el subgrupo A (casos con CM familiar), son similares a los obtenidos por Milne y col. (38), con un valor de OR mayor al obtenido por estos autores (OR: 1.38 v/s OR: 1.20). En cuanto a los resultados obtenidos para el subgrupo B (casos no familiares con diagnóstico  $\leq 50$  años), a la fecha no se han publicado otros trabajos en los que se considere este grupo muestral. Recientemente, Harlid y col. (44) en población Europea, estudiaron la asociación de distintos SNPs con aumento del riesgo para CM, en casos con edad de diagnóstico  $\leq 50$  años y  $> 50$  años. Los autores encontraron que el alelo A no se asocia con aumento del riesgo para CM en el grupo con edad de diagnóstico  $\leq 50$  años ( $p = 0.34$ , OR: 1.06, IC95%: [0.94-1.19]). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta tesis, ya que en el subgrupo B, si bien existe diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia del alelo A respecto a los controles, los valores obtenidos para OR y su intervalo de confianza (OR: 1.27, IC95%: [0.96 – 1.67]), no permiten concluir que el alelo A aumenta el riesgo para CM. Cabe señalar que en el estudio publicado por Harlid y col. (44), la muestra incluye casos esporádicos y familiares.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, se postula que: a) el SNP rs13387042 se asocia con aumento de riesgo para CM en población chilena; b) el alelo A es un alelo de baja penetrancia para el desarrollo de CM en población chilena; y c) el alelo A aumenta el riesgo para CM en mujeres con historia familiar de CM. Los resultados también sugieren que el alelo A aumentaría el riesgo de CM en mujeres con edad de diagnóstico

temprano y sin historia familiar de CM y/o CO. Posiblemente se requiera aumentar el tamaño muestral de este grupo de casos, para confirmar esta asociación.

**- Asociación del SNP rs13281615 (8q24) y CM:**

El SNP rs13281615 (A/G) ubicado en la región cromosómica 8q24, se ha asociado con aumento del riesgo para CM en población Europea, y se ha propuesto al alelo G (alelo de menor frecuencia en esta población), como alelo de susceptibilidad de baja penetrancia para el desarrollo de esta patología (21, 40-42).

Easton y col. (21), en población Europea, fueron los primeros en describir asociación entre el SNP rs13281615 y CM. Los autores encontraron que el alelo G de este SNP aumentaba el riesgo para CM en 1.08 veces, y que los homocigotos G/G presentaban mayor aumento del riesgo que los heterocigotos A/G (OR: 1.18 y OR: 1.06, respectivamente). Además, encontraron que la frecuencia del alelo G presentaba una marcada diferencia entre población Europea y Asiática, siendo en esta última, el alelo de mayor frecuencia. También describieron que este SNP presentaba mayor asociación con aumento del riesgo para CM en mujeres con historia familiar de CM, respecto de casos sin historia familiar de CM (OR: 1.06; IC95%: [1.00-1.12]; p=0.05). Posteriormente, Fletcher y col. (41), también en población Europea, replicaron los resultados obtenidos por Easton y col. (21) respecto de la asociación del SNP con aumento del riesgo para CM. Sin embargo, los valores de OR fueron mayores, tanto para el alelo G (OR: 1.24), como para heterocigotos A/G (1.30) y homocigotos G/G (1.52). Estos autores, estimaron que el aumento del riesgo para CM era mayor en casos con fuerte historia familiar de CM (41). La mayoría de los estudios realizados en población Europea, muestran asociación del SNP rs13281615 con aumento de riesgo para CM (10, 40, 42, 44).

Respecto de la asociación de este SNP con aumento del riesgo en casos con CM familiar, Latif y col. (10) encontraron que el alelo G aumentaba el riesgo para CM en 1.31 veces en casos BRCA 1/2 negativos, con fuerte historia familiar de CM, y que los homocigotos G/G presentaban mayor aumento del riesgo respecto de los heterocigotos A/G (OR: 1.70 y OR: 1.36, respectivamente). Alternativamente, Gorodnova y col. (48) en un estudio caso-control en población Europea, donde los casos se seleccionaron por historia familiar de CM y/o CO, no encontraron asociación significativa entre el alelo G del SNP

rs13281615 y aumento del riesgo para CM (OR: 1.30; IC95%: [0.95-1.78], p=0.115). Sin embargo, estos resultados pueden ser consecuencia de un tamaño muestral pequeño (n=140 y n=174, para casos y controles respectivamente). En relación al aumento del riesgo para CM en casos esporádicos, Mcinerney y col. (42) en población Irlandesa, encontraron que el alelo G del SNP rs13281615 aumentaba el riesgo en 1.17 veces.

Estudios realizados en población con ancestros Africanos, no muestran asociación entre el SNP rs13281615 y aumento del riesgo para CM (32, 47). En población Asiática, los estudios muestran al alelo G como el alelo de mayor frecuencia (30, 45, 46) y la asociación del SNP con aumento del riesgo para CM es diversa: mientras que en estudios realizados en población China no se ha encontrado asociación (30, 46), en un estudio publicado recientemente, se describió que, en población Japonesa, el alelo G aumentaba el riesgo para CM en 1.20 veces (45).

En esta tesis, en población Chilena, el alelo G resultó ser el alelo de mayor frecuencia (56% en controles; 59% en casos). Estos resultados son diferentes a los obtenidos en población Europea, y similares a los obtenidos en población Asiática. Específicamente, en población Japonesa, Sueta y col. (45), en controles, encontraron una frecuencia para el alelo G de 58.2%, mientras que en población China, Long y col. (30) encontraron que la frecuencia del alelo G era de 50% en controles sanos y de 52% en casos con CM. Dado que la literatura considera al alelo G como alelo de susceptibilidad de baja penetrancia, en esta tesis todos los análisis se realizaron considerando al alelo G como alelo de riesgo, aún cuando los resultados muestran que es el alelo de mayor frecuencia en esta población. Sin embargo, no se encontró asociación entre este alelo y aumento del riesgo para CM.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, se postula que: a) No existe asociación del SNP rs13281615 con aumento del riesgo para CM y b) el alelo G, descrito en la literatura como el alelo de riesgo, es el alelo de mayor frecuencia en Población Chilena.

#### **- Análisis de genotipos combinados:**

Según el modelo poligénico de susceptibilidad, cada uno de los alelos que confiere un aumento discreto del riesgo para CM (alelos de baja penetrancia), actuarían en forma

aditiva o multiplicativa, produciendo mayores aumentos del riesgo. Se estima que aquellas mujeres que portan 4 alelos de riesgo, tendrían un riesgo para CM seis veces mayor que aquellas con 0 alelos de riesgo (4, 17). Sin embargo, actualmente son muy pocos los estudios que han analizado el efecto combinado de los SNPs asociados al aumento del riesgo para CM (28, 44-46). En esta tesis, se realizaron genotipos combinados entre los distintos SNPs en estudio, con objeto de: a) evaluar el riesgo para CM a medida que aumenta el número de alelos de riesgo (0, 1, 2, 3 ó 4 alelos), y b) analizar la existencia de interacción génica, aditiva o multiplicativa, entre estos SNPs.

**- Genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13387042 (2q35):**

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que, en población Chilena, tanto el alelo T del SNP rs3803662, como el alelo A del SNP rs13387042, serían alelos de susceptibilidad de baja penetrancia asociados al desarrollo de CM. Así, para el SNP rs3803662, el genotipo portador de un alelo T (heterocigoto C/T) se asoció con un aumento del riesgo de 1.64 veces, mientras que el genotipo portador de 2 alelos T (homocigoto T/T), aumentó el riesgo en 2.04 veces. De igual forma, para el SNP 13387042, el genotipo portador de 1 alelo de riesgo (heterocigoto G/A) se asoció con un aumento del riesgo de 1.36 veces, mientras que el genotipo portador de 2 alelos de riesgo (A/A), se asoció con un aumento del riesgo de 1.79 veces. En base a estos resultados, lo esperable era que al combinar los genotipos entre estos dos SNPs, el riesgo para CM fuera aumentando proporcional al número de alelos de riesgo presentes en el genotipo. Al efectuar el análisis de los genotipos combinados, se observó que la asociación con aumento del riesgo para CM fue mayor a medida que aumentaba el número de alelos de riesgo. Estos resultados fueron confirmados estadísticamente ( $p$ -trend<0.0001), observándose que los portadores de 1 alelo de riesgo, ya sea aportado por uno u otro SNP, presentaban un aumento del riesgo para CM de 1.76 veces (superior a lo observado para el riesgo que confiere 1 alelo cuando cada SNP se analiza individualmente); y que este aumento del riesgo, era mayor a medida que aumentaban los alelos de riesgo, llegando a ser de 5.33 veces cuando estaban presente los 4 alelos de riesgo (genotipo doble homocigoto de riesgo). Una situación similar se observó cuando los casos se dividieron en casos con CM familiar (subgrupo A) y casos con CM sin antecedentes de CM y/o CO y con edad de diagnóstico temprano (subgrupo B): En ambos

subgrupos, los valores obtenidos para  $p$ -trend, mostraron que el aumento del riesgo para CM, era mayor a medida que aumentaba el número de alelos de riesgo. Estos resultados concuerdan con lo establecido por el modelo poligénico de susceptibilidad, propuesto para explicar los casos con CM que son negativos para mutaciones en los genes BRCA 1/2 y que presentan agregación familiar.

Por otro lado, los resultados obtenidos del análisis de genotipos combinados en el subgrupo B, fueron opuestos a lo observado cuando se analizaron los genotipos de cada SNP individualmente, ya que ni la condición homocigota de riesgo para el SNP rs3803662, ni la condición homocigota de riesgo para el SNP rs13387042 se asociaron con aumento del riesgo para CM. Sin embargo, el genotipo combinado doble homocigoto de riesgo (T/T – A/A), se asoció con un aumento del riesgo de 8.0 veces. Estos resultados sugieren que no sólo existe un efecto aditivo entre estos SNPs ( $p$ -trend=0.0091), sino que además podría existir interacción génica entre ambos SNPs, responsable del aumento del riesgo en este subgrupo. Esto fue confirmado con el análisis de interacción génica aditiva, obteniendo valores de AP (proporción atribuible a la interacción) de 0.72 ( $p$ =0.001). Sin embargo, el hecho de que el SNP 13387042 se encuentre en una región en la cual no se han identificado genes, dificulta conocer el mecanismo por el cual ambos SNP actuarían en conjunto para producir un aumento del riesgo para CM en casos con edad de diagnóstico temprano y sin antecedentes de CM y/o CO. Actualmente, no se han realizado otros trabajos que analicen interacción entre los SNPs rs3803662 y rs13387042, con excepción de Stacey y col (22), quienes no encontraron interacción entre ambos SNPs.

#### **- Genotipos combinados entre los SNPs rs3803662 (*TOX3*) y rs13281615 (8q24):**

Como se mencionó anteriormente, los resultados de esta tesis indican que el alelo T del SNP rs3803662, en población Chilena, sería un alelo de susceptibilidad de baja penetrancia asociado al desarrollo de CM. En cambio para el SNP rs13281615, el alelo G, considerado en la literatura como el alelo de riesgo, en esta tesis no presentó asociación con aumento del riesgo para CM. Al realizar la combinación de los distintos genotipos de ambos SNPs, los resultados no mostraron aumento del riesgo a medida que aumentaban los alelos de riesgo. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico de  $p$ -trend para evidenciar el efecto aditivo de la combinación de alelos de riesgo, los resultados obtenidos indican que,

aun cuando no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos de portadores de alelos de riesgo, existe una tendencia al aumento del riesgo a medida que aumentan los alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado, tanto en la muestra completa, como en los subgrupos de casos con CM familiar (subgrupo A) y casos con edad de diagnóstico temprano y sin antecedentes de CM (subgrupo B), ya que los valores de *p*-trend resultaron significativos ( $p=0.0004$ ,  $p=0.0013$  y  $p=0.0329$ , respectivamente). Sin embargo, dado que los resultados no son del todo concluyentes, esta tendencia deberá ser confirmada con *n* muestrales mayores.

**- Genotipos combinados entre los SNPs rs13387042 (2q35) y rs13281615 (8q24):**

Ya se ha señalado que para el SNP rs13387042, el alelo A sería un alelo de baja penetrancia para el desarrollo de CM, y que el SNP rs13281615 no se asoció con aumento del riesgo para esta patología. Al realizar los genotipos combinados entre ambos SNPs, se observó que, tanto para el total de casos con CM, como para los casos con CM familiar (subgrupo A), el genotipo doble homocigoto de riesgo (A/A-G/G) aumenta el riesgo para CM en 2.49 veces y 2.70 veces, respectivamente. Estos resultados coinciden con lo observado cuando el SNP rs13387042 se analiza individualmente, ya que tanto para el total de casos con CM, como para el subgrupo A, el genotipo homocigoto de riesgo (A/A) aumenta el riesgo para CM en 1.79 veces y 1.99 veces, respectivamente. Estos resultados podrían sugerir que, en el genotipo combinado doble homocigoto de riesgo (A/A-G/G), la asociación con aumento del riesgo para CM, sería consecuencia del efecto que tiene el alelo A del SNP rs13387042 sobre el riesgo para CM. Sin embargo, al analizar los restantes genotipos combinados que portan dos copias del alelo A del SNP rs13387042 (A/A-A/A y A/A-A/G), éstos no se asociaron con aumento del riesgo para CM, por lo que, el aumento del riesgo para CM en el genotipo doble homocigoto de riesgo, está dado por el efecto conjunto de ambos SNPs, aun cuando el SNP rs13281615, individualmente no se asocie con aumento del riesgo para CM. Con estos resultados se puede deducir que el aumento del riesgo para CM en los genotipos combinados, aumenta a mayor número de alelos de riesgo, lo que se confirmó estadísticamente al aplicar el test de tendencia (*p*-trend) obteniendo valores de *p*-trend significativos, tanto en el total de casos con CM, como en el subgrupo A ( $p$ -trend=0.0021 y 0.0137, respectivamente). En el caso del subgrupo B, si bien la



comparación estadística entre los distintos grupos de portadores de alelos de riesgo no mostró diferencias significativas, también existe una tendencia al aumento del riesgo para CM a medida que aumenta el número de alelos de riesgo, ya que el valor de  $p$ -trend, resultó significativo ( $p$ -trend=0.0227). Sin embargo, como los resultados no son del todo concluyentes, se sugiere realizar los mismos análisis con  $n$  muestrales mayores, que permitan confirmar esta tendencia.

## VII.- CONCLUSIONES.

- En relación al análisis del SNP rs3803662, los resultados obtenidos en esta tesis permiten postular que:
  - a) El SNP rs3803662 se asocia con aumento del riesgo para CM en población Chilena.
  - b) El alelo T (alelo de menor frecuencia) es un alelo de riesgo de baja penetrancia para el desarrollo de CM en población Chilena.
  - c) El SNP rs3803662 aumenta el riesgo para CM en mujeres con historia familiar de CM y *BRCA* 1/2 negativas.
- Respecto al SNP rs13387042, los resultados indican que:
  - a) El SNP rs13387042 se asocia con aumento de riesgo para CM en población chilena.
  - b) El alelo A (alelo de menor frecuencia) es un alelo de baja penetrancia para el desarrollo de CM en población chilena.
  - c) El alelo A aumenta el riesgo para CM en mujeres con historia familiar de CM, *BRCA* 1/2 negativas. También sugieren que el alelo A aumentaría el riesgo de CM en mujeres con edad de diagnóstico temprano y sin historia familiar de CM y/o CO (*BRCA* 1/2 negativas), sin embargo, se necesita aumentar el tamaño muestral de este grupo de casos, para confirmar esta asociación.
- Para el SNP rs13281615, los resultados obtenidos en esta tesis indican que:
  - a) En población Chilena, no existe asociación del SNP rs13281615 con aumento del riesgo para CM.
  - b) El alelo G, descrito en la literatura como el alelo de riesgo, es el alelo de mayor frecuencia en Población Chilena.
- En relación a los genotipos combinados entre los distintos SNPs en análisis, los resultados indican que:
  - a) El riesgo para CM aumenta a medida que aumenta el número de alelos de riesgo presentes en el genotipo. Este resultado concuerda con el modelo poligénico propuesto en la literatura para explicar los casos de CM que presentan agregación familiar, y que son negativos para mutaciones en los genes *BRCA* 1 y 2, ya que: 1) El alelo T del SNP rs3803662, el alelo A del SNP rs13387042 y el alelo G del SNP rs13281615, son variantes comunes en población Chilena (frecuencias > 5%); 2) Confieren discretos

aumentos del riesgo para CM; y 3) El aumento del riesgo es mayor a medida que aumenta el número de alelos de riesgo.

b) En el grupo de mujeres con edad de diagnóstico temprano de la enfermedad (<50 años), sin antecedentes de CM y/o CO, la condición doble homocigota de los alelos de menor frecuencia de los SNPs rs3803662 y rs13387042 (T/T-A/A), produce un aumento del riesgo para CM que no se observa en los genotipos homocigotos de riesgo al analizar cada SNP individualmente. Este aumento del riesgo, no es consecuencia sólo del efecto aditivo que produce el mayor número de alelos de riesgo presentes en el genotipo combinado, sino que además, es consecuencia de la interacción génica entre ambos SNPs, por un mecanismo de acción, hasta la fecha, desconocido.

## **VIII.- ANEXOS.**

### **Anexo 1: Encuesta casos con CM.**



## UNIVERSIDAD DE CHILE

### Encuesta aplicable a pacientes con cáncer de mama

Ficha N°: \_\_\_\_\_

Este cuestionario ha sido diseñado para obtener un perfil general de su estado de salud presente y pasado. Le agradeceremos nos conteste las preguntas en la forma más precisa que usted pueda. Si es necesario indíquenos cualquier comentario adicional. Si existe alguna pregunta que no quiera contestar déjela en blanco. Toda su información será mantenida en forma confidencial.

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

Nombre y apellidos : \_\_\_\_\_

Dirección : \_\_\_\_\_ Ciudad \_\_\_\_\_

Teléfono : Casa \_\_\_\_\_ Trabajo \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento : \_\_\_\_\_

Lugar de Nacimiento : Ciudad \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_

### HISTORIA FAMILIAR

Aparte de Chile, ¿ Sabe usted de dónde vienen sus ancestros o si hay origen indígena en su familia?

Lado materno: \_\_\_\_\_

Lado paterno: \_\_\_\_\_

8. En hoja siguiente

8.	Nombre	Año de nacimiento	Si alguno de sus parientes ha tenido cáncer indique el tipo	Edad del diagnóstico	Año y lugar de defunción
Padre :					
Madre					
Hermanas y Hermanos					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				
Hijos del primer matrimonio					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				
Hijos del segundo matrimonio					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				

8.	Nombre	Fecha de nacimiento	Tipo de cáncer	Edad de diagnóstico	Año y lugar de defunción
Abuela materna: _____					
Abuelo materno: _____					
Abuela paterna: _____					
Abuelo paterno: _____					
Hermanos y hermanas de su madre					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				
5.	_____				
Hermanos y hermanas de su padre					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				
4.	_____				
5.	_____				
Otros miembros de la familia diagnosticados con Cáncer					
1.	_____				
2.	_____				
3.	_____				

9. Además del cáncer de mama... ¿existen otras enfermedades que ocurran en forma frecuente en su familia? ¿Existe algún familiar que tenga una enfermedad genética?

- Sí                       No → vaya a la pregunta N° 10

Si su respuesta es Sí, indique el diagnóstico y cuántos miembros de su familia tienen esta enfermedad: \_\_\_\_\_

## ***HISTORIA CLINICA***

10.

- a) Edad de menarquia: \_\_\_\_\_ años     Nunca ha menstruado
- b) Su menarquia fue natural:  Sí → Siga en la pregunta 11     No
- c) ¿Por qué razón usted nunca ha menstruado o por que el inicio del período no fue natural?

---

---

Si usted nunca ha menstruado pase a la pregunta 15.

11. Las siguientes preguntas son relacionadas con la regularidad de su período menstrual, “**Regular**” significa que su período ocurre una vez al mes, usted puede predecir más o menos con cuatro días de anticipación y cada período dura más o menos el mismo número de días.

- Siempre ocurre en forma regular
- Son generalmente regulares
- Son generalmente irregulares
- Son siempre irregulares

12. ¿Cuál es su condición menstrual actual?

- Menstruando (premenopáusica)
- Embarazada
- Lactancia
- Amenorrea crónica
- Histerectomía parcial. Edad de la cirugía \_\_\_\_\_ años
- Histerectomía completa (útero y ovarios removidos). Edad de la Cirugía \_\_\_\_\_ años.
- Menopausia natural      Edad \_\_\_\_\_ años
- Otros (especificar): \_\_\_\_\_

13. ¿Cuántas veces ha estado usted embarazada, incluyendo nacidos vivos, abortos espontáneos o inducidos, mortinatos, embarazos ectópicos e indique si usted está embarazada actualmente.

\_\_\_\_\_ Embarazos     Nunca    → Vaya a la pregunta 14

**Conteste las siguientes preguntas para cada uno de sus embarazos:**

	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º
En qué año comenzó o en qué año finalizó el embarazo										
¿Cuántos meses tenía el embarazo?										
<b>Si su embarazo llegó a término fue</b>										
Nacimiento único										
Nacimiento múltiple										
Mortinato										
Aborto										
Embarazo tubario o ectópico										
Aborto terapéutico										
Tuvo DIUC durante su embarazo (S o N)										
<b>Para los nacidos vivos responda lo siguiente</b>										
Sexo (F o M)										
¿Le dio pecho a sus hijos? (S o N)										
Si amamantó, ¿por cuánto tiempo lo hizo?										
¿Intentó usted amamantar, pero tuvo dificultades al hacerlo? (S o N)										



14. a) ¿Ha tenido usted problemas para embarazarse?
- Si       No
- b) ¿Le informó a usted un médico que podría tener problemas para embarazarse?
- Si       No
- c) ¿Qué conversó con su médico?
- Problemas en los ovarios o en la ovulación
- Obstrucción de trompas
- Problemas en la forma o tamaño del útero
- Endometriosis
- Problemas con el cuello del útero
- Problemas de pareja
- Otros (especificar)
- d) ¿Ha tomado usted medicamentos para embarazarse?
- Si       No → Vaya a la pregunta 15
- e) Si es si, por favor dé detalles acerca del tratamiento usado

Nombre del medicamento	Año y fecha del tratamiento		Razones del uso
	Inicio	Final	

15. a) ¿Ha usado anticonceptivos para evitar embarazo o por otras razones, entre estas la regulación del ciclo menstrual?
- Si       No → Vaya a la pregunta 16

b) Si es si, ¿a qué edad los tomó por primera vez?. Si usted ha iniciado, suspendido y reiniciado el tratamiento, ¿por cuánto tiempo en total lo ha usado?

\_\_\_\_\_ años    \_\_\_\_\_ meses

16. Muchas mujeres han tomado medicamentos que contienen estrógenos, progestinas u otras hormonas femeninas. Los medicamentos pueden ser administrados como comprimidos, de depósito, cremas o supositorios vaginales. Estos medicamentos son indicados por muchas razones tales como: regular los períodos, detener sangramientos irregulares, aliviar los síntomas menopáusicos o como terapia de reemplazo después de la remoción ovárica, para evitar la osteoporosis. ¿Además de los anticonceptivos, ha tomado usted hormonas femeninas?

Si             No → Vaya a la pregunta 17

b) Si es si, de detalles acerca de las hormonas femeninas que usted ha tomado:

Nombre del medicamento	Año y fecha del tratamiento		Razones del uso
	Inicio	Final	

c) ¿Qué otras drogas ha utilizado usted para el tratamiento de cáncer de mama?

17. a) ¿Le informó a usted un médico que podría tener un desbalance o problema endocrino?

Si             No → Vaya a la pregunta 18

b) Si es sí, dé detalles acerca del diagnóstico médico

¿Qué le dijo?	¿Qué edad tenía usted?

18. a) ¿Le informó a usted un médico que tenía cáncer?

Si             No → Vaya a la pregunta 19

b) Si es si, dé detalles acerca del diagnóstico médico

¿Dónde estaba localizado su cáncer?	¿Qué edad tenía usted?

19. a) ¿Le informó a usted un médico que tenía un tumor no canceroso o un nódulo?

Si       No

b) Si es si, dé detalles acerca del diagnóstico médico

¿Dónde estaba localizado el tumor?	¿Qué edad tenía usted?

20. a) ¿Le han realizado una biopsia o cirugía mamaria?

Si       No → Vaya a la pregunta21

b) Si es si, dé la siguiente información de cada cirugía mamaria (incluyendo la biopsia)

Fecha de cirugía	Hospital o ciudad	¿Cuál mama?	Resultados de la cirugía (maligna, benigna o incierta)

21. a) ¿Quién es su médico?

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_ Ciudad: \_\_\_\_\_

b) ¿Sabe su médico si hay historia familiar de cáncer en su familia?

Si       No

22. ¿Tiene usted alguna pregunta o comentario acerca de este estudio o de este cuestionario?

---

---

### Agentes medioambientales

23. ¿Usted bebe alcohol?  Si  No

a) Si es si, ¿Con qué frecuencia usted bebe? :

- Menos de un trago por semana
- 1 a 4 tragos por semana
- 5 a 10 tragos por semana
- Más de 10 tragos por semana

24. a) ¿Es usted fumadora?

- Nunca ha fumado → Vaya a la pregunta 25
- Si, en el pasado, pero ahora no
- Sí, fumadora frecuente

b) ¿Cuántos cigarrillos fuma usted al día? \_\_\_\_\_

c) ¿Por cuántos años ha fumado? \_\_\_\_\_

d) ¿A qué edad empezó a fumar? \_\_\_\_\_

e) ¿A qué edad dejó de fumar? \_\_\_\_\_

25. Exposición a rayos X o a otras radiaciones

a) ¿Ha trabajado en lugares donde se usen rayos X u otros elementos radioactivos (hospitales, clínicas, clínicas dentales, laboratorios de investigación)

- Si  No

b) Si es si, ¿Qué tipo de trabajo? \_\_\_\_\_

c) Indique las fechas: \_\_\_\_\_

d) Ha estado expuesta a rayos X por razones médicas?  Si  No

e) Si es si, explique:  
\_\_\_\_\_

26. Exposición a químicos

- a) ¿Se ha expuesto a cancerígenos o a tóxicos químicos?  Sí  No
- b) Si es sí, ¿a qué compuestos? \_\_\_\_\_
- c) ¿Bajo qué circunstancias se expuso? \_\_\_\_\_
- d) Indique las fechas: \_\_\_\_\_
- e) ¿Por cuánto tiempo se expuso? \_\_\_\_\_

**Anexo 2:**  
**Consentimiento informado casos con CM**



## UNIVERSIDAD DE CHILE

"Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

---

#### Investigadores

<b>Lilian Jara Sosa</b>	Universidad de Chile	Tel.: 9786458
<b>Patricio González Hormazábal</b>	Universidad de Chile	Tel.: 9786166
<b>José Miguel Reyes Vidal</b>	CONAC	Tel.: 7375520
<b>Fernando Gómez</b>	CONAC	Tel. 3474000

#### Declaración de los investigadores

Conducimos una investigación de genes que serían responsables de susceptibilidad a cáncer de mama y cáncer de ovario en algunas familias. Por este motivo, nos hemos contactado con Ud. para solicitar su participación en calidad de paciente con cáncer de mama. Para ayudarlo a decidir si desea participar en este estudio, nos gustaría explicarle los riesgos y beneficios, lo que constituye una decisión informada.

#### Propósitos y beneficios

El propósito de este estudio es examinar el papel que tienen los genes y qué hacen que algunas mujeres sean más susceptibles a enfermar de cáncer de mama que otras. A veces los genes cambian o se alteran. Hemos visto genes alterados en familias con cáncer, pero todavía no está totalmente claro cómo utilizar la información para prevenir el cáncer. Los resultados de este estudio suministrarán información sobre la genética del cáncer de mama que podría llevar a una mejor comprensión de sus causas y a la posibilidad de un diagnóstico más temprano y tratamiento más exitoso de la enfermedad.

Si participa en el estudio, será posible determinar si ha heredado o no un gen alterado. Si se ha determinado que usted ha heredado un gen alterado, se le contactará y se le preguntará si desea conocer el resultado del examen y se

responderán todas las preguntas que usted realice. La información obtenida será remitida a su médico tratante para que se considere con fines terapéuticos.

## **Procedimientos**

Si usted acepta participar en este estudio, se le solicitará lo siguiente:

1. Responder una encuesta en la cual se incluyen un conjunto de preguntas relacionadas con su historia médica, historia reproductiva y preguntas relacionadas con factores pronósticos.
2. Si a usted le hubieran diagnosticado algún tipo de cáncer o si ha tenido alguna cirugía profiláctica, le pediremos que firme una autorización para obtener datos clínicos sobre su patología, informes de biopsia y muestras de tejido que hayan sido guardadas en el hospital donde le realizaron la cirugía.
3. Le solicitaremos que done una muestra de sangre, la que será tomada por una enfermera, de una vena de su brazo. Se acordará con usted la fecha y hora de la toma de muestra, la que si usted lo desea, se podría realizar en su domicilio.

## **Riesgo, Stress o Incomodidad**

Riesgo de la Toma de Muestra: La toma de la muestra de sangre puede causar alguna incomodidad. Sin embargo, la enfermera tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades de que esto ocurra.

Tensión y Ansiedad: Es posible que a usted le inquiete discutir su historia médica y familiar respecto al cáncer. Es posible que este estudio nos dé información respecto de las posibilidades de desarrollar cáncer de otros miembros de su familia. Si el resultado indicara presencia o ausencia de una alteración relacionada con probabilidad de desarrollar cáncer, el conocer esta información podría causarle emoción y/o ansiedad. Alguno de los investigadores conversarán con usted para aclarar sus problemas, si existen.

## **Otras informaciones**

Privacidad: Los datos de la entrevista y los resultados del estudio genético, sólo serán entregados a las personas participantes si lo solicitan y no se entregará información ni a familiares ni a ninguna otra persona. Sólo los miembros del grupo de investigación se contactarán con los participantes y tendrán acceso a la información. Cada participante tendrá un código, el que se establecerá previo a la obtención de los datos. Los archivos se guardan bajo llave. Los datos que se publiquen no revelarán la identidad de los participantes. El personal de



colaboración será entrenado para que observe un comportamiento ético respecto de la información. Es necesario plantear que este estudio puede continuar en forma indefinida y por lo tanto, la utilización de los datos también será indefinida.

Financiamiento: La participación en este estudio no tiene ningún costo para Ud.

Voluntariedad: La participación en este estudio es totalmente voluntaria y puede retirarse de él en cualquier momento que lo desee. Puede no contestar preguntas de la encuesta, si así lo desea. Si una persona se retira del estudio o no desea participar en alguna etapa, no se le negarán los resultados que ya se hayan obtenido. A cada participante se le entregará una copia del consentimiento informado.

Utilización de la muestra de sangre: Las muestras obtenidas serán utilizadas sólo para los fines de la investigación propuesta. Las muestras se mantendrán en el laboratorio por tiempo indefinido.

Otras informaciones: Si el examen resultara positivo, se le podrían también realizar a los familiares que lo soliciten. Si algún familiar sano resultare portador de un factor genético de pronóstico, la información le será comunicada y se informará al médico tratante del probando a objeto que éste explique al portador sano las posibles medidas terapéuticas necesarias.

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

Declaración del participante: El estudio descrito anteriormente me ha sido explicado, lo he leído y comprendido. Consiento voluntariamente en participar en esta actividad. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Me queda claro que cualquier pregunta que desee hacer a futuro acerca de la investigación me será respondida por los investigadores.

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

Con copia a: - Participante  
- Investigadores

**Anexo 3:**  
**Encuesta controles.**



UNIVERSIDAD DE CHILE

**Línea de Investigación: "Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"**

Encuesta aplicable a individuos sanos sin antecedentes de familiares de cáncer

Ficha Nº : \_\_\_\_\_

Esta es una encuesta de carácter **CONFIDENCIAL**. Le agradeceremos que conteste en la forma más precisa posible. Si tiene alguna duda, por favor pregunte al encuestador. Anote cualquier comentario adicional. Si no desea contestar, deje el espacio en blanco.

1. Fecha: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

2. RUT: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_

3. Apellidos y Nombres: \_\_\_\_\_

4. Dirección: \_\_\_\_\_ Ciudad: \_\_\_\_\_

5. Teléfonos: Casa \_\_\_\_\_ Trabajo \_\_\_\_\_

6. Fecha de Nacimiento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_

7. Lugar de Nacimiento: Ciudad \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_

Encuesta aplicada por: \_\_\_\_\_

## HISTORIA FAMILIAR

8. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido Cáncer de Mama?

**Si** \_\_\_\_\_ **No** \_\_\_\_\_

9. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido Cáncer de Ovario?

**Si** \_\_\_\_\_ **No** \_\_\_\_\_

10. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido Cáncer de Próstata?

**Si** \_\_\_\_\_ **No** \_\_\_\_\_

11. ¿Tiene Usted algún familiar que tenga o haya tenido otro tipo de cáncer?

**Si** \_\_\_\_\_ **No** \_\_\_\_\_

12. Si su respuesta es **Si**, complete los siguientes datos:

(1) Nombre de su familiar: \_\_\_\_\_

*Grado de Parentesco:* \_\_\_\_\_

*(Ejemplo: Padres, Tíos, etc).*

*Tipo de Cáncer:* \_\_\_\_\_

*Edad al momento del diagnóstico:* \_\_\_\_\_

(2) Nombre de su familiar: \_\_\_\_\_

*Grado de Parentesco:* \_\_\_\_\_

*Tipo de Cáncer:* \_\_\_\_\_

*Edad al momento del diagnóstico:* \_\_\_\_\_

(3) Nombre de su familiar: \_\_\_\_\_

*Grado de Parentesco:* \_\_\_\_\_

*Tipo de Cáncer:* \_\_\_\_\_

*Edad al momento del diagnóstico:* \_\_\_\_\_

**Anexo 4:**  
**Consentimiento informado controles.**



## UNIVERSIDAD DE CHILE

"Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA GRUPO CONTROL SANO

---

#### Investigadores

<b>Lilian Jara Sosa</b>	Universidad de Chile	Tel.: 9786458
<b>José Miguel Reyes Vidal</b>	CONAC	Tel.: 7375520
<b>Patricio González Hormazábal</b>	Universidad de Chile	Tel.: 9786166

#### Declaración de los investigadores

Conducimos una investigación de genes que serían responsables de susceptibilidad a cáncer de mama y cáncer de ovario en algunas familias. Por este motivo, nos hemos contactado con Ud. para solicitar su participación en calidad de individuo sano. Se necesita un grupo de mujeres sin cáncer de mama para conocer la distribución de éstos genes en la población chilena. Para ayudarlo a decidir si desea participar en este estudio, nos gustaría explicarle los riesgos y beneficios, lo que constituye una decisión informada.

#### Propósitos y beneficios

El propósito de este estudio es examinar el papel que tienen los genes y qué hacen que algunas mujeres sean más susceptibles a enfermar de cáncer de mama que otras. A veces los genes cambian o se alteran. Hemos visto genes alterados en familias con cáncer, pero todavía no está totalmente claro cómo utilizar la información para prevenir el cáncer. Los resultados de este estudio suministrarán información sobre la genética del cáncer de mama que podría llevar a una mejor comprensión de sus causas.

Si Ud. decide participar en este examen está en su derecho ser informado de los resultados de las pruebas realizadas. Ud. también puede decidir no conocer los resultados.

¿Desea conocer los resultados? Si \_\_\_ No \_\_\_

En caso que su respuesta sea afirmativa, lea el punto "otras informaciones"

## **Procedimientos**

Si usted acepta participar en este estudio, se le solicitará lo siguiente:

1. Responder una encuesta en la cual se incluyen un conjunto de preguntas relacionadas con su historia familiar respecto de cáncer, con el objeto de confirmar que Ud. no posee antecedentes familiares de cáncer en su familia. La encuesta consta de 25 preguntas, le será aplicada por la Dra. Lilian Jara, investigador responsable del proyecto, y la entrevista le tomará 45 minutos.
2. Le solicitaremos que done una muestra de sangre de 10 cc, para analizar DNA. La muestra será tomada por una enfermera, de una vena de su brazo. Se acordará con usted la fecha y hora de la toma de muestra, la que si usted lo desea, se podría realizar en su domicilio.

## **Riesgo, Stress o Incomodidad**

Riesgo de la Toma de Muestra: La toma de la muestra de sangre podría producir molestias tales como dolor, un eventual hematoma en la zona de punción o reacción alérgica por el antiséptico utilizado. Sin embargo, la muestra será tomada por una Enfermera Universitaria con experiencia en este tipo de procedimientos, quien tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades que esto ocurra.

## **Otras informaciones**

Privacidad: Los datos de la entrevista y los resultados del estudio genético, sólo serán entregados a las personas participantes si lo solicitan y no se entregará información ni a familiares ni a ninguna otra persona. Sólo los miembros del grupo de investigación se contactarán con los participantes y tendrán acceso a la información. Cada participante tendrá un código, el que se establecerá previo a la obtención de los datos. Los archivos se guardan bajo llave. Los datos que se publiquen no revelarán la identidad de los participantes. El personal de colaboración será entrenado para que observe un comportamiento ético respecto de la información. Es necesario plantear que este estudio puede continuar en forma indefinida y por lo tanto, la utilización de los datos también será indefinida.

Financiamiento: La participación en este estudio no tiene ningún costo para Ud.

Voluntariedad: La participación en este estudio es totalmente voluntaria, y no otorga beneficios para el participante. Puede retirarse del estudio en cualquier momento que lo desee. Puede no contestar preguntas de la encuesta, si así lo desea. Si una persona se retira del estudio o no desea participar en alguna etapa, no se le negarán los resultados que ya se hayan obtenido, y la muestra de DNA y los datos obtenidos serán descartados. A cada participante se le entregará una copia del consentimiento informado.

Utilización de la muestra de sangre: Las muestras obtenidas serán utilizadas para extraer DNA, para sólo los fines de la investigación propuesta. Las muestras se mantendrán en el laboratorio durante los 4 años que durará la ejecución de esta investigación y la custodia tanto de las muestras como de la información obtenida a partir de estas será responsabilidad del investigador responsable Dra. Lilian Jara. Una vez finalizada la investigación su DNA será descartado o almacenado de acuerdo a lo que Ud. decida.

¿Acepta que el remanente de la muestra de DNA se congele y se almacene para futuros estudios que puedan surgir en relación al estudio de factores genéticos y cáncer de mama? SI \_\_\_ NO \_\_\_  
Otras informaciones: Si el examen resultara positivo, y Ud. fuese portador de algún factor genético de pronóstico, la información le será comunicada y se informará al médico tratante a objeto que éste le explique las posibles medidas terapéuticas necesarias. A los individuos que resulten positivos y deseen conocer sus resultados, se les ofrecerá consultoría genética que será realizada por su médico tratante con la asesoría de la Sra. Sonia Margarit, consultora genética graduada del Mount Sinai School of Medicine (USA).

Contactos:

En los casos que el sujeto desee efectuar alguna consulta respecto de la investigación o del presente documento podrá comunicarse con: Dra. Lilian Jara, Investigador Responsable del proyecto, Av. Independencia 1027, Santiago, Fono 9786458, e-mail [ljara@med.uchile.cl](mailto:ljara@med.uchile.cl).  
Frente a cualquier duda respecto a aspectos legales y éticos de este estudio, siéntase libre de comunicarse con: Dr. Manuel Oyarzún. Presidente del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Santiago. Fono 9786923.

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

Declaración del participante: El estudio descrito anteriormente me ha sido explicado, lo he leído y comprendido. Consiento voluntariamente en participar en esta actividad. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Me queda claro que cualquier pregunta que desee hacer a futuro acerca de la investigación me será respondida por los investigadores.

Deseo conocer los resultados Si \_\_\_ No \_\_\_

Acepto que el remanente de la muestra de DNA se congele y se almacene para futuros estudios que puedan surgir en relación al estudio de factores genéticos y cáncer de mama. SI \_\_\_ NO \_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

Con copia a: - Participante  
- Investigadores



## IX.- REFERENCIAS.

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.
2. MINISTERIO DE SALUD. Departamento de Estadísticas e Información de Salud (2011). Mortalidad por causas 2000-2009. Consultado en [www.deis.minsal.cl](http://www.deis.minsal.cl).
3. MINISTERIO DE SALUD. (2011). Guía Clínica CÁNCER DE MAMA. SANTIAGO: MINSAL 2011.
4. Pharoah, P., Antoniou, A., Easton, D., Ponder, B. (2008). Polygenes, Risk Prediction, and Targeted Prevention of Breast Cancer. *N Engl J Med*, 358, 2796-2803.
5. Mavaddat, N., Antoniou, A., Easton, D., García-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular Oncology*, 4, 174-191.
6. Mavaddat, N., Pharoah, P., Blows, F., Driver, K., Provenzano, E., Thompson, D., Maninnis, R., Shah, M., The SEARCH Team, Easton, D., Antoniou, A. (2010). Familial relative risk for breast cancer by pathological subtype: a population-based cohort study. *Breast Cancer Research*, 12:R10.
7. Antoniou, A., Easton, D. (2006). Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, 25, 5898-5905.
8. Oldenburg, R., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C., Devilee, P. (2007). Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found?. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63 (2), 125-149.
9. Stratton, M., Rahman, N. (2008). The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature Genetics*, 40 (1), 17-22.
10. Latif, A., Hadfield, K., Roberts, S., Shenton, A., Lalloo, F., Black, G., Howell, A., Evans, D., Newman, W. (2010). Breast cancer susceptibility variants alter risks in familial disease. *J Med Genet*, 47, 126-131.
11. Fletcher, O., Houlston, R. (2010). Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10, 353-361.
12. Turnbull, C., Rahman, N. (2008). Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9, 321-345.
13. Balmain, A., Gray, J., Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics*, 33, 238-244.
14. Ponder, B., Antoniou, A., Dunning, A., Easton, D., Pharoah, P. (2005). Polygenic Inherited Predisposition to Breast Cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, 35-41.
15. Easton, D. (1999). How many more breast cancer predisposition genes are there?. *Breast Cancer Res*, 1, 14 -17.
16. Knudson, AG. Jr. (1975). Genetics of human cancer. *Genetics*, 79, Suppl. 305-16.
17. Meindl, A. (2009). Identification of Novel Susceptibility Genes for Breast Cancer – Genome-Wide Association Studies or Evaluation of Candidate Genes?. *Breast Care*, 4, 93-99.
18. Ripperger, T., Gadzicki, D., Meindl, A., Schlegelberger B. (2009). Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*, 17, 722-731.
19. Stadler, Z., Vijai, J., Thom, P., Kirchhoff, T., Hansen, N., Kauff, N., Robson, M., Offit, K. (2010). Genome-wide Association Studies of Cancer Predisposition. *Hematol Oncol Clin N Am*, 24, 973-996.
20. Nathanson, K., Weber, B. (2001). ‘Other’ breast cancer susceptibility genes: searching for more holy grail. *Hum Mol Genet*, 10 (7), 715-720.

21. Easton, D., Pooley, K., Dunning, A., Pharoah, P., Thompson, D., Ballinger, D., Struewing, J., Morrison, J., Field, H., Luben, R., Wareham, N., Ahmed, S., Healey, C., y col. (2007). Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*, 447, 1087-1093.
22. Stacey, S., Manolescu, A., Sulem, P., Rafnar, T., Gudmundsson, J., Gudjonsson, S., Masson, G., Jakobsdottir, M., Thorlacius, S., Helgason, A., Aben, K., y col. (2007). Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nature Genetics*, 39, 865-869.
23. O'Flaherty, E., Kaye, J. (2003). TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins. *BMC Genomics*, 4, 13-22.
24. Yuan, S., Qiu, Z., Ghosh, A. (2009). TOX3 regulates calcium-dependent transcription in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (8), 2909-2914.
25. Chen, M-B., Wu, X-Y., Shen, W., Wei, M-X., Li, C., Cai, B., Tao, G-Q., Lu, P-H. (2011). Association between polymorphisms of trinucleotide repeat containing 9 gene and breast cancer risk: evidence from 62,005 subjects. *Breast Cancer Res Treat*, 126, 177-183.
26. Dittmer, S., Kovacs, Z., Yuan, S., Siszler, G., Kögl, M., Summer, H., Geerts, A., Golz, S., Shioda, T., Methner, A. (2011). TOX3 is a neuronal survival factor that induces transcription depending on the presence of CITED1 or phosphorylated CREB in the transcriptionally active complex. *Journal of Cell Science*, 124, 252-260.
27. Smid, M., Wang, Y., Klijn, J., Sieuwerts, A., Zhang, Y., Atkins, D., Martens, J., Foekens, J. (2006). Genes Associated With Breast Cancer Metastatic to Bone. *J Clin Oncol*, 24 (15), 2261-2267.
28. Reeves, G., Travis, R., Green, J., Bull, D., Tipper, S., Baker, K., Beral, V., Peto, R., Bell, J., Zelenika, D., Lathrop, M. (2010). Incidence of Breast Cancer and Its Subtypes in Relation to Individual and Multiple Low-Penetrance Genetic Susceptibility Loci. *JAMA*, 304 (4), 426-434.
29. Han, W., Hoon Woo, J., Yu, J-H., Lee, M-J., Moon, H-G., Kang, D., Noh, D-Y. (2011). Common Genetic Variants Associated with Breast Cancer in Korean Women and Differential Susceptibility According to Intrinsic Subtype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20, 793-798.
30. Long, J., Shu, X-O., Cai, Q., Gao, Y-T., Zheng, Y., Li, G., Li, C., Gu, K., Wen, W., Xiang, Y-B., Lu, W., Zheng, W. (2010). Evaluation of Breast Cancer Susceptibility Loci in Chinese Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19, 2357-2365.
31. Liang, J., Chen, P., Hu, Z., Shen, H., Wang, F., Chen, L., Li, M., Tang, J., Wang, H., Shen, H. (2010). Genetic variants in trinucleotide repeat-containing 9 (TNRC9) are associated with risk of estrogen receptor positive breast cancer in a Chinese population. *Breast Cancer Res Treat*, 124, 237-241.
32. Zheng, W., Cai, Q., Signorello, L., Long, J., Hargreaves, M., Deming, S., Li, G., Li, C., Cui, Y., Blot, W. (2009). Evaluation of 11 Breast Cancer Susceptibility Loci in African-American Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 2761-2764.
33. Ruiz-Narváez, E., Rosenberg, L., Cozier, Y., Cupples, L., Adams-Campbell, L., Palmer, J. (2010). Polymorphisms in the TOX3/LOC643714 Locus and Risk of Breast Cancer in African-American Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19, 1320-1327.
34. Broeks, A., Schmidt, M., Sherman, M., Couch, F., y col. (2011). Low penetrance breast cancer susceptibility loci are associated with specific breast tumor subtypes: findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Hum Mol Genet*, 20 (16), 3289-3303.
35. García-Closas, M., Chanock, S. (2008). Genetic Susceptibility Loci for Breast Cancer by Estrogen Receptor Status. *Clin Cancer Res*, 14 (24), 8000-8009.
36. Udler, M., Ahmed, S., Healey, C., Meyer, K., Struewing, J., y col. (2010). Fine scale mapping of the breast cancer 16q12 locus. *Hum Mol Genet*, 19, 2507-2515.

37. Riaz, M., Berns, E., Sieuwerts, A., Ruigrok-Ritstier, K., y col. (2011). Correlation of breast cancer susceptibility loci with patient characteristics, metastasis-free survival, and mRNA expression of the nearest genes. *Breast Cancer Res Treat*, 133 (3), 843-851.
38. Milne, R., Benítez, J., Nevanlinna, H., Heikkinen, T., Aittomäki, K., Blomqvist, C., Arias, J., Zamora, P., Burwinkel, B., Bartram, C., y col. (2009). Risk of Estrogen Receptor–Positive and –Negative Breast Cancer and Single–Nucleotide Polymorphism 2q35-rs13387042. *J Natl Cancer Inst*, 101 (14), 1012-1018.
39. Lin, C-Y., Ho, C-M., Bau, D-T., Yang, S-f., Liu, S.H., y col. (2012). Evaluation of Breast Cancer Susceptibility Loci on 2q35, 3p24, 17q23 and FGFR2 Genes in Taiwanese Women with Breast Cancer. *Anticancer Research*, 32, 475-482.
40. Ghousaini, M., Song, H., Koessler, T., Al Olama, A., Kote-Jarai, Z., Driver, K., Pooley, K., Ramus, S., y col. (2008). Multiple Loci With Different Cancer Specificities Within the 8q24 Gene Desert. *J Natl Cancer Inst*, 100 (13), 962-966.
41. Fletcher, O., Johnson, N., Gibson, L., y col. (2008). Association of Genetic Variants at 8q24 with Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17 (3), 702-705.
42. Mcinerney, N., Colleran, G., Rowan, A., Walther, A., Barclay, E., y col. (2009). Low penetrance breast cancer predisposition SNPs are site specific. *Breast Cancer Res Treat*, 117, 151-159.
43. García-Closas, M., Hall, P., Nevanlinna, H., Pooley, K., Morrison, J., Richesson, D., Bojesen, S., Nordestgaard, B., Axelsson, C., Arias, J., Milne, R., y col. (2008). Heterogeneity of Breast Cancer Associations with Five Susceptibility Loci by Clinical and Pathological Characteristics. *PloS Genetics*, 4, e1000054.
44. Harlid, S., Ivarsson, M., Butt, S., Grzybowska, E., y col. (2012). Combined effect of low-penetrant SNPs on breast cancer risk. *British Journal of Cancer*, 106, 389 -396.
45. Sueta, A., Ito, H., Kawase, T., Hirose, K., y col. (2012). A genetic risk predictor for breast cancer using a combination of low-penetrance polymorphisms in a Japanese population. *Breast Cancer Res Treat*, 132, 711-721.
46. Dai, J., y col. (2012). Breast cancer risk assessment with five independent genetic variants and two risk factors in Chinese women. *Breast Cancer Research*, 14, R17.
47. Huo, D., Zheng, Y., Ogundiran, T., y col. (2012). Evaluation of 19 susceptibility loci of breast cancer in women of African ancestry. *Carcinogenesis*, 33 (4), 835-840.
48. Gorodnova, T., Kuligina, E., Yanus, G., Katanugina, A., Alysheva, S., Togo, A., Imyanitov, E. (2010). Distribution of *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1*, *LSPI*, and 8q24 alleles in genetically enriched breast cancer patients versus elderly tumor-free women. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 199, 69-72.
49. Houlston, R., Peto, J. (2004). The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*, 23, 6471-6476.
50. Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006). The Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-585.
51. Hosmer, D., Lemeshow, S. (1992). Confidence Interval Estimation of Interaction. *Epidemiology*, 3 (5), 452-456.