

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**VARIANTES DE BAJA PENETRANCIA DE LOS GENES
FGFR2 Y MAP3K1 Y SU ASOCIACIÓN CON EL RIESGO
PARA CANCER DE MAMA EN POBLACIÓN CHILENA**

KERUBE NOEMI CERCEÑO OSORIO

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCION GENÉTICA**

Directores de Tesis:

**Prof. Dra. Lilian Jara
Prof. Dr. Patricio González-Hormazábal**

2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

KERUBE NOEMI CERCEÑO OSORIO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biomédicas con mención en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Marzo de 2012.

**Prof. Dra. Lilian Jara
Prof. Dr. Patricio González-Hormazábal
Directores de Tesis
Departamento de Genética Humana
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Carlos Valenzuela

Prof. Dra. Katherine Marcelain

Prof. Dr. Gareth Owens Prof.

**Prof. Dra. Patricia Iturra
Presidente Comisión**

Agradecimientos

Ante todo deseo agradecer a Dios por permitirme realizar este magister, por la sabiduría y el entendimiento que me brindo para no desfallecer en los momentos más difíciles, sin él nada es posible.

Agradezco a mis queridas hermanas Malena, Melissa y Kirian por su apoyo y sus palabras de aliento llenas de entusiasmo; a mi “papi” Víctor por su apoyo en todos los sentidos y especialmente a mi madre Noemí Raquel, por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional en todo momento, este trabajo es para tí.

A mis directores de tesis, Dra. Lilian Jara por abrirme las puertas de su Laboratorio, permitirme formar parte de su grupo de trabajo y dirigir este trabajo de tesis; al Dr. Patricio González por sus enseñanzas, paciencia, dedicación y apoyo, mil gracias!!!!

A la comisión evaluadora, Dra. Marcelain, Dr. Owens, Dr. Valenzuela y Dra. Iturra por sus comentarios y críticas constructivas que ayudaron a mejorar este trabajo de tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Genética Humana Lorena, Jessica, Isabel, Militzay Christian, gracias por las palabras de aliento y constante apoyo.

A los amigos y amigas “Pana” que tuve la maravillosa oportunidad de conocer y compartir, gracias por el apoyo a los que me brindaron mucho más que su amistad, sin ustedes no hubiera sido igual. A las personas en general que se cruzaron en mi camino de alguna u otra manera durante estos dos años y fueron motivo de alegría y constante apoyo, gracias

En fin, un inmenso Gracias a todos los recordaré siempre...

*A PESAR DE TODOS LOS OBSTÁCULOS...A PESAR DE
TODOS LOS PEROS, LAS PUERTAS CERRADAS...A
PESAR DE TODO ESO, SEGUÍ CREYENDO EN MÍ Y EN
MIS IDEALES...LAS COSAS QUE PARECEN
IMPOSIBLES SE VUELVEN POSIBLES, SOLO HAY QUE
TENER FÉ.
(KNCO)*

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Factores genéticos.....	6
1.2. Genes <i>FGFR2</i> y <i>MAP3K1</i>	9
1.3. Vía de Señalización de <i>FGFR2</i>	10
1.4. Variantes comunes de baja penetrancia.....	12
1.5. Interacción génica entre <i>FGFR2</i> y <i>MAP3K1</i> en CM.....	16
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Diseño experimental.....	20
4.2. Criterios de selección de los grupos muestrales.....	21
4.2.1. Casos.....	21
4.2.2. Controles.....	21
4.2.3. Procedencia de los grupos muestrales.....	21
4.3. Extracción del DNA.....	22
4.4. Genotipificación de los polimorfismo rs1219648, rs2981582 rs2420946 y rs889312.....	22
4.5. Análisis estadístico aplicado al estudio.....	23
4.5.1. Análisis de interacción entre las variantes analizadas de los genes <i>FGFR2</i> y <i>MAP3K1</i>	24
5. RESULTADOS	26
5.1. Características de los casos de CM.....	26
5.2. Análisis de asociación de las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i> con riesgo para CM.....	26
5.2.1. Genotipificación de las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i> mediante el ensayo 5'Exonucleasa (Taqman) por PCR en tiempo real.....	26
5.2.2. Análisis de asociación de la variante rs1219648 del gen <i>FGFR2</i> con riesgo para CM.....	28
5.2.3. Análisis de asociación de la variante rs2981582 del gen <i>FGFR2</i> con riesgo para CM.....	30

5.2.4. Análisis de asociación de la variante rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> con riesgo para CM.....	33
5.2.5. Análisis de asociación de la variante rs889312 del gen <i>MAP3K1</i> con riesgo para CM.....	36
5.3. Análisis de interacción génica entre los genes <i>FGFR2</i> y <i>MAP3K1</i>	39
5.3.1. Análisis de interacción entre la variante rs1219648 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i>	39
5.3.2. Análisis de interacción entre la variante rs2981582 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i>	42
5.3.3. Análisis de interacción entre la variante rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i>	45
5.4. Análisis del poder estadístico aplicado al estudio.....	49
6. DISCUSIÓN	52
6.1. Asociación con CM de las variantes rs1219648, rs2981582 rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i>	52
6.2. Interacción entre los genes <i>FGFR2</i> y <i>MAP3K1</i>	58
7. CONCLUSIONES	61
8. ANEXOS	62
Anexo 1: Encuesta casos.....	62
Anexo 2: Tablas (14 - 17) Descripción de casos.....	74
Anexo 3: Encuesta controles.....	79
Anexo 4: Acta y consentimiento informado.....	82
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los genes de susceptibilidad conocidos para CM...	8
Tabla 2. Resumen de los estudios caso-control de las variantes del intrón 2 del gen <i>FGFR2</i>	14
Tabla 3. Resumen de los estudios caso-control para la variante rs889312 del gen <i>MAP3K1</i>	16
Tabla 4. Relación entre los portadores de las variantes de riesgo y OR.....	25
Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs1219648 del gen <i>FGFR2</i> en casos <i>BRCA1/2</i> negativo y controles sanos.....	29
Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs2981582 del gen <i>FGFR2</i> en casos <i>BRCA1/2</i> negativo y controles sanos.....	32
Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> en casos <i>BRCA1/2</i> negativo y controles sanos.....	34
Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs889312 del gen <i>MAP3K1</i> en casos <i>BRCA1/2</i> negativo y controles sanos.....	38
Tabla 9. Distribución de frecuencias de los genotipos combinados para el rs1219648 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i> en controles sanos y en casos de CM <i>BRCA1/2</i> negativo y controles sanos.....	40
Tabla 10. Distribución de frecuencias de los genotipos combinados para el rs29815282 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i> en controles sanos y en casos de CM <i>BRCA1/2</i> negativo y controles sanos.....	44
Tabla 11. Distribución de frecuencias de los genotipos combinados para el rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> y rs889312 del gen <i>MAP3K1</i> en controles sanos y en casos de CM <i>BRCA1/2</i> negativo y controles sanos.....	47
Tabla 12. Cálculo del poder estadístico ($1-\beta$) alcanzado en la estimación del riesgo de los homocigotos de riesgo de cada variante analizada, de acuerdo a los subgrupos de casos.....	50
Tabla 13. Cálculo del poder estadístico ($1-\beta$) alcanzado en la estimación del riesgo de los genotipos combinados dobles homocigotos de riesgo para las variantes analizadas, de acuerdo a los sugbrupos de casos.....	51

Tabla 14. Distribución de las familias según criterio de selección.....	63
Tabla 15. Distribución por edad de diagnóstico de los casos de CM familiar y/o diagnóstico temprano <i>BRCA1/2</i> negativo en la muestra completa.....	63
Tabla 16. Distribución por edad de diagnóstico de los casos con historia familiar de CM <i>BRCA1/2</i> negativo.....	63
Tabla 17. Distribución por edad de diagnóstico de los casos sin historia familiar de CM y diagnóstico temprano <i>BRCA1/2</i> negativo.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización en donde participan <i>FGFR2</i> y <i>MAP3K1</i>	11
Figura 2. Gráfico de discriminación alélica para ambos alelos del SNP rs2420946 del gen <i>FGFR2</i> y el control negativo.....	27

RESUMEN

El cáncer de mama (CM) constituye uno de los mayores problemas para la salud de la mujer actual.

Los factores de riesgo atribuibles al desarrollo de la enfermedad incluyen: edad, etnia, exposición hormonal y factores genéticos siendo este último el más importante. El modelo actualmente propuesto para explicar la susceptibilidad genética al CM es poligénico e incluye la participación de genes de alta, moderada y baja penetrancia. De los genes de baja penetrancia *FGFR2* y *MAP3K1* han presentado las mayores asociaciones con el aumento del riesgo a CM. El gen *FGFR2* codifica para un receptor de factor de crecimiento y el gen *MAP3K1*, codifica para una serina /treonina quinasa, integrante del grupo de quinasas activadoras de mitógenos (MAPK). La cascada de eventos río abajo de la vía de activación del *FGFR2* incluye a la vía de las MAPK. Además de su efecto individual, se postula que la interacción entre estos genes podría aumentar el riesgo a CM.

A la fecha, los estudios de susceptibilidad que vinculan a *FGFR2* y *MAP3K1* con CM, se han realizado en mujeres de origen europeo, asiático y afroamericano en las cuales las diferencias en las estimaciones de riesgo a CM podrían ser atribuibles a diferencias en la estructura genética de cada población.

Actualmente, en Chile y en otras poblaciones Sudamericanas no existen estudios que relacionen los *loci* de susceptibilidad de baja penetrancia con aumento del riesgo a CM familiar. La realización de estos estudios ayudaría a comprender las bases genéticas de la susceptibilidad al CM en esta población.

En este trabajo de tesis se estudió las variantes de los genes de baja penetrancia rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* y su asociación con el riesgo para CM y la interacción entre ambos genes con la susceptibilidad a la enfermedad. El estudio caso control de las variantes se realizó en un total de 307 casos de CM familiar *BRCA1/2* negativo y 614 controles sanos sin antecedentes de CM mediante el ensayo 5'Exonucleasa (Taqman®). Los resultados indicaron que las frecuencias del alelo de riesgo de las variantes del gen *FGFR2* fueron mayores en los casos (valores entre 0,48 y 0,49 para los tres SNPs)

en comparación con los controles (valor de 0,40 para los tres SNPs). Las variantes del gen *FGFR2* se asociaron con el aumento del riesgo para CM en los individuos homocigotos para el alelo de riesgo (rs1219648 GG OR= 1,83[IC95% 1,2 – 2,8]; rs2981582 TT OR= 1,91[IC95% 1,3 – 2,9]; rs2420946 TT OR= 2,03[IC95% 1,3 – 3,1]) en la muestra completa. En la estratificación por historia familiar, las mayores asociaciones fueron para los homocigotos de riesgo de los SNPs rs1219648 y rs2420946 (OR= 2,15[IC95% 1,1 – 4,1] y OR= 2,27[IC95% 1,2 – 4,2], respectivamente) en los casos de CM sin historia familiar de CM y diagnosticados a edad \leq 50 años.

Para la variante rs889312 del gen *MAP3K1*, los resultados indicaron que el alelo de riesgo fue mayor en los casos (0,45) en comparación con los controles (0,36) en la muestra completa. Igualmente en la estratificación por historia familiar, la mayor asociación la presentó el homocigoto de riesgo CC (OR= 2,40[IC95% 1,3 – 4,4]) en los casos de CM sin historia familiar diagnosticados a edad \leq 50 años.

Finalmente, se analizaron los genotipos combinados entre las variantes del gen *FGFR2* rs1219648, rs2981582, rs2420946 y la variante rs889312 del gen *MAP3K1*. Las diferencias más significativas se observaron en los casos de CM sin historia familiar diagnosticados a edad \leq 50 años, donde el genotipo combinado doble homocigoto de riesgo de las variantes rs1219648 y rs889312 presentó la mayor asociación (OR= 5,63[IC95% 1,9 – 17,0]). En los genotipos combinados que incluyeron al homocigoto de riesgo para la variante rs889312 del gen *MAP3K1* se observó aumento del riesgo para CM; es decir, este genotipo por sí sólo aumenta el riesgo para CM, a diferencia de los homocigotos de riesgo para cualquiera de las variantes analizadas del gen *FGFR2* que no aumentaron significativamente el riesgo para CM. Estos resultados indican que los SNPs del gen *FGFR2* actuarían potenciando el efecto del SNP rs889312 del gen *MAP3K1*.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is one of the major health problems of woman worldwide. Risk factors attributable to the development of disease include: age, ethnicity, hormonal exposure and genetic factors, being the latter the most important. Current model proposed to explain genetic susceptibility to BC is the polygenic one, and includes the involvement of high, moderate and low-penetrance genes. Low-penetrance genes *FGFR2* and *MAP3K1* presented the highest associations with increased risk of BC. *FGFR2* gene encodes growth factor receptor and *MAP3K1* gene encodes serine/threonine kinase, member of mitogen activated kinases (MAPK). The event downstream of *FGFR2* activation pathway includes the MAPK pathway. In addition of their individual effect, is postulated that the interaction between both genes may increase the risk of BC.

Recently, many studies have been conducted in women from European, Asian and African origin in which differences in risk estimates to BC could be attributable to differences in genetic structure.

Currently in Chile and other South American populations, there are not studies analyzing low-penetrance BC genes with increase risk of familial BC. The completion of these studies could help to understand the genetic basis of susceptibility of BC in this population.

The present thesis studied the association with BC risk of low-penetrance variants rs1219648, rs2981582 and rs2420946 (*FGFR2* gene) and rs889312 (*MAP3K1* gene), and the interaction between both genes. A case-control study was performed in 307 cases of familial BC *BRCA1/2* negative and 614 healthy controls without familial BC history. Genotyping was performed using 5'Exonuclease Taqman® assay. The results showed that the risk allele frequencies of *FGFR2* variants were higher in cases (values between 0.48 and 0.49 for the three SNPs of *FGFR2* gene) compared to controls (value of 0.40 for the three SNPs). The *FGFR2* gene variants were associated with increased risk of BC in homozygous for the risk allele (rs1219648 GG OR= 1.83[CI 95% 1.2 – 2.8]; rs2981582 TT OR= 1.91[CI95% 1.3 – 2.9]; rs2420946 TT OR= 2.03[CI95% 1.3 – 3.1]) for the complete sample. After stratification by family

history, the highest associations were for the risk homozygous of SNP's rs1219648 and rs2420946 (OR= 2.15 [CI95% 1.1 – 4.1] and OR= 2.27 [CI95% 1.2 – 4.2], respectively) in BC cases without family history diagnosed at age \leq 50 years.

For SNP rs889312 (*MAP3K1* gene), results showed that risk allele was higher in cases (0.45) compared with controls (0.36) of entire sample. Also, after stratification by family history, the highest association was for the risk homozygote CC (OR= 2.40 [CI95% 1.3 – 4.4]) in BC cases without family history diagnosed at age \leq 50 years.

Finalized, we analyzed the combined genotypes between *FGFR2* gene variants rs1219648, rs2981582, rs2420946 and *MAP3K1* rs889312. The most significant differences were observed in BC cases without family history diagnosed at age \leq 50 year, where the double risk homozygote for variants rs1219648 and rs889312 showed the highest association (OR= 5.63[CI95% 1.9 – 17.0]). Combined genotypes that included the risk homozygote for variant rs889312 (*MAP3K1* gene) showed increased risk of BC; hence, this genotype by itself increases the risk of BC, unlike the risk homozygous for any of *FGFR2* gene variants analyzed that were not significantly increased the risk of BC. These results suggest that SNPs of the *FGFR2* gene acts by enhancing the effect of SNP rs889312 *MAP3K1* gene.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) constituye uno de los mayores problemas para la salud de la mujer actual. Presenta la más alta tasa de mortalidad a nivel mundial, correspondiendo al 22% del total de muertes por cáncer en la mujer (Oldenburg *et al.*, 2007). Se estima que aproximadamente el 12% de las mujeres enferman de CM a lo largo de la vida (Curado MP *et al.*, 2007). En Chile, presenta la primera tasa de mortalidad por cáncer en mujeres (15,8/100,000 mujeres), desplazando al cáncer de vesícula y vía biliares (15,3 /100.000 mujeres) que hace algunos años atrás ocupaba el primer lugar (MINSAL 2009). La incidencia nacional estimada por el programa nacional de cáncer de mama, a partir de la información enviada por 29 servicios de salud del sistema público fue cercana a los 3.100 casos nuevos el año 2009 (MINSAL 2009). A nivel mundial en los últimos años, la prevalencia del CM se ha incrementado en la mujer joven (< de 35 años) correspondiendo al 11% del total de los casos. En este grupo de mujeres, el CM es más agresivo y con peor pronóstico. (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>).

Estudios recientes han comparado la prevalencia del CM en distintas áreas geográficas, existiendo diferencias entre las regiones. En África, lejano Oriente y Sudamérica se ha descrito menor riesgo para el desarrollo del CM, mientras que el norte de América y Europa son áreas geográficas de mayor riesgo (Parkin *et al.*, 1999), sugiriendo que el riesgo podría estar influenciado por la relación genético-ambiental. Algunas publicaciones han demostrado que la migración de individuos a áreas de mayor riesgo, aumenta la incidencia de la enfermedad en este grupo. Sin embargo, los descendientes de los inmigrantes exhiben un riesgo semejante al de sus ancestros, en por lo menos dos generaciones consecutivas, mostrando la influencia genética (Ziegler *et al.*, 1993; Kliewer y Smith 1995).

Los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo del CM incluyen: edad avanzada, menarquia temprana, menopausia tardía, edad avanzada del primer embarazo, nuliparidad y predisposición genética al CM, siendo este último el factor más importante (McPherson *et al.*, 2000; Singletary *et al.*, 2002, Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001).

1.1. Factores Genéticos

Se ha estimado que 5-15% de todos los CM presentan agregación familiar (Ellisen y Haber 1998; Easton 2002). El riesgo incrementa con el aumento del número de afectados en la familia, y es mayor en mujeres cuyos familiares presentan la enfermedad a edad temprana (Oldenburg *et al.*, 2007). Estudios en gemelos monocigóticos y dicigóticos sugieren que la predisposición genética es más importante que los factores ambientales en el desarrollo de este cáncer (Lichtenstein *et al.*, 2000; Peto y Mack ,2000) lo que confirma la existencia de susceptibilidad genética heredada.

En los años 90' se identificaron dos genes de susceptibilidad para cáncer de mama: *BRCA1* y *BRCA2* (King 1990; Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995; Tavtigian *et al.*, 1996), los que cumplen importantes roles en los mecanismos de mantención de la integridad del genoma, entre estos en la respuesta celular a las fracturas de doble hebra del DNA (Gudmundsdottir y Ashworth, 2006). Los genes *BRCA1/2* son de alta penetrancia e inicialmente fueron considerados los más importantes en la susceptibilidad genética al CM familiar. Sin embargo, la literatura ha informado que las mutaciones germinales en *BRCA1/2* sólo explican aproximadamente el 20% del CM familiar y la frecuencia de mutaciones de estos genes es muy baja en la población general (Cox *et al.*, 2007). En particular en población española, sólo el 25% de los casos con CM familiar son portadores de mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2* (Diez *et al.*, 2003). En Chile, se informó que el 16% de los casos con CM familiar son portadores de mutaciones en estos genes (González-Hormazábal *et al.*, 2010).

Los estudios realizados recientemente en diferentes poblaciones han planteado que el 80% de los casos familiares de CM son negativos para mutaciones en *BRCA1/2* y podrían estar relacionados a variantes en otros genes de susceptibilidad. Una alternativa planteada es la existencia de otro(s) gen(es) de alta penetrancia (un hipotético "*BRCA3*"), que podrían explicar el riesgo en las familias con múltiples casos, pero negativas para mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*. Para identificar estos posibles genes se han utilizado los análisis de ligamiento, herramienta utilizada para mapear *locus* de alta penetrancia. A la fecha, ningún estudio de ligamiento ha logrado identificar otro gen de alta penetrancia para CM (Turnbull y Rahman, 2008). A consecuencia de lo anterior, la búsqueda se ha enfocado en la identificación de genes de moderada y baja penetrancia, los que podrían ser responsables de la

susceptibilidad genética al CM en los casos *BRCA1/2* negativos.

Actualmente, la literatura plantea que el modelo poligénico es el que mejor explica el riesgo de CM en los casos con agregación familiar de la enfermedad (Antoniou *et al.*, 2001). Este modelo plantea que la susceptibilidad genética al CM se explica por mutaciones en *BRCA1/2* etnia específica y por un número mucho mayor de mutaciones en genes de moderada y baja penetrancia. Los genes de moderada y baja penetrancia son genes cuyos polimorfismos se asocian con aumentos moderados (2 – 4) o bajos del riesgo relativo (1,1 – 1,3), sin embargo, su frecuencia poblacional es alta (> 0.05) (Pharoah *et al.*, 2008) (Tabla 1). Por lo tanto, el componente genético actuaría a través del efecto acumulado de un gran número de alelos relativamente frecuentes en la población, pero con impacto individual relativamente bajo que interactuarían con factores ambientales, hasta exceder cierto umbral de riesgo (McClellan *et al.*, 2007).

La bibliografía actual apoya el modelo poligénico para explicar la susceptibilidad genética al CM. Easton *et al.*, (1999) sugirió la participación de genes de moderada o baja penetrancia en el CM familiar basándose en los siguientes hechos o supuestos: 1) No se ha encontrado otro(s) gen(es) con penetrancia comparable a *BRCA1* o *BRCA2* y si existiese(n) las mutaciones en estos genes son muy raras; 2) El modelo recesivo es muy improbable; 3) Algunos de los 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 mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*, por lo tanto, es posible que otros genes sean los responsables del CM en especial con edad de diagnóstico temprana; 4) De acuerdo con la hipótesis de Knudson's (1975) la carcinogénesis requiere de impactos mutacionales sucesivos en diferentes genes; 5) La heterogeneidad clínica de la enfermedad podría ser consecuencia de heterogeneidad genética, esta hipótesis se basa en la evidencia de que el CM lobulillar invasivo y el carcinoma lobulillar “*in situ*” presentan riesgo familiar mayor comparados con otros tipos histológicos de CM. Este efecto no parece ser sólo consecuencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*.

Los genes candidatos de moderada penetrancia (*CHEK2*, *ATM*, *RAD51*, *XRCC3*, entre otros) se han seleccionado en base a su participación en las vías de mantención de la integridad genómica en las cuales también participan *BRCA1/2*. La falla de alguna de estas vías podría ser una de las causas de la carcinogénesis mamaria.

Tabla 1
Características de los genes de susceptibilidad conocidos para CM

Genes de susceptibilidad para CM	Variantes de riesgo	Frecuencia	Riesgo relativo para CM	Ejemplos
Alta penetrancia	Mutaciones diferentes que predominantemente causan proteínas trucas	Rara ($\leq 0,1\%$)	10-20 veces	<i>BRCA1, BRCA2, TP53</i>
moderada penetrancia	Mutaciones diferentes que predominantemente causan proteínas trucas	Rara ($\leq 0,6\%$)	2 - 4 veces	<i>ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2</i>
Baja penetrancia	SNPs causales o en DL con la(s) variante(s) causal(es). Presentes en regiones no codificantes o no génicas.	Frecuentes (5-50%)	Hasta 1,25 veces (heterocigotos) ó 1,65 veces (homocigotos)	<i>FGFR2</i> (rs2981582, rs1219648, etc) <i>MAP3K1</i> (rs889312) <i>TNRC9</i> (rs3803662), 8q (rs13281615), entre otros.

CM: cáncer de mama; **SNP:** single nucleotide polymorphisms; **DL:** desequilibrio de ligamiento; Fuente: Stratton M y Rahman N, 2008

Las variantes de moderada penetrancia se han identificado mediante secuenciación de genes candidatos en casos de CM familiar y estudios de asociación caso-control.

En los últimos años, los Estudios de Asociación del Genoma Completo (GWAS, de sus siglas en inglés *Genome Wide Association Studies*) han identificado alelos de baja penetrancia asociados al CM. Los GWAS tienen la ventaja de utilizar una tecnología que permite genotipificar miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, de sus siglas en inglés, *Single-nucleotide polymorphism*) en un solo ensayo, permitiendo así analizar prácticamente gran cantidad de SNPs existentes en el genoma.

Los primeros GWAS para la identificación de las variantes de baja penetrancia en CM se realizaron en poblaciones de origen caucásico-europeo. Easton *et al.*, (2007) en población de origen europeo, utilizaron un panel de 227.876 SNPs (que corresponden a las variantes más comunes a lo largo de todo el genoma), en 4.398 casos con historia familiar de CM en 4.316 controles seleccionados al azar. Este grupo identificó 5 *loci* de susceptibilidad asociados con aumento del riesgo para CM: rs2981582 (gen *FGFR2*, receptor de factor de crecimiento fibroblástico), rs8803662 (gen *TNRC9 /TOX3*, posible factor de transcripción), rs889312 (gen *MAP3K1*, participa en la vía de señalización de mitógenos), rs3817198 (gen *LSP1*, codifica una proteína específica en linfocitos) y el rs13281615 de la región cromosómica 8q24 (asociado a cáncer de próstata). Para estos SNPs se observaron valores de OR entre 1,07 – 1,26, con un nivel de significancia de $p < 10^{-7}$. De estos 5 *loci*, los SNPs ubicados en los genes *FGFR2* y *MAP3K1* presentaron las mayores asociaciones con CM (OR=1,26 [IC95% 1,23–1,30] y OR=1,13 [IC95% 1,10–1,16], respectivamente) (Easton *et al.*, 2007). El grupo de Hunter *et al.*, (2007) al utilizar un panel de 528.173 SNPs en 1.145 casos de CM y en 1.142 mujeres norteamericanas de origen europeo, observaron que los SNPs rs1219648 y rs2420946 del gen *FGFR2* presentaron asociación significativa con aumento del riesgo para desarrollar CM (OR=1,23 [IC95% 1,02- 1,48] y OR=1,24 [1,03-1,50], respectivamente). Posteriormente, Thomas *et al.*, (2009) condujeron un GWAS en mujeres de origen europeo residentes en Norteamérica, confirmando la asociación de los SNPs de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* con aumento del riesgo para desarrollar CM. La reproducibilidad que los GWAS han mostrado en diferentes estudios permitió sugerir que las variantes de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* podrían corresponder a alelos de baja penetrancia para CM.

1.2. Genes *FGFR2* y *MAP3K1*

El gen *FGFR2* se ubica en la región cromosómica 10q26 y codifica para el Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (*FGFR2*). Ésta es una glicoproteína compuesta por un dominio inmunoglobulina extracelular, una región transmembrana hidrofóbica y un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa intrínseca. Pertenece a una familia de receptores de factores de crecimiento fibroblástico los que se expresan en diferentes

tipos celulares, en donde cumplen funciones específicas como proliferación, migración y supervivencia celular (Turner *et al.*, 2010). El gen *FGFR2* codifica para dos isoformas: *FGFR2b* y *FGFR2c*. La primera se expresa predominantemente en el epitelio de las glándulas mamarias y mucosa gástrica, entre otros epitelios, mientras que la segunda se expresa preferentemente en células mesenquimáticas (Kato *et al.*, 2008).

El gen *MAP3K1* se ubica en la región cromosómica 5q11.2 y codifica para la proteína *MAP3K1* (proteína activadora de mitógenos quinasa quinasa quinasa 1) que es una serina/treonina quinasa que inicia la vía de señalización de las proteínas quinasa activadoras de mitógenos (MAPK).

1.3. Vía de señalización de *FGFR2*

En la vía de activación de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), la interacción ligando–receptor es el acontecimiento que inicia la vía de transducción de señales. Luego del reconocimiento del ligando (Figura 1), el receptor (*FGFR2*) se dimeriza activándose, dando paso a la cascada de eventos río abajo de la vía que incluyen: a) reclutamiento de proteínas adaptadoras como el sustrato del *FGFR2* (*FRS*), *GRB2* (del inglés, *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*), y *SOS* (del inglés, *Son of Sevenless Proteins*); y b) activación de la vía de las MAP quinasa (MAPK) mediante la proteína RAS. La vía de las MAPK se inicia con la activación de *MAP3K1* la cual amplifica la señal mediante la fosforilación de *MAPKK* y esta a su vez fosforila a *MAPK*. Finalmente, el circuito de reacciones termina con la expresión de genes importantes en la angiogénesis, proliferación y migración celular.

Se ha estimado que el 5% de los tumores de mama presentan sobre-expresión de *FGFR2* (Penault-Llorca *et al.*, 1995). Diferentes estudios relacionados con la función del receptor en la vía de señalización y los ligandos de los cuales es blanco, han tratado de explicar la participación de *FGFR2* en la carcinogénesis mamaria. El primer estudio que analiza la participación de *FGFR2* en el CM reportó la amplificación de este gen en el 12% de 387 casos (Adnane *et al.*, 1990). Posteriormente, Callahan y Smith, (2000) relacionaron al virus de tumores de mama en ratón con *FGFR2* (MMTV de sus siglas en inglés, *mouse mammary tumor virus*) ya que la infección con el virus activa la vía de los FGFs en el

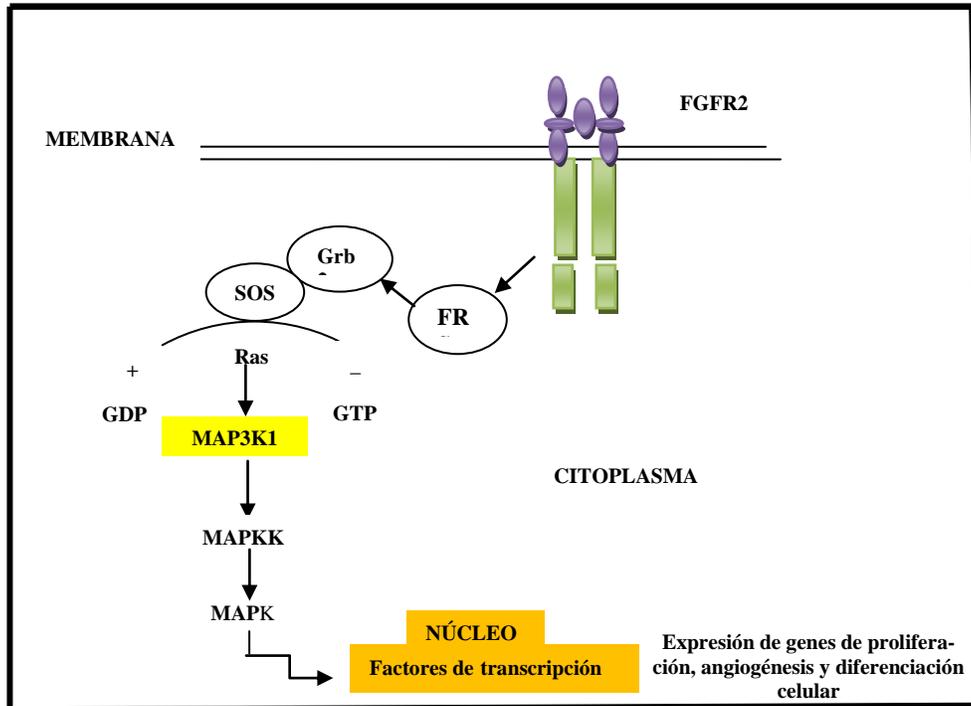


Figura 1. Vía de señalización en donde participan *FGFR2* y *MAP3K1*, que promueve la expresión de factores de transcripción involucrados en el crecimiento y proliferación celular como cMyc, Elk 1, cJun y cFos.

epitelio mamario. Koziczak *et al.*, (2004) observaron en líneas celulares de carcinoma mamario, que las moléculas reguladoras que bloquean la actividad de *FGFR2*, producen el arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular y afectan la señalización a través de la vía MAPK. Este resultado sugiere que la participación de *FGFR2* en la carcinogénesis mamaria está relacionada a mecanismos que regulan el ciclo celular y por ende, la proliferación celular. Alternativamente, la vía de señalización de *FGFR2* es crucial para la supervivencia y proliferación de la glándula mamaria en ratón (Lu *et al.*, 2010).

En relación a la vía de las MAPK y su participación en el desarrollo tumoral, Sivaraman *et al.*, (1997) presentaron el primer hallazgo que demuestra la participación de la vía que incluye a MAPK en tejido tumoral de CM. Los autores demostraron mayor actividad de la vía de las MAPK en cáncer invasivo en comparación con tejido de mama normal. De igual forma concluyeron que la sobreexpresión de estas kinasas podría ser un elemento crítico de iniciación y potencial metastásico de varias formas de CM en humanos. Estos hallazgos fueron confirmados por estudios posteriores (Salh *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2000).

1.4. Variantes comunes de baja penetrancia de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* asociadas al CM

A la fecha se han descrito tres SNPs localizados en el intrón 2 del gen *FGFR2* que presentan asociación con CM: rs1219648 (c.109+7033T>C), rs2420946 (c.109+1899A>G) y rs2981582 (c.109+906T>C) (Easton *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2007, Stacey *et al.*, 2008). Se postula que las variantes de secuencia en el intrón 2, entre ellas las variantes rs1219648, rs2420946 y rs2981582, están muy próximas a los sitios de unión para factores de transcripción como Oct-1/Runx2 y C/EBP β y a sitios putativos de unión del receptor de estrógenos (RE) (Easton *et al.*, 2007), lo cual condicionaría la sobreexpresión del gen *FGFR2* en el CM.

Diferentes autores han evaluado la relación entre las variantes rs1219648, rs2420946 y rs2981582 y riesgo de desarrollar CM mediante estudios caso-control. La Tabla 2 muestra los estudios caso-control de las variantes del intrón 2 del gen *FGFR2* existentes a la fecha en la literatura. En todos los estudios se observa que el alelo de menor frecuencia (alelo de riesgo) de las variantes rs1219648, rs2420946 y rs2981582 se asocia significativamente con CM. En particular, Latif *et al.*, (2009) y Gorodnova *et al.*, (2010) analizaron la variante rs2981582 en casos de CM familiar *BRCA1/2* negativos. Ambos estudios muestran que dicha variante se asocia con riesgo para CM, estimándose en el estudio de Latif *et al.*, (2009) valores de OR =1,20 (IC95% 1,00 – 1,44y en el estudio de Gorodnova *et al.*, (2010) valores de OR= 1,59 (IC95% 1,14–2,21). Zhang *et al.*, (2010) publicaron un meta-análisis que incluyó los resultados de 6 estudios para un total de 5.892 casos y 6.664 controles de individuos

caucásicos y asiáticos. En este estudio, se analizaron los SNPs rs1219648, rs2420946 y rs2981582. Los resultados mostraron que los homocigotos para el alelo de riesgo de cada una de las variantes (GG, TT y TT) presentaron asociación con riesgo de desarrollar CM (OR= 1,56 [IC95% 1,40–1,73]; OR=1,52[IC95% 1,36–1,69] y OR=1,62[IC95% 1,39–1,89], respectivamente). Al estratificar por etnia, el riesgo fue mayor en caucásicos en comparación con los asiáticos. Este meta-análisis concluyó que los SNPs rs1219648, rs2420946 y rs2981582 del gen *FGFR2* aumentan el riesgo de desarrollar CM en las etnias analizadas.

Respecto del gen *MAP3K1*, Easton *et al.*, (2007) reportó que la variante rs889312 se asocia con riesgo para CM. El SNPs rs889312 se ubica en un bloque de desequilibrio de ligamiento de 280 kb dentro del cual se ubica el gen *MAP3K1*. Estos autores analizaron la variante en 4.398 casos y en 4.316 controles en población europea, demostrando asociación significativa con aumento del riesgo para CM (OR alélico =1,13 [IC95% 1,09-1,18]). Los autores concluyeron que el alelo de menor frecuencia (C) del SNP rs889312 es un alelo de riesgo para CM. Latif *et al.*, (2009) analizaron la variante rs889312 en individuos caucásicos. Observaron asociación con aumento del riesgo para CM (OR alélico = 1,26 [IC95% 1,02 – 1,54]) en casos familiares y negativos para mutaciones patogénicas en los genes *BRCA1/2*. Gorodnova *et al.*, (2010) no encontraron asociación en un estudio de características similares. Este resultado podría deberse a la utilización de un tamaño muestral muy bajo. Bornholtz *et al.*, (2010) al estratificar por etnia observaron la mayor asociación en individuos caucásicos (OR alélico =1,18[IC95% 1,03- 1,34]), comparado con individuos de origen afroamericano (OR alélico = 0,95[IC95% 0,80-1,13]) sugiriendo que el riesgo es heterogéneo entre individuos de distinto origen racial. Recientemente, Lu *et al.*, (2010) publicaron un meta-análisis de la variante rs889312 que incluyó los resultados de 7 estudios con un total de 26.015 casos de CM y 33.962 controles. El resultado de este meta-análisis concluyó que esta variante se asocia a CM (OR =1,09 [IC95% 1,07 – 1,12]) y sugiere que es una variante de baja penetrancia. La Tabla 3 resume los estudios caso-control realizados a la fecha para la variante rs889312 del gen *MAP3K1*.

Tabla 2. Resumen de los estudios caso-control de las variantes del intrón 2 del gen *FGFR2*

Estudio	Casos/ Controles	Población de Estudio	Alelo de riesgo	OR alélico (IC 95%)
rs1219648 (A>G)				
Hunter <i>et al</i>	1.145/1.142	Casos de CME y controles caucásicos residentes en EEUU.	G	1,26 (1,17 – 1,35)*
Raskin <i>et al</i>	1.520 /1.528	Casos con HCMF y CME judío-asquenazí residentes en Israel	G	1,23 (1,11 – 1,36)*
Liang <i>et al</i>	1.058/1.078	Casos de CME asiáticos residentes en China	G	1,20 (1,06 – 1,36)*
Kawase <i>et al</i>	456/912	Casos de CME asiáticos residentes en Japón	G	1,20 (1,06 – 1,36)*
Barnholtz <i>et al</i>	1.230/ 1.118 742/ 658	Casos de CME caucásicos y afroamericanos respectivamente, residentes en EEUU	G	(1) 1,30 (1,15 – 1,46) (2)1,19 (1,02 – 1,39)
rs2420946 (C>T)				
Hunter <i>et al</i>	1.145 /1.142	Casos de CME caucásicos	T	1,26(1,18 – 1,36)*
Raskin <i>et al</i>	1.520/1.528	Casos con HCMF y CME judío-asquenazí residentes en Israel	T	1,32 (1,06 -1,44)*
Liang <i>et al</i>	1.058/1.078	Casos de CME asiáticos residentes en China	T	1,17 (1,03 – 1,33)*
Kawase <i>et al</i>	456/912	Casos de CME asiáticos residentes en Japón	T	1,21 (1,02 – 1,44)*
Barnholtz <i>et al</i>	1.230/1.118 742/ 658	Casos de CME caucásicos y afroamericanos respectivamente, residentes en EEUU	T	(1) 1,29 (1,14 – 1,46) (2)1,17 (1,00 – 1,37)
rs2981582 (C>T)				
Raskin <i>et al</i>	1.520/1.528	Casos con HCMF y CME judío-asquenazí residentes en Israel	T	1,24(1,09 – 1,42)*
Boyarskikh <i>et al</i>	766/ 665	Casos de CME caucásicos residentes en Rusia	T	1,45 (1,24 - 1,71)*
Kawase <i>et al</i>	456/912	Casos de CME asiáticos residentes en Japón	T	1,24(1,03 – 1,48)*
Mcinerney <i>et al</i>	988/1.016	Casos de CME caucásicos residentes en Irlanda	T	1,24 (1,07 – 1,38)*

HCFM: Historia de CM familiar; **CME:** Esporádico; **EEUU:** Estados Unidos;(1) caucásicos y (2) afroamericanos; fuente: *(Zhang *et al.*, 2010).

Tabla 2. (Continuación)

Estudio	Casos/ Controles	Población de estudio	Alelo de riesgo	OR alélico (IC 95%)
Barnholtz <i>et al</i>	1.230/1.118 742/658	Casos de CME caucásicos y afroamericanos respectivamente residentes en EEUU.	T	(1)1,29(1,14 – 1,46) (2)1,19(1,02 – 1,39)
Easton <i>et al</i>	4.398/4.316	Casos con HCMF caucásicos residentes en Reino Unido	T	1,26 (1,23 – 1,30)
Gorordnova <i>et al</i>	140/174	Casos con HCMF caucásicos residentes en Rusia	T	1,58(1,12 – 2,24)
Latif <i>et al</i>	722/436	Casos con HCMF caucásicos, residentes en Reino Unido	T	1,19 (0,99 – 1,42)
Han <i>et al</i>	3.321/3.500	Casos con CME residentes en Korea	T	1,40(1,18 – 1,68)

HCFM: Historia de CM familiar; **CME:** Esporádico; **EEUU:** Estados Unidos;(1) caucásicos y (2) afroamericanos; fuente: *(Zhang *et al.*, 2010).

Tabla 3. Resumen de los estudios caso-control para la variante rs889312 del gen *MAP3K1*

Estudio	Casos/ Controles	Población de estudio	Alelo de riesgo	OR alélico (IC 95%)
Latif et al	722/436	Casos con HCMF caucásicos residentes en Reino Unido	C	1,26 (1,02 – 1,54)
Gorodnova et al	140/174	Casos con HCMF caucásicos residentes en Rusia	C	1.01 (0.71-1.44)
Tamini et al	693/747	Casos de CME caucásicos residentes en Suiza	C	1,11 (0,94 – 1,31) ¹
García-Closas et al	23.039/26.273	Casos con HCMF caucásicos ²	C	1,12(1,09–1,16)
Barnholtz et al	1.230/1.118 742/658	Casos de CME afroamericanos y caucásicos respectivamente, residentes en EEUU	C	(1)0,95 (0,80 – 1,13) (2) 1,18 (1,03 – 1,34)
Han et al	3.321/3.500	Casos con CME residentes en Korea	C	1,22(1,06 – 1,41)

HCFM: Historia de CM familiar; **CME:** Esporádico; **EEUU:** Estados Unidos; ¹ Homocigotos CC; ² Residentes de Europa y Asia de 21 estudios; (1) afroamericanos y (2) caucásicos.

En población chilena no existe información en relación a la asociación de las variantes rs1219648, rs2420946 y rs2981582 del gen *FGFR2* ni de la variante rs889312 del gen *MAP3K1* con riesgo para CM. Por lo tanto, el presente estudio evaluará si estas variantes de baja penetrancia aumentan el riesgo de desarrollar CM en pacientes con CM de población chilena negativas para mutaciones *BRCA1* y *BRCA2*.

1.5. Interacción génica entre *FGFR2* y *MAPK31* en CM

Los antecedentes bibliográficos descritos anteriormente indican que los SNPs rs1219648, rs2420946 y rs2981582 del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1* son variantes de baja penetrancia. No obstante, el riesgo que podría

presentar un individuo portador de todas o de algunas de las variantes de riesgo para estos *loci* de susceptibilidad no es del todo claro. Si bien la bibliografía indica que cada una de las variantes en forma individual se asocia con aumento del riesgo a CM, la interacción entre genes podría resultar en efectos aún mayores de lo esperado (García-Closas *et al.*, 2008). Lo anterior podría deberse a que la interacción entre las variantes rs1219648, rs2420946 y rs2981582 del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1* a CM, podría ser consecuencia de la participación coordinada de éstas en una misma vía. El gen *FGFR2* como receptor de factores de crecimiento, participa al inicio de la vía de activación donde *MAPK31* es punto clave al regular la transcripción de genes importantes en el cáncer (Fig 1). Esto sugiere que la interacción entre las variantes de ambos genes de susceptibilidad podría incrementar el riesgo a CM. Rebbeck *et al.*, (2009) han mostrado la acción combinada de algunos *loci* de susceptibilidad para riesgo de CM en individuos de distinto origen étnico. Los autores analizaron interacción entre las variantes: rs2981582 del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1* (*p value* para la interacción= 0.022) en mujeres europeo-americanas y afroamericanas. Observaron interacción de las variantes de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* en las mujeres de origen afroamericano homocigotas CC o heterocigotas AC para la variante rs2981582 del gen *FGFR2* y además homocigotas CC para la variante rs2981582 del gen *FGFR2* (OR= 3.84 [IC95% 1.83–8.04]), efecto que no se observó en el grupo de mujeres europeo-americanas. Este hallazgo apoya la hipótesis de que ambos genes están involucrados en forma conjunta en la susceptibilidad al CM, sin embargo, el riesgo a CM depende del origen étnico.

Considerando los antecedentes antes mencionados, el presente trabajo de tesis propuso evaluar mediante un estudio caso-control, la asociación con CM de variantes de baja penetrancia del gen *FGFR2* (rs1219648, rs2420946 y rs2981582) y del gen *MAP3K1* (rs889312) con aumento del riesgo para CM en mujeres chilenas *BRCA1/2* negativo. También se propuso estudiar la existencia de fenómenos de interacción génica entre las variantes de baja penetrancia de los genes *FGFR2* y *MAP3K1*.

2. HIPOTESIS

Hipótesis 1

Las variantes de baja penetrancia rs1219648, rs2420946 y rs2981582 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1*, son variantes de susceptibilidad para cáncer de mama en mujeres *BRCA1/2* negativas de población chilena.

Hipótesis 2

La interacción génica entre las variantes del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1* aumenta el riesgo para CM en mujeres negativas para mutaciones en los genes *BRCA1/2*.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar la asociación de las variantes de los genes de baja penetrancia *FGFR2* y *MAP3K1* con aumento del riesgo para CM en mujeres chilenas *BRCA1/2* negativas.

Objetivo Específico 1

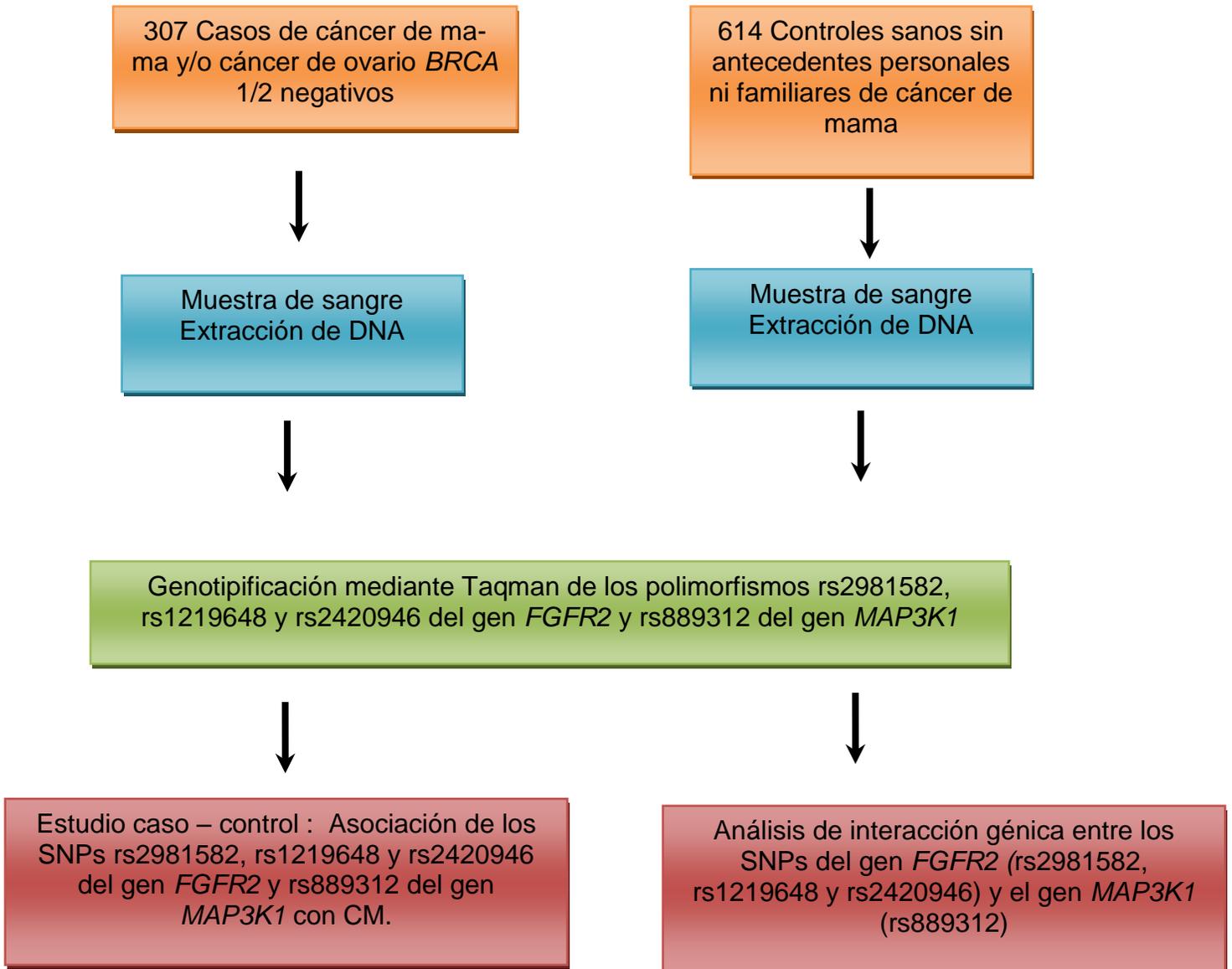
Establecer mediante un estudio caso-control si las variantes rs1219648, rs2420946, rs2981582 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* se asocian con el aumento del riesgo para CM en mujeres chilenas *BRCA1/2* negativo.

Objetivo Específico 2

Estudiar la interacción de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* al evaluar si el ser portadora de las variantes de ambos genes aumenta la asociación con el riesgo para CM, en mujeres chilenas *BRCA1/2* negativas, respecto de ser portadora de solo variantes en uno de los dos genes de susceptibilidad para CM

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental



4.2. Criterios de Selección de los grupos muestrales:

4.2.1. Casos:

Los casos de CM familiar incluidos en este estudio fueron seleccionados de familias considerando los siguientes criterios de selección:

- Dos o más afectados de CM y/o ovario
- Casos de CM sin antecedentes familiares y edad de diagnóstico ≤ 50 años

Cada participante asistió a una entrevista en la que se le explicó los objetivos del estudio y respondieron una encuesta que incluye preguntas relacionadas con su historia médica, reproductiva, etnia y factores de riesgo (Anexo1).

Los casos incluidos en este estudio tienen ancestros chilenos varias generaciones atrás, dato que se obtuvo luego de la entrevista.

Todos los casos fueron analizados para mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* y se seleccionaron sólo los casos *BRCA1/2* negativos. Se incluyeron 307 casos que cumplieron con los criterios de selección antes mencionados. Las Tablas 14 - 17 (Anexo 2) presentan la descripción de los de los casos de acuerdo a los criterios de selección: antecedentes familiares de CM y edad de diagnóstico.

4.2.2. Controles

Este grupo incluye 614 mujeres sanas sin historia personal ni familiar de CM. El grupo control fue pareado por edad y género con los casos. Para su selección se aplicó una encuesta (Anexo 3) que permitió corroborar la ausencia de antecedentes de CM en la familia, u otros cánceres asociados con mutaciones patogénicas en los genes *BRCA1/2*.

4.2.3. Procedencia de los grupos muestrales

Los pacientes con cáncer de mama se seleccionaron principalmente a partir de pacientes derivados a estudio genético a la Corporación Nacional del Cáncer (CONAC). Igualmente otros servicios del Área Metropolitana contribuyeron a la integración de los casos, entre ellos: Unidad de Patología Mamaria del Servicio de Ginecología del

Hospital Clínico San Borja Arriarán; Servicio de Ginecología y Obstetricia Hospital El Salvador; Servicio de Ginecología y Obstetricia Hospital Clínico de la Universidad de Chile; Fundación Arturo López Pérez, Clínica Santa María, Clínica Las Condes. Los controles fueron seleccionados entre las mujeres que asistieron a su control ginecológico de rutina en la Corporación Nacional del Cáncer (CONAC).

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y se encuentra en el marco de ejecución del proyecto FONDECYT 1110081. Todas las mujeres participantes en este estudio, firmaron un consentimiento informado (Anexo 4) y aceptaron realizarse el estudio genético respectivo.

4.3. Extracción del DNA genómico

A cada participante se le extrajo 10mL de sangre periférica mediante punción venosa del antebrazo los que se colectaron en un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de estas muestras se extrajo DNA genómico total utilizando la técnica de Chomczynski *et al.*,(2006). Para determinar la concentración y pureza del DNA obtenido se midió la absorbancia a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro modelo Shimatzu. La concentración de DNA se calculó considerando que 1 unidad de absorbancia a 260nm corresponde a 50µg/ml. Las soluciones de trabajo tuvieron una concentración de 2.5ng/µl.

4.4. Genotipificación de los polimorfismos rs1219646, rs2981582, rs2420946 y rs889312.

La genotipificación de los SNP rs2420946 (c.109+1899A>G), rs1219648 (g.123346190A>G), rs2981582 (c.109+906T>C) del gen *FGFR2* y rs889312 (g.6626243C>A) del gen *MAP3K1*, se llevó a cabo utilizando el ensayo 5' Exonucleasa (Taqman®). La técnica consistió en la elaboración de una mezcla de reacción que incluyó 2.0 ul de DNA (2.5 ng/ul), 5.0 ul de Universal Master Mix 2x de TaqMan®

(Applied Biosystems®), 0.25 ul de Taqman® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems®) y 2.75 ul de agua libre de DNasa, para un volumen final de 10 ul en cada pocillo. De los reactivos antes mencionados, el Universal Master Mix 2x de Taqman® incluyó dNTPs, buffer, AmpliTaq Gold®DNA Polimerasa y ROX como fluoróforo de referencia interna. El Ensayo para Genotipificación de Taqman® (5' Exonucleasa de Taqman®) contuvo 2 cebadores específicos y 2 sondas específicas para cada SNP que están marcadas con los fluorocromos o Reporteros VIC y 6FAM respectivamente en el extremo 3' y con un *quencher* en su extremo 5'. Los cuatro ensayos se encuentran disponibles como ensayos prediseñados por Applied Biosystems®. La reacción se realizó en un Equipo de PCR en tiempo Real Step One (Applied Biosystems®) con el siguiente protocolo de reacción: 60°C / 0:30 , 95°C /10:00, seguido de 50 ciclos de: 92°C / 0:15 + 60°C /0:30 para finalizar con 60°C / 0:30.

La discriminación alélica se realizó en el software Step one V2.1 (Applied Biosystems®). Se visualizó en un gráfico el aumento de la fluorescencia en el tiempo. Los gráficos que mostraron curvas de fluorescencia para VIC y 6FAM identificaron a individuos de genotipo heterocigoto (ej. CT), una sola curva de fluorescencia para VIC identificó a los individuos de genotipo homocigoto del alelo 1 (ej. CC) y fluorescencia para 6FAM identificó a los individuos homocigotos para el alelo 2 (ej. TT).

4.5. Análisis estadístico aplicado al estudio

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para casos y controles y se determinó si estaban en Equilibrio de Hardy-Weinberg usando un test de bondad de ajuste (χ^2) a través del programa STATA versión 8.2.

Para comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles se utilizó el test exacto de Fisher de una cola. Se consideró significativo valores de $p < 0,05$.

La fuerza de asociación de los polimorfismos de cada gen con CM, se estimó utilizando la razón de posibilidades (OR, Odds ratio) con su intervalo de confianza al 95%; donde,

$$OR = \frac{a/c}{b/d}$$

OR	Casos	Controles	Total
Expuestos	a	b	a + b
No expuestos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	N

Todos los cálculos se realizaron utilizando el programa STATA 8.2 para Windows (Statistics Data Analysis).

4.5.1. Análisis de interacción entre las variantes analizadas de los genes *FGFR2* y *MAP3K1*

El análisis de interacción se realizó mediante el análisis de regresión logística binaria. Este test estimó el riesgo que presentaron los individuos portadores de los alelos de riesgo de ambos *loci* e hizo comparaciones con el riesgo de los portadores de sólo un alelo de riesgo. Los resultados fueron evaluados basándose en el modelo presentado en la Tabla 4; Donde la interacción significó que los portadores del alelo de riesgo de ambos loci (OR3) fue mayor a $OR_1 \times OR_2$. (Botto LD y Khoury MJ, 2001). Se evaluó el modelo de interacción multiplicativo de dos variantes propuesto por Brenna, (2002). Este modelo supone que si el efecto conjunto de dos variantes (OR_{11}) es mayor que el producto de los efectos individuales ($OR_{10} \times OR_{01}$), entonces la interacción está presente.

Tabla 4. Relación entre los portadores de las variantes de riesgo y OR

Portador del alelo de riesgo de la variante 1	Portador del alelo de riesgo de la variante 2	OR
+	-	OR1
-	+	OR2
+	+	OR3

OR: Odds ratio

5. RESULTADOS

5.1. Características de los casos de CM

Este trabajo de tesis incluyó casos de CM que cumplieron con los criterios de inclusión definidos en el capítulo materiales y métodos. Los casos pertenecieron a familias con historia familiar de cáncer de mama o fueron casos sin antecedentes familiares de CM y edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años). En todos los casos incorporados se realizó tamizaje de mutaciones en la secuencia codificante completa y regiones intrónicas circundantes de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Los 307 casos seleccionados correspondieron a pacientes negativas para mutaciones puntuales en ambos genes de susceptibilidad.

5.2. Análisis de asociación de las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* con riesgo para CM

En este estudio las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* se analizaron en los 307 casos de CM *BRCA1/2* negativo y en 614 controles sanos sin antecedentes de CM.

5.2.1. Genotipificación de las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* mediante el ensayo 5'Exonucleasa (Taqman) por PCR en tiempo real.

La Figura 2 muestra el gráfico de discriminación alélica para la variante rs2420946 del gen *FGFR2*. Para las otras variantes del gen *FGFR2* (rs1219648 y rs2981582) y del gen *MAP3K1* (rs889312) se observó el mismo gráfico para la discriminación alélica.

Figura 2

Gráfico de discriminación alélica para el SNP rs2420946 del gen *FGFR2*

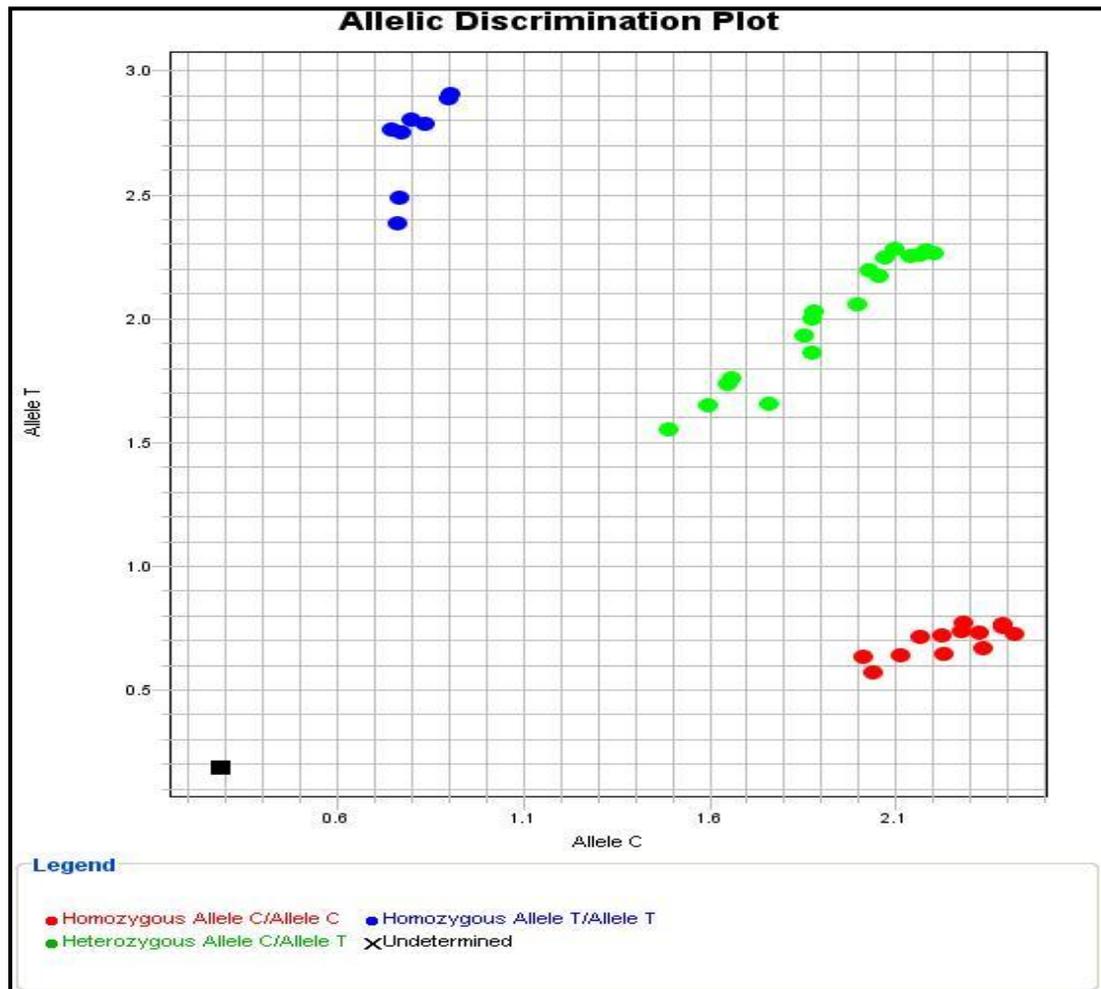


Figura 2. Gráfico de discriminación alélica para los 3 genotipos (CC, CT y TT) del SNP rs2420946 del gen *FGFR2* en el software stepone v2.1. Los puntos rojos representan a los homocigotos CC, los verdes los heterocigotos CT y los azules los homocigotos TT. El cuadrante negro representa el control negativo.

5.2.2. Análisis de asociación de la variante rs1219648 del gen *FGFR2* con riesgo para CM

La distribución de los genotipos de la variante rs1219648 del gen *FGFR2* en los controles, no difirió significativamente de la esperada de acuerdo al Equilibrio de Hardy-Weinberg con valor de p mayor a 0,05.

La Tabla 5 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs1219648 del gen *FGFR2* en 307 casos de CM *BRCA 1/2* negativo y en 614 controles sanos sin antecedentes de CM. Al analizar el total de la muestra ($n=307$) se observó que el alelo de menor frecuencia (alelo G) fue más prevalente en los casos (0,48) en comparación con los controles (0,40), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,01$). Los resultados indican que el alelo G se asocia con aumento del riesgo para CM de 1,37 veces ($OR= 1,37$ [IC95% 1,1 – 1,7]). Este resultado permite proponer que el alelo G del rs1219648 de *FGFR2* es un alelo de riesgo en población chilena. La Tabla 5 también muestra la distribución de las frecuencias genotípicas. Se observó que los portadores del alelo G tanto en condición heterocigótica como homocigótica (AG y GG, respectivamente) para el alelo de menor frecuencia fueron más frecuentes en los casos (51% y 22%) en comparación con los controles (47% y 17%) ambas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p= 0,01$ y $p\leq 0,01$). Tanto los portadores del alelo de riesgo (heterocigotos AG) como los individuos homocigotos para este alelo (GG), se asociaron con un aumento del riesgo para CM de 1,49 veces ($OR=1,49$ [IC95% 1,1 – 2,1]) y de 1,83($OR= 1,83$ [IC95% 1,2 – 2,8]), respectivamente.

Los casos con CM se subdividieron en dos subgrupos; el primero incluyó a los casos con historia familiar de CM ($n= 198$) y el segundo incluyó a los casos sin historia familiar de CM pero con edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años) ($n= 109$). En ambos subgrupos se analizó la distribución alélica y genotípica del SNP rs1219648 del gen *FGFR2*. En el subgrupo de casos con historia familiar de CM, el análisis de las frecuencias alélicas mostró una mayor frecuencia del alelo (G) en los casos (0,47)

Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs1219648 del gen *FGFR2* en casos *BRCA1/2* negativo y controles sanos

rs1219648		Casos de CM en la muestra completa (n= 307)			Casos de CM con historia familiar de CM (n=198)			Casos de CM ≤50 sin historia familiar de CM (n=109)		
Genotipos	Controles (%)n=614	Casos (%)	OR (IC 95%)	P	Casos (%)	OR (IC 95%)	P	Casos	OR (IC 95%)	P
AA	222 (36%)	81(27%)	1,00(referencia)	-	55(28%)	1,00(referencia)	-	26(24%)	1,00(referencia)	-
AG	289 (47%)	157(51%)	1,49(1,1 – 2,1)	0,01	100(50%)	1,39(0,9 - 2,1)	0,05	57(52%)	1,68(1,0 – 3,0)	0,02
GG	103(17%)	69(22%)	1,83(1,2 – 2,8)	<0,01	43(22%)	1,68(1,0 – 2,7)	0,02	26(24%)	2,15(1,1 – 4,1)	0,01
Alelo A	733(0,60)	319(0,52)	1,00(referencia)	-	210(0,53)	1,00(referencia)	-	109(0,50)	1,00(referencia)	-
Alelo G	495(0,40)	295(0,48)	1,37(1,1 – 1,7)	<0,01	186(0,47)	1,31(1,0 – 1,6)	0,01	109(0,50)	1,48(1,1 – 2,0)	0,01

OR: Odds ratio; CM: Cáncer de mama; IC: Intervalo de confianza

respecto de los controles (0,40). La diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,01$). Al analizar el riesgo para CM, los heterocigotos AG no presentaron asociación significativa con el aumento del riesgo para CM ($OR= 1,39[IC95\% 0,94 - 2,1]$; $p= 0,05$). Sin embargo, los individuos homocigotos para el alelo de menor frecuencia (GG) presentaron aumento del riesgo de desarrollar CM ($OR= 1,68[IC95\% 1,0 - 2,7]$; $p= 0,02$). Estos resultados indican que son necesarias ambas copias del alelo G para observar asociación con el aumento del riesgo para CM en individuos con historia familiar de la enfermedad.

En relación a los casos de CM sin historia familiar con edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años), el alelo G fue más frecuente en los casos (0,50) respecto de los controles (0,40). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p= 0,01$). Los homocigotos para el alelo de riesgo (GG) presentaron mayor frecuencia en los casos (24%) en comparación con los controles (17%) ($p= 0,01$). Igualmente la frecuencia de heterocigotos (AG) fue mayor en los casos (52%) respecto de los controles (47%; $p= 0,02$). Tanto los heterocigotos como los homocigotos para el alelo de riesgo (AG y GG, respectivamente) presentaron asociación con el aumento del riesgo para CM de 1,68 ($OR= 1,68 [IC95\% 1,0 - 3,0]$) y 2,15 ($OR= 2,15 [IC95\% 1,1 - 4,1]$). En consecuencia, tanto la condición heterocigótica como la homocigótica para el alelo de menor frecuencia aumentan el riesgo de desarrollar CM en los casos de diagnóstico temprano y sin historia familiar para CM.

Estos resultados permiten sugerir que el alelo G del SNP rs1219648 del gen *FGFR2* se asocia con aumento del riesgo para CM, tanto en casos de CM familiar como en casos sin historia familiar de la enfermedad pero con diagnóstico temprano (≤ 50 años).

5.2.3. Análisis de asociación de la variante rs2981582 del gen *FGFR2* con riesgo para CM

La distribución de los genotipos de la variante rs2981582 del gen *FGFR2* en los controles, no difirió significativamente de la esperada de acuerdo al Equilibrio de Hardy-Weinberg con valor de p mayor a 0,05.

La Tabla 6 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs2981582 del gen *FGFR2* en 307 casos de CM *BRCA 1/2* negativo y en 614 controles sanos sin antecedentes de CM.

Al analizar el total de la muestra (n= 307) se observó que el alelo de menor frecuencia (alelo T) fue más prevalente en los casos (0,48) en comparación con los controles (0,40), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los resultados indican que el alelo T se asocia con aumento del riesgo para CM de 1,40 veces (OR=1,40 [IC95% 1,1 – 1,7]). Este resultado permite proponer que el alelo T del rs2981582 del gen *FGFR2* es un alelo de riesgo en población chilena. La Tabla 6 también muestra la distribución de las frecuencias genotípicas. Se observa que los portadores del alelo T tanto en condición heterocigótica como homocigótica para el alelo de menor frecuencia (CT y TT, respectivamente) fueron más frecuentes en los casos (48% y 23%) en comparación con los controles (46% y 16%) ambas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,02$ y $p < 0,01$). Tanto los heterocigotos CT como los homocigotos TT, se asociaron con un aumento del riesgo para CM de 1,40 veces (OR=1,40 [IC95% 1,0 – 1,9]) y de 1,91 veces (OR= 1,91 [IC95% 1,3 – 2,9]), respectivamente.

El análisis de este SNP también se realizó en los dos subgrupos considerados en el análisis del rs1219648 del gen *FGFR2*. En el subgrupo de casos con historia familiar de CM, el análisis de las frecuencias alélicas mostró mayor frecuencia del alelo de riesgo (T) en los casos (0,47) respecto de los controles (0,40) y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Al analizar el riesgo para CM, los heterocigotos CT no presentaron asociación significativa con aumento del riesgo para CM (OR= 1,24 [IC95% 0,8 – 1,8]; $p = 0,14$). Sin embargo, los homocigotos TT presentaron un aumento del riesgo de 1,87 veces (OR=1,87 [IC95% 1,2 – 3,0]; $p < 0,01$) de desarrollar CM. Estos resultados indicaron que son necesarias ambas copias del alelo T para observar asociación con el aumento del riesgo para CM en individuos con historia familiar de la enfermedad.

En relación a los casos de CM sin historia familiar y edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años) el alelo T fue más frecuente en los casos (0,49) respecto de los

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs2981582 del gen *FGFR2* en casos *BRCA1/2* negativo y controles sanos

rs2981582		Casos de CM en la muestra completa (n= 307)			Casos de CM con historia familiar de CM (n=198)			Casos de CM ≤50 sin historia familiar de CM (n=109)		
Genotipos	Controles (%) n=614	Casos (%)	OR (IC 95%)	P	Casos (%) n=198	OR(IC 95%)	P	Casos n= 109	OR(IC 95%)	P
CC	230 (37%)	86 (28%)	1,00(referencia)	-	59 (30%)	1,00(referencia)	-	27 (25%)	1,00(referencia)	-
CT	282 (46%)	148 (48%)	1,40(1,0 – 1,9)	0,02	90(45%)	1,24(0,8-1,8)	0,14	58 (53%)	1,75(1,0-3,0)	0,01
TT	102 (16%)	73 (24%)	1,91(1,3 – 2,9)	<0,01	49 (25%)	1,87(1,2-3,0)	<0,01	24 (22%)	2,00(1,0-3,8)	0,02
C	742 (0,60)	320 (0,52)	1,00(referencia)		208 (0,53)	1,00(referencia)		112 (0,51)	1,00(referencia)	
T	486 (0,40)	294 (0,48)	1,40(1,1 – 1,7)	<0,01	188 (0,47)	1,38(1,1-1,7)	<0,01	106 (0,49)	1,44(1,1-1,9)	0,01

OR: Odds ratio ; **CM:** Cáncer de mama; **IC:** Intervalo de confianza.

controles (0,40). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p= 0,01$). Los homocigotos para el alelo de riesgo (TT) presentaron mayor frecuencia en los casos (22%) en comparación con los controles (16%); la diferencia fue estadísticamente significativa. Igualmente, la frecuencia de heterocigotos (CT) fue mayor en los casos (53%) respecto de los controles (46%) y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,01$). Tanto los heterocigotos como los homocigotos para el alelo de riesgo (CT y TT, respectivamente) presentaron asociación con aumento del riesgo para CM de 1,75 veces ($OR=1,75$ [IC95% 1,0 – 3,0]) y 2,00 veces ($OR=2,00$ [IC95% 1,0 – 3,8]). En consecuencia, tanto la condición heterocigótica como la homocigótica para el alelo de menor frecuencia aumentan el riesgo de desarrollar CM en los casos de diagnóstico temprano y sin historia familiar para CM.

5.2.4. Análisis de asociación de la variante rs2420946 del gen *FGFR2* con riesgo para CM

La distribución de los genotipos de la variante rs2420946 del gen *FGFR2* en los controles no difirió significativamente de la esperada de acuerdo al Equilibrio de Hardy-Weinberg, con valor de p mayor a 0,05.

La Tabla 7 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs2420946 del gen *FGFR2* en 307 casos de CM *BRCA 1/2* negativo y en 614 controles sanos sin antecedentes de CM.

Al analizar el total de la muestra ($n= 307$) se observó que el alelo de menor frecuencia (alelo T) fue más prevalente en los casos (0,49) en comparación con los controles (0,40) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,01$). Los resultados indican que el alelo T se asocia con aumento del riesgo para CM en 1,43 veces ($OR= 1,43$ [IC95% 1,2 – 1,7]). Este resultado permite proponer que el alelo T del rs2420946 del gen *FGFR2* es un alelo de riesgo en población chilena. La Tabla 7 muestra también la distribución de las frecuencias genotípicas. Se observó que los portadores del alelo T tanto en condición heterocigótica como homocigótica para el alelo de menor frecuencia (CT y TT, respectivamente) fueron más frecuentes en los casos (49% y 24%) en comparación con los controles (47% y 17%) ambas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p= 0,02$ y $p= 0,01$, respectivamente).

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs2420946 del gen *FGFR2* en casos *BRCA1/2* negativo y controles sanos.

rs2420946	Casos de CM en la muestra completa (n= 307)				Casos de CM con historia familiar de CM (n=198)			Casos de CM ≤50 sin historia familiar de CM (n=109)		
	Genotipos	Controles (%) n=614	Casos (%)	OR (IC 95%)	P	Casos (%) n=198	OR(IC 95%)	P	Casos n=109	OR (IC 95%)
CC	222(36%)	82(27%)	1,00(referencia)	-	55(28%)	1,00(referencia)	-	27(25%)	1,00(referencia)	-
CT	291(47%)	149(49%)	1,39(1,0 – 1,9)	0,02	95(48%)	1,32(0,9 – 1,9)	0,08	54(50%)	1,52(0,9 – 2,6)	0,06
TT	101(17%)	76(24%)	2,03(1,3 – 3,1)	<0,01	48(24%)	1,91(1,2- 3,1)	<0,01	28(25%)	2,27(1,2 – 4,2)	<0,01
C	735(0,60)	313(0,51)	1,00(referencia)	-	205(0,52)	1,00(referencia)	-	108(0,50)	1,00(referencia)	-
T	493(0,40)	301(0,49)	1,43(1,2 -1,7)	<0,01	191(0,48)	1,39(1,1 – 1,7)	<0,01	110(0,50)	1,52(1,1 – 2,0)	<0,01

OR: Odds ratio ; **CM:** Cáncer de mama; **IC:** Intervalo de confianza

Tanto los heterocigotos CT como los homocigotos TT, se asociaron con un aumento del riesgo de 1,39 veces (OR= 1,39[IC95% 1,0 – 1,9]) y de 2,03 veces (OR= 2,03 [IC95% 1,3 – 3,1]), respectivamente.

El análisis de este SNP también se realizó en los dos subgrupos considerados en el análisis del rs1219648 del gen *FGFR2*. En el subgrupo de casos con historia familiar de CM, el análisis de las frecuencias alélicas mostró mayor frecuencia del alelo de riesgo (T) en los casos (0,48) respecto de los controles (0,40) y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Al analizar el riesgo para CM, los heterocigotos CT no presentaron asociación significativa con el aumento del riesgo para CM (OR= 1,32 [IC 95% 0,9 – 1,9]; $p = 0,08$). Sin embargo, los individuos homocigotos TT presentaron un aumento del riesgo de 1,91 veces de desarrollar CM (OR= 1,91 [IC95% 1,2 – 3,1]; $p < 0,01$). Estos resultados indicaron que son necesarias ambas copias del alelo T para observar asociación con el aumento del riesgo para CM en individuos con historia familiar de la enfermedad.

En relación a los casos de CM sin historia familiar y edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años) el alelo T fue más frecuente en los casos (0,50) respecto de los controles (0,40). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los homocigotos para el alelo de riesgo (TT) presentaron mayor frecuencia en los casos (25%) en comparación con los controles (17%) y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los heterocigotos CT no se asociaron significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR= 1,52 [IC95% 0,9 – 2,6]; $p = 0,06$); sin embargo, la condición homocigótica para el alelo de riesgo (TT) se asoció con un aumento de 2,27 veces el riesgo de desarrollar CM (OR=2,27 [IC95% 1,2 – 4,2]). Por lo tanto, en los casos de diagnóstico temprano y sin historia familiar de CM son necesarias ambas copias del alelo T para observar asociación con el riesgo para CM.

5.2.5. Análisis de asociación de la variante rs889312 del gen *MAP3K1* con riesgo para CM

La distribución de los genotipos de la variante rs889312 del gen *MAP3K1* en los controles no difirió significativamente de la esperada de acuerdo al Equilibrio de Hardy-Weinberg, con valor de p mayor a 0,05.

La Tabla 8 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas para la variante rs889312 del gen *MAP3K1* en 307 casos de CM *BRCA 1/2* negativo y en 614 controles sanos sin antecedentes de CM.

Al analizar el total de la muestra (n= 307) se observó que el alelo de menor frecuencia (alelo C) fue más prevalente en los casos (0,45) en comparación con los controles (0,36) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los resultados indican que el alelo C se asocia con aumento del riesgo para CM de 1,45 veces (OR= 1,45 [IC95% 1,2 – 1,8]). Este resultado permite proponer que el alelo C del rs889312 del gen *MAP3K1* es un alelo de riesgo en población chilena. La Tabla 8 también muestra la distribución de las frecuencias genotípicas. Se observó que los homocigotos para el alelo de menor frecuencia (CC) son más frecuentes en los casos (22%) en comparación con los controles (14%) siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los heterocigotos CT no presentaron asociación significativa con el aumento del riesgo para CM (OR= 1,29 [IC95% 0,9 – 1,8]; $p = 0,06$). Los homocigotos CC se asociaron con un aumento del riesgo para CM de 2,10 veces (OR= 2,10 [IC95% 1,4 – 3,1]) de desarrollar CM.

El análisis de este SNP también se realizó en los dos subgrupos considerados en el análisis de las variantes del gen *FGFR2*. En el subgrupo de casos con historia familiar de CM, el análisis de las frecuencias alélicas mostró mayor frecuencia del alelo de riesgo C en los casos (0,44) respecto de los controles (0,36) y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Al analizar el riesgo para CM, los heterocigotos AC no presentaron asociación significativa con el aumento del riesgo para CM (OR= 1,22 [IC95% 0,8 – 1,8]; $p = 0,15$). Sin embargo, los homocigotos CC presentaron un aumento del riesgo de 1,95 veces (OR= 1,95 [IC95% 1,2 – 3,1]; $p < 0,01$) de desarrollar CM. Estos resultados indican que son necesarias ambas copias del alelo C para observar asociación con el aumento del riesgo para CM en individuos con historia familiar de la enfermedad.

En relación a los casos de CM sin historia familiar y edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años), el alelo C fue más frecuente en los casos (0,47) respecto de los controles (0,36). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los homocigotos CC presentaron mayor frecuencia en los casos (24%) en comparación con los

controles (14%) y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los heterocigotos CT no se asociaron significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR= 1,41 [IC95% 0,9 – 2,3]; $p = 0,09$); sin embargo, el homocigoto CC se asoció con un aumento de 2,40 veces (OR= 2,40 [IC95% 1,3 – 4,4]) el riesgo de desarrollar CM. Por lo tanto, en los casos de diagnóstico temprano y sin historia familiar de CM son necesarias ambas copias del alelo C para observar asociación con el riesgo para CM. En resumen y de acuerdo a los resultados para la variante rs889312 del gen *MAP3K1*, se sugiere que son necesarias ambas copias del alelo de riesgo C para observar asociación con el aumento del riesgo para CM en población chilena.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas de la variante rs889312 del gen *MAP3K1* en casos *BRCA1/2* negativo y controles sanos.

rs889312		Casos de CM en la muestra completa (n= 307)			Casos de CM con historia familiar de CM (n=198)			Casos de CM ≤50 sin historia familiar de CM (n=109)		
Genotipos	Controles (%) n=614	Casos (%)	OR (IC 95%)	P	Casos (%) n=198	OR(IC 95%)	P	Casos(%) n=109	OR (IC95%)	P
AA	256(42%)	100(33%)	1,00(referencia)	-	67(34%)	1,00(referencia)	-	33(30%)	1,00(referencia)	-
AC	274(44%)	138(45%)	1,29(0,9 – 1,8)	0,06	88(44%)	1,22(0,8 – 1,8)	0,15	50(46%)	1,41(0,9 – 2,3)	0,09
CC	84(14%)	69(22%)	2,10(1,4 – 3,1)	<0,01	43(22%)	1,95(1,2 – 3,1)	<0,01	26(24%)	2,40(1,3 – 4,4)	<0,01
A	786(0,64)	338(0,55)	1,00(referencia)	-	222(0,56)	1,00(referencia)	-	116(0,53)	1,00(referencia)	-
C	442(0,36)	276(0,45)	1,45(1,2 – 1,8)	<0,01	174(0,44)	1,39(1,1 – 1,8)	<0,01	102(0,47)	1,56(1,2 – 2,1)	<0,01

OR: Odds ratio ; **CM:** Cáncer de mama; **IC:** Intervalo de confianza

5.3. Análisis de Interacción génica entre los genes *FGFR2* y *MAP3K1*

En este trabajo de tesis se analizó la interacción entre los genes *FGFR2* y *MAP3K1* en los 307 casos de CM negativos para mutaciones *BRCA1/2* y en los 614 controles sanos sin antecedentes de CM.

5.3.1. Análisis de interacción entre la variante rs1219648 del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1*.

La Tabla 9 muestra la distribución de los genotipos combinados para el SNP rs1219648 del gen *FGFR2* y del SNP rs889312 del gen *MAP3K1* en 307 casos de CM *BRCA1/2* negativo y en 614 controles sanos.

En la muestra completa, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs1219648 del gen *FGFR2* y homocigoto para el alelo de riesgo del SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (AA/CC) se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR=2,28[IC95% 1,1 – 4,6]; p= 0,02). Este resultado sugiere que el homocigoto de riesgo CC del gen *MAP3K1* por si solo aumenta el riesgo de CM. En relación al genotipo combinado homocigoto para el alelo de riesgo de la variante rs1219648 del gen *FGFR2* y homocigoto normal de la variante rs889312 del gen *MAP3K1* (GG/AA), este no se asoció significativamente con riesgo para CM (OR= 1,92[IC95% 0,9 – 3,7]; p=0,06). Este resultado sugiere que el homocigoto de riesgo para la variante rs1219648 del gen *FGFR2* (genotipo GG) no aumenta el riesgo en presencia del homocigoto normal (genotipo AA) de la variante rs889312 del gen *MAP3K1*. Se observaron resultados significativos para los genotipos combinados: heterocigotos AG del SNP rs1219648 / heterocigotos AC del SNP rs889312 y heterocigotos AG del SNP rs1219648 / homocigotos CC del SNP rs889312 (Tabla 13). En relación al doble homocigoto de riesgo para las variantes rs1219648 y rs889312 de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* (GG/CC), se observó que es más frecuente en los casos (6%) respecto de los controles (2%) y que la diferencia es estadísticamente significativa (p<0,01). Este genotipo compuesto aumentó en 4,38 veces el riesgo para CM (OR= 4,38[IC95% 1,9 – 10,0]; p= <0,01). El modelo de interacción multiplicativo entre dos variantes supone que si el efecto conjunto de dos variantes (OR₁₁)

Tabla 9. Distribución de frecuencias de los genotipos combinados para el rs1219648 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* en controles sanos y en casos de CM *BRCA1/2* negativo y controles sanos.

Casos de CM en la muestra completa (n= 307)				
Genotipos combinados (<i>FGFR2</i> rs1219648 – <i>MAP3K1</i> rs889312)	Controles (%) n=614	Casos (%)	OR (IC 95%)	p
AA/AA	95(16%)	26(8%)	1,00(referencia)	-
AA/AC	95(16%)	35(11%)	1,35(0,7 – 2,4)	0,38
AA/CC	32(5%)	20(7%)	2,28(1,1 – 4,6)	0,02
AG/AA	123(20%)	54(18%)	1,60(0,9 – 2,7)	0,09
AG/AC	129(21%)	72(24%)	2,03(1,2 – 3,4)	0,01
AG/CC	37(6%)	31(10%)	3,06(1,6 – 5,8)	<0,01
GG/AA	38(6%)	20(6%)	1,92(0,9 – 3,7)	0,06
GG/AC	50(8%)	31(10%)	2,26(1,2 – 4,2)	0,01
GG/CC	15(2%)	18(6%)	4,38(1,9 – 10,0)	<0,01
Casos de CM con historia familiar de CM (n=198)				
AA/AA	95(16%)	17(9%)	1,00(referencia)	-
AA/AC	95(16%)	25(13%)	1,47(0,7 – 2,9)	0,26
AA/CC	32(5%)	13(7%)	2,27(1,0 – 5,2)	0,05
AG/AA	123(20%)	36(18%)	1,63(0,9 – 3,1)	0,13
AG/AC	129(21%)	44(22%)	1,91(1,0 – 3,5)	0,04
AG/CC	37(6%)	20(10%)	3,02(1,4 – 6,4)	<0,01
GG/AA	38(6%)	14(7%)	2,06(0,9 – 4,6)	0,08
GG/AC	50(8%)	19(9%)	2,12(1,0 – 4,4)	0,05
GG/CC	15(2%)	10(5%)	3,72(1,4 – 9,6)	0,01
Casos de CM ≤ 50 años sin historia familiar de CM (n=109)				
AA/AA	95(16%)	9(8%)	1,00(referencia)	-
AA/AC	95(16%)	10(9%)	1,11(0,4 – 2,8)	0,82
AA/CC	32(5%)	7(6%)	2,31(0,8 – 6,7)	0,12
AG/AA	123(20%)	18(16%)	1,54(0,6 – 3,6)	0,31
AG/AC	129(21%)	28(26%)	2,29(1,0 – 5,1)	0,04
AG/CC	37(6%)	11(10%)	3,14(1,2 – 8,2)	0,02
GG/AA	38(6%)	6(5%)	1,67(0,5 – 5,0)	0,36
GG/AC	50(8%)	12(11%)	2,53(1,0 – 6,4)	0,05
GG/CC	15(2%)	8(7%)	5,63(1,9 – 17,0)	<0,01

OR: Odds ratio; CM: Cáncer de mama; IC: Intervalo de confianza

es mayor que el producto de los efectos individuales ($OR_{10} \times OR_{01}$), entonces la interacción está presente (Brenna 2002). Se observó un incremento del riesgo para CM para el doble homocigoto de riesgo (GG/CC; OR observado = 4,38); sin embargo, no se observó interacción de tipo multiplicativa ya que el OR observado no fue mayor al OR esperado ($OR_{esperado} = 2,28 \times 1,92 = 4,37$). Los casos con CM se subdividieron en dos subgrupos; el primero incluyó a los casos con historia familiar de CM ($n = 198$) y el segundo incluyó a los casos sin historia familiar de CM con edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años) ($n = 109$). En ambos subgrupos se analizó la distribución de los genotipos combinados para los SNPs rs1219648 y rs889312. En relación a los casos con historia familiar, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs1219648 del gen *FGFR2* y homocigoto de riesgo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (AA/CC), no se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR= 2,27 [IC95% 1,0 – 5,2] ; $p = 0,05$). Este resultado sugiere que el homocigoto de riesgo CC del gen *MAP3K1* no es capaz de aumentar el riesgo para CM en este subgrupo. En relación al genotipo combinado homocigoto de riesgo para la variante rs1219648 del gen *FGFR2* y homocigoto normal para la variante rs889312 del gen *MAP3K1* (GG/AA), éste no presentó asociación significativa con riesgo para CM (OR= 2,06 [IC95% 0,9 – 4,6]; $p = 0,08$). Este resultado sugiere que el homocigoto de riesgo para la variante rs1219648 del gen *FGFR2* (genotipo GG) no aumenta el riesgo en presencia del homocigoto normal (genotipo AA) para la variante rs889312 del gen *MAP3K1*. Se observó resultados significativos para los genotipos combinados: heterocigotos AG del SNP rs1219648 / heterocigotos AC del SNP rs889312; asimismo, para los genotipos combinados: heterocigotos AG del SNP rs1219648 / homocigotos CC del SNP rs889312 y homocigotos GG del SNP rs1219648 / heterocigotos AC del SNP rs889312 (Tabla 9). Respecto al doble homocigoto de riesgo para las variantes rs1219648 y rs889312 de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* (GG/CC), se observó que es más frecuente en los casos (5%) respecto de los controles (2%), y que la diferencia es estadísticamente significativa ($p = 0,01$). Este genotipo compuesto aumentó 3,72 veces el riesgo para CM (OR=3,72 [IC95% 1,4 – 9,6]); por lo tanto, se observó un incremento del riesgo para CM del doble homocigoto de riesgo (GG/CC). Sin embargo, no se observó interacción de tipo multiplicativa ya que el OR

observado no fue mayor al OR esperado (OR observado = 3,72); (OR esperado $2,27 \times 2,06 = 4,67$).

En relación a los casos sin historia familiar de CM y con diagnóstico temprano, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs1219648 del gen *FGFR2* y homocigoto de riesgo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (AA/CC) no se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR=2,31 [IC95% 0,8 – 6,7]; p= 0,12). Igualmente, el genotipo combinado homocigoto de riesgo para el SNP rs1219648 del gen *FGFR2* y el homocigoto normal para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1*, no presentó asociación significativa con el riesgo para CM (OR=1,67[IC95% 0,5 – 5,0]; p= 0,36). Se observó resultados significativos para los genotipos combinados: heterocigotos AG del SNP rs1219648 / heterocigotos AC del SNP rs889312 y heterocigotos AG del SNP rs1219648 / homocigotos CC del SNP rs889312 (Tabla 9). Sin embargo, la presencia de ambos genotipos de riesgo (GG/CC) de ambos *loci* de susceptibilidad incrementó el riesgo (OR= 5,63 [IC95% 1,9 – 17,0]; p<0,01). Es decir, la presencia de ambas variantes de riesgo en condición homocigótica incrementó el riesgo para CM en 5,63 veces. El OR esperado para interacción multiplicativa es 3,86 (2,31x 1,67). Considerando que el OR observado (5,63) es mayor al esperado (3,86), se puede proponer que existe interacción multiplicativa entre ambas variantes en casos de CM sin historia familiar y diagnóstico temprano.

5.3.2. Análisis de interacción entre la variante rs2981582 del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1*.

La Tabla 10 muestra la distribución de los genotipos combinados para el SNP rs2981582 del gen *FGFR2* y el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* en 307 casos de CM *BRCA1/2* negativo y en 614 controles sanos.

En la muestra completa, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs1219648 del gen *FGFR2* y homocigoto para el alelo de riesgo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (CC/CC) se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR=2,30[IC95% 1,1 – 4,6]; p= 0,02). Este resultado sugiere que el

homocigoto de riesgo CC del gen *MAP3K1* por si solo aumenta el riesgo de CM. En relación al genotipo combinado homocigoto para el alelo de riesgo de la variante rs2981582 del gen *FGFR2* y homocigoto normal para la variante rs889312 del gen *MAP3K1* (TT/AA), este se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR= 2,05[IC95% 1,0 – 4,0];p= 0,04). Este resultado sugiere que el homocigoto de riesgo (TT) del gen *FGFR2* aumenta por si solo el riesgo para CM. Se observó asociación significativa para los genotipos combinados: heterocigotos CT del SNP rs2981582/ heterocigotos AC del SNP rs889312 y homocigotos TT del SNP rs2981582/ heterocigotos AC del SNP rs889312. Al analizar la interacción respecto del genotipo combinado doble homocigoto de riesgo para ambos *loci* de susceptibilidad (TT/CC) se observó un incremento del riesgo para CM (OR=4,83[IC95% 2,2 – 11,0]; p<0,01). Sin embargo, y considerando el modelo de interacción multiplicativa, el riesgo observado para el doble homocigoto de riesgo no se desvió más de lo esperado (OR observado= 4,83; OR esperado= 4,71). Por lo tanto, no se observó interacción multiplicativa.

En relación a los casos con historia familiar, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs2981582 del gen *FGFR2* y homocigoto de riesgo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (CC/CC) se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR=2,44 [IC95% 1,1 – 5,5]; p= 0,03). Este resultado sugiere que el homocigoto de riesgo CC del gen *MAP3K1* por si solo aumenta el riesgo para CM. De igual manera, el genotipo combinado homocigoto de riesgo para la variante rs2981582 del gen *FGFR2* y homocigoto normal para la variante rs889312 del gen *MAP3K1* (TT/AA) se asoció con el riesgo para CM (OR= 2,51 [IC95% 1,2 – 5,4]). Lo anterior sugiere que el homocigoto de riesgo TT del rs2981582 por si solo aumenta el riesgo para CM. Se observó asociación significativa de los genotipos combinados: heterocigotos CT del rs2981582 / homocigotos CC del SNP rs889312 y homocigotos TT del SNP rs2981582 / heterocigotos AC del SNP rs889312. Al analizar la interacción del doble homocigoto de riesgo para las variantes rs2981582 y rs889312 de los genes *FGFR2* y *MAP3K1*(TT/CC), se observó incremento del riesgo para CM ; sin embargo, no se observó interacción multiplicativa (OR observado= 5,00; OR esperado= 2,44 x 2,51= 6,12).

Tabla 10. Distribución de frecuencias de los genotipos combinados para el rs2981582 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* en controles sanos y en casos de CM *BRCA1/2* negativo y controles sanos.

Casos de CM en la muestra completa (n= 307)				
Genotipos combinados (FGFR2 rs2981582 – MAP3K1 rs889312)	Controles (%) n=614	Casos (%)	OR (IC 95%)	p
CC/AA	98(16%)	27(9%)	1,00(referencia)	-
CC/AC	99(17%)	38(12%)	1,37(0,8 – 2,4)	0,27
CC/CC	33(5%)	21(7%)	2,30(1,1 – 4,6)	0,02
CT/AA	119(19%)	51(17%)	1,55(0,9 – 2,7)	0,11
CT/AC	127(21%)	69(23%)	1,99(1,2 – 3,3)	0,01
CT/CC	36(6%)	28(9%)	2,82(1,5 – 5,4)	<0,01
TT/AA	39(6%)	22(7%)	2,05(1,0 – 4,0)	0,04
TT/AC	48(8%)	31(10%)	2,34(1,2 – 4,4)	0,01
TT/CC	15(2%)	20(6%)	4,83(2,2 – 11,0)	<0,01
Casos de CM con historia familiar de CM (n=198)				
CC/AA	98(16%)	17(9%)	1,00(referencia)	-
CC/AC	99(17%)	28(14%)	1,61(0,8 – 3,1)	0,16
CC/CC	33(5%)	14(7%)	2,44(1,1 -5,5)	0,03
CT/AA	119(19%)	33(17%)	1,60(0,8 – 3,0)	0,15
CT/AC	127(21%)	41(20%)	1,88(1,0 – 3,5)	0,05
CT/CC	36(6%)	16(8%)	2,56(1,2 – 5,6)	0,02
TT/AA	39(6%)	17(9%)	2,51(1,2 - 5,4)	0,02
TT/AC	48(8%)	19(9%)	2,28(1,9 – 4,8)	0,03
TT/CC	15(2%)	13(7%)	5,00(2,0 – 12,3)	<0,01
Casos de CM ≤ 50 años sin historia familiar de CM (n=109)				
CC/AA	98(16%)	10(9%)	1,00(referencia)	
CC/AC	99(17%)	10(9%)	0,98(0,4 – 2,5)	0,97
CC/CC	33(5%)	7(6%)	2,08(0,7 – 6,0)	0,17
CT/AA	119(19%)	18(17%)	1,48(0,6 – 3,3)	0,35
CT/AC	127(21%)	28(26%)	2,18(1,0 – 4,7)	0,05
CT/CC	36(6%)	12(11%)	3,27(1,3 – 8,2)	0,01
TT/AA	39(6%)	5(5%)	1,25(0,4 – 4,0)	0,70
TT/AC	48(8%)	12(11%)	2,45(1,0 – 6,1)	0,05
TT/CC	15(2%)	7(6%)	4,57(1,5 – 14,0)	0,01

OR: Odds ratio; **CM:** Cáncer de mama; **IC:** Intervalo de confianza

En relación a los casos sin historia familiar de CM y diagnóstico temprano, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs2981582 del gen *FGFR2* y homocigoto de riesgo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (CC/CC) no se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR=2,08 [IC95% 0,7 – 6,0]; p=0,17). Igualmente, el genotipo combinado homocigoto de riesgo para el SNP rs2981582 del gen *FGFR2* y el homocigoto normal para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1*, no presentó asociación significativa con el riesgo para CM (OR=1,25 [IC95% 0,4 – 4,0]; p=0,70). Se observó asociación significativa para los genotipos combinados: heterocigotos CT del SNP rs2981582 / homocigotos CC del SNP rs889312 y homocigotos TT del SNP rs2981582 / heterocigotos AC del rs889312. Sin embargo, la presencia de ambos genotipos de riesgo (GG/CC) para ambos *loci* de susceptibilidad incrementó aún más el riesgo (OR= 4,57 [IC95% 1,5 – 14,0]; p=0,01). Es decir, la presencia de ambas variantes de riesgo en condición homocigótica incrementa el riesgo para CM en 4,57 veces. El OR esperado para interacción multiplicativa es de 2,6 (2,08 x 1,25). Considerando que el OR observado (4,57) es mayor al esperado (2,6), se puede proponer que existe interacción multiplicativa entre ambas variantes en casos de CM sin historia familiar de CM y diagnóstico temprano.

5.3.3. Análisis de interacción entre la variante rs2420946 del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1*

La Tabla 11 muestra la distribución de los genotipos combinados para el SNP rs2420946 del gen *FGFR2* y el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* en 307 casos de CM *BRCA1/2* negativo y en 614 controles sanos.

En la muestra completa, el genotipo combinado homocigoto normal para la variante rs2420946 del gen *FGFR2* y homocigoto para el alelo de riesgo para la variante rs889312 (CC/CC) se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR= 2,19 [IC95% 1,1 – 4,4]). Este resultado sugiere que el homocigoto para el alelo de riesgo (CC) de la variante rs889312 por sí solo es capaz de aumentar el riesgo para CM. Respecto del genotipo combinado homocigoto de riesgo para la variante

rs2420946 del gen *FGFR2* y homocigoto normal para la variante rs889312 del gen *MAP3K1* (TT/AA) se observó asociación con el riesgo para CM (OR=2,11 [IC95% 1,1 – 4,1]). Lo último supone que el homocigoto de riesgo (TT) de la variante rs2420946 del gen *FGFR2* por sí solo es capaz de aumentar el riesgo. Se observó asociación significativa para los genotipos combinados: heterocigotos CT del SNP rs2420946 / heterocigotos AC del SNP rs889312; asimismo para los genotipos combinados: heterocigotos CT del SNP rs2420946 / homocigotos CC del SNP rs889312 y homocigotos TT del rs2420946 / heterocigotos AC del SNP rs889312. Al analizar la interacción respecto del genotipo combinado doble homocigoto de riesgo de ambos *loci* de susceptibilidad (TT/CC) se observó un incremento del riesgo para CM (OR=4,30[IC95% 1,9 – 9,5]). Sin embargo, no se observó interacción de tipo multiplicativa ya que el OR observado no fue mayor al OR esperado (OR esperado $2,19 \times 2,11 = 4,62$; OR observado= 4,30).

En relación a los casos con historia familiar de CM, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs2420946 del gen *FGFR2* y homocigoto de riesgo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (CC/CC) no se asoció significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR=2,21 [IC95% 1,0 – 5,0]; $p = 0,06$). El genotipo combinado homocigoto de riesgo para el SNP rs2420946 del gen *FGFR2* y el homocigoto normal para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (TT/AA) presentó asociación significativa con el riesgo para CM (OR=2,28 [IC95% 1,0 – 5,0]; $p = 0,04$). Lo anterior sugiere que el homocigoto de riesgo para la variante rs2420946 del gen *FGFR2* incrementa por sí solo el riesgo para CM. Se observó asociación significativa para los genotipos combinados: heterocigotos CT del SNP rs2420946 / homocigotos CC del SNP rs889312 y homocigotos TT del rs2420946 / heterocigotos AC del rs889312. Al analizar la interacción del doble homocigoto de riesgo para las variantes rs2420946 y rs889312 de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* (TT/CC), se observó incremento del riesgo para CM (OR= 3,87[IC95% 1,5 – 10,0]). No obstante, no se observó interacción multiplicativa (OR observado= 3,87; OR esperado= $2,21 \times 2,28 = 5,03$).

En relación a los casos sin historia familiar de CM y diagnóstico temprano, el genotipo combinado homocigoto normal para el SNP rs2420946 del gen *FGFR2* y homocigoto de riesgo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1* (TT/CC) no se asoció

Tabla 11. Distribución de frecuencias de los genotipos combinados para el rs2420946 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* en controles sanos y en casos de CM *BRCA1/2* negativo y controles sanos.

Casos de CM en la muestra completa (n= 307)				
Genotipos combinados (FGFR2 rs2420946 – MAP3K1 rs889312)	Controles (%) n=614	Casos (%)	OR (IC 95%)	p
CC/AA	95(16%)	27(9%)	1,00(referencia)	-
CC/AC	96(16%)	35(11%)	1,22(0,7 – 2,1)	0,49
CC/CC	31(5%)	20(7%)	2,19(1,1 – 4,4)	0,03
CT/AA	124(20%)	50(16%)	1,34(0,8 – 2,3)	0,29
CT/AC	129(21%)	69(23%)	1,82(1,1 – 3,0)	0,02
CT/CC	38(6%)	30(10%)	2,68(1,4 – 5,1)	<0,01
TT/AA	37(6%)	23(7%)	2,11(1,1 – 4,1)	0,03
TT/AC	49(8%)	34(11%)	2,35(1,3 – 4,3)	0,01
TT/CC	15(2%)	19(6%)	4,30(1,9 – 9,5)	<0,01
Casos de CM con historia familiar de CM (n=198)				
CC/AA	95(16%)	17(9%)	1,00(referencia)	-
CC/AC	96(16%)	25(13%)	1,36(0,7 – 2,6)	0,36
CC/CC	31(5%)	13(7%)	2,21(1,0 – 5,0)	0,06
CT/AA	124(20%)	34(17%)	1,40(0,7 – 2,7)	0,29
CT/AC	129(21%)	42(21%)	1,73(0,9 – 3,2)	0,08
CT/CC	38(6%)	19(9%)	2,64(1,2 – 5,6)	0,01
TT/AA	37(6%)	16(8%)	2,28(1,0 – 5,0)	0,04
TT/AC	49(8%)	21(11%)	2,26(1,1 – 4,6)	0,03
TT/CC	15(2%)	11(5%)	3,87(1,5 – 10,0)	<0,01
Casos de CM ≤ 50 años sin historia familiar de CM (n=109)				
CC/AA	95(16%)	10(9%)	1,00(referencia)	-
CC/AC	96(16%)	10(9%)	0,98(0,4 – 2,5)	0,96
CC/CC	31(5%)	7(6%)	2,14(0,7 – 6,1)	0,15
CT/AA	124(20%)	16(15%)	1,23(0,5 – 2,8)	0,63
CT/AC	129(21%)	27(25%)	2,00(0,9 – 4,3)	0,08
CT/CC	38(6%)	11(11%)	2,75(1,1 – 7,0)	0,03
TT/AA	37(6%)	7(6%)	1,80(0,6 – 5,1)	0,27
TT/AC	49(8%)	13(12%)	2,52(1,0 – 6,2)	0,04
TT/CC	15(2%)	8(7%)	5,10(1,7 – 15,0)	<0,01

OR: Odds ratio; CM: Cáncer de mama; IC: Intervalo de confianza

significativamente con el aumento del riesgo para CM (OR=2,14 [IC95% 0,7 – 6,1]; p= 0,15). Igualmente, el genotipo combinado homocigoto de riesgo para el SNP rs2420946 del gen *FGFR2* y el homocigoto normal para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1*, no presentó asociación significativa con el riesgo para CM (OR=1,80 [IC95% 0,6 – 5,1]; p= 0,27). Se observó asociación significativa para los genotipos combinados: heterocigotos CT del SNP rs2420946 / homocigotos CC del SNP rs889312 y homocigotos TT del SNP rs2420946 / heterocigotos AC del SNP rs889312. Sin embargo, la presencia de ambos genotipos de riesgo (TT/CC) de ambos *loci* de susceptibilidad incrementó aún más el riesgo (OR=5,10 [IC95% 1,7 - 15,0]; p<0,01). Es decir, la presencia de ambas variantes de riesgo en condición homocigótica incrementó el riesgo para CM en 5,10 veces. El OR esperado para interacción multiplicativa es 3,8 (2,14 x 1,80). Considerando que el OR observado (5,10) es mayor al esperado (3,8), se puede proponer que existe interacción multiplicativa entre ambas variantes en casos de CM sin historia familiar y diagnóstico temprano.

5.4. Análisis del poder estadístico aplicado al estudio

Se utilizó el programa Quanto versión 1.2 para el cálculo del poder estadístico del estudio caso-control. La Tabla 12 muestra el valor del poder estadístico ($1-\beta$) que se obtuvo luego de estimar el OR con el tamaño muestral de los casos de acuerdo a los subgrupos analizados y un total de 614 controles. Se observa que todos los valores de (β) son superiores a 0.8 que es el mínimo aceptado en los estudios de asociación. La excepción fue para la variante rs1219648 en los casos de CM con historia familiar. La Tabla 13 muestra el valor del poder estadístico que se obtuvo en el análisis de interacción luego de estimar el OR para los dobles homocigotos de riesgo con el tamaño muestral de los casos de acuerdo a los subgrupos analizados y 614 controles sanos. Se observa que todos los valores de (β) fueron superiores a 0.8. En conclusión, el tamaño muestral utilizado en el presente trabajo de tesis fue el adecuado para las estimaciones de riesgo.

Tabla 12. Cálculo del poder estadístico (1-β) alcanzado en la estimación del riesgo de los homocigotos de riesgo de cada variante analizada, de acuerdo a los subgrupos de casos.

Polimorfismo	Muestra analizada (Tamaño muestral)	OR obtenido	Poder estadístico (1-β)
rs1219648	Muestra completa (n=307)	1,83	0,98
	Casos de CM con HF (n= 198)	1,68	0,72
	Casos sin HF de CM y ≤50años (n=109)	2,15	0,97
rs2981582	Muestra completa(n= 307)	1,91	0,89
	Casos de CM con HF (n=198)	1,87	0,87
	Casos sin HF de CM y ≤50años (n=109)	2,00	0,93
rs2420946	Muestra completa (n=307)	2,03	0,94
	Casos de CM con HF(n=198)	1,91	0,90
	Casos sin HF de CM y ≤50años (n=109)	2,27	0,98
rs889312	Muestra completa (n=307)	2,10	0,93
	Casos de CM con HF(n=198)	1,95	0,87
	Casos sin HF de CM y ≤50años (n=109)	2,40	0,99

HF: Historia familiar; CM: cáncer de mama

Tabla 13. Cálculo del poder estadístico (1-β) alcanzado en la estimación del riesgo de los genotipos combinados dobles homocigotos de riesgo para las variantes analizadas, de acuerdo a los subgrupos de casos.

Genotipo combinado	Muestra analizada (Tamaño muestral)	OR obtenido	Poder estadístico (1-β)
<i>FGFR2</i> rs1219648	Muestra completa (n=307)	4,38	0,97
	Casos de CM con HF (n= 198)	3,72	0,84
<i>MAP3K1</i> rs889312	Casos sin HF de CM y ≤50años (n=109)	5,63	0,92
<i>FGFR2</i> rs2981582	Muestra completa(n= 307)	4,83	0,98
	Casos de CM con HF (n=198)	5,00	0,96
<i>MAP3K1</i> rs889312	Casos sin HF de CM y ≤50años (n=109)	4,57	0,82
<i>FGFR2</i> rs2420946	Muestra completa (n=307)	4,30	0,97
	Casos de CM con HF(n=198)	3,87	0,86
<i>MAP3K1</i> rs889312	Casos sin HF de CM y ≤50años (n=109)	5,10	0,88

HF:Historia familiar; **CM:** cáncer de mama

6. DISCUSION

En la actualidad existen gran cantidad de trabajos cuya finalidad ha sido la identificación de los genes que dan cuenta del porcentaje remanente de casos de CM negativo para mutaciones en los genes *BRCA1/2*, casos que han sido asociados con variantes comunes en otros genes de susceptibilidad (Easton *et al.*, 2007; Pharoah., *et al* 2004; Turnbull y Rahman., 2008). Gracias a los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) y al manejo de mejores herramientas estadísticas, se ha logrado conocer parte de la predisposición genética subyacente en los casos de CM familiares y esporádicos *BRCA1/2* negativo. Entre las variantes descritas por los primeros GWAS, los SNPs rs2981582 del gen *FGFR2* y el rs889312 del gen *MAP3K1*, presentaron importante asociación con el riesgo para CM (Easton *et al.*, 2007). En otro GWAS, los SNP rs1219648 y rs2420946 del gen *FGFR2*, fueron vinculados con el riesgo para CM esporádico (Hunter *et al.*, 2007). Estudios realizados en individuos de diversas etnias y áreas geográficas han logrado replicar los resultados de los primeros GWAS en relación al riesgo de CM. El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar la asociación de las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* con el aumento del riesgo para CM, y la interacción entre estos genes mediante un estudio caso-control. No se han publicado otros estudios que analicen la asociación de estas variantes con riesgo de CM en otras poblaciones latinoamericanas.

6.1. Asociación con CM de las variantes rs2981582, rs1219648 y rs2420946 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1*.

Los resultados de la presente tesis permiten proponer que las variantes rs2981582, rs1219648 y rs2420946 del gen *FGFR2* se asocian con CM en población chilena. En particular, los homocigotos para el alelo de riesgo de estas tres variantes se asociaron significativamente con riesgo de desarrollar CM. Otros trabajos en diferentes poblaciones han descrito la asociación con el CM de las variantes del gen *FGFR2* analizadas en este trabajo de tesis. Zhang *et al.*,(2010) en un meta análisis que abarcó nueve estudios caso-control, incluyendo un total de 14.628 casos y 16.319 controles de Asia, Europa y judíos-asquenazi, reportaron asociación de las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 del

gen *FGFR2* con el CM. Los autores concluyeron que, al igual que los primeros GWAS en CM, las variantes del gen *FGFR2* son de susceptibilidad para el CM. Este trabajo de tesis está de acuerdo con los resultados obtenidos en el trabajo de Zhang *et al.*,(2010). Los SNP rs2981582, rs1219648 y rs2420946, se encuentran en un bloque de desequilibrio de ligamiento de 25 kb en el intrón 2 del gen *FGFR2* y presentan valores de $r^2 > 0,80$ en población de origen europeo (Easton *et al.*, 2007). Por lo tanto, resultaba esperable que los tres SNPs presentaran una asociación similar con el aumento del riesgo para CM. El desequilibrio de ligamiento se define como la asociación alélica entre variantes del genoma, ya sea por su cercanía cromosómica u otro tipo de asociación (Santos JL, 2010). Cabe señalar que la determinación del desequilibrio de ligamiento en población chilena escapó a los objetivos de este trabajo de tesis; se deben realizar estudios que permitan establecer el patrón de desequilibrio de ligamiento con el fin de conocer la extensión del mismo en esta población.

El mecanismo que subyace en la asociación de las variantes del gen *FGFR2* con CM, ha sido analizado y es objeto de estudio recientemente. Se postula que las variantes de secuencia en el intrón 2, entre ellas las variantes rs1219648, rs2420946 y rs2981582, están muy próximas a los sitios de unión para factores de transcripción como Oct-1/Runx2 y a sitios putativos de unión del receptor de estrógenos (RE) (Easton *et al.*, 2007), lo cual condicionaría la sobreexpresión del gen *FGFR2* en el CM. En relación a lo anterior, Meyer *et al.*, (2008) realizaron un estudio funcional en el que analizaron variantes del gen *FGFR2*, entre ellas el SNP rs2981582 en células de tumores de mama. Los resultados del estudio demostraron que la presencia del homocigoto de riesgo TT para la variante rs2981582 del gen *FGFR2* en las muestras tumorales aumenta significativamente la expresión del gen *FGFR2* en comparación con el heterocigoto CT y el homocigoto normal CC. Se ha estimado que el 5% de los tumores de mama presentan sobreexpresión de *FGFR2* (Penault-Llorca *et al.*, 1995). Koziczak *et al.*, (2004) observaron en líneas celulares de carcinoma mamario, que las moléculas reguladoras que bloquean la actividad de *FGFR2*, producen el arresto de las células en la fase G1 del ciclo celular. Estos antecedentes permiten proponer que los alelos de riesgo de los SNPs analizados del gen *FGFR2* aumentan la expresión de este receptor de factor de crecimiento, lo cual se relacionaría con la carcinogénesis mamaria.

En relación al SNP rs889312 del gen *MAP3K1* se observó para la muestra completa que sólo los homocigotos de riesgo CC se asociaron significativamente con aumento del riesgo para CM, no así los heterocigotos AC. Recientemente Lu *et al.*, (2010) publicaron un meta-análisis de la variante rs889312 que incluyó resultados de siete estudios con un total de 26.015 casos de CM y 33.962 controles de distinto origen étnico y áreas geográficas. Este meta-análisis concluyó que los homocigotos CC presentan una mayor asociación con CM (OR= 1,22[IC95% 1,15 – 1,29]) en comparación a los heterocigotos AC (OR=1,07[IC95% 1,04 – 1,11]) y sugiere que es una variante de baja penetrancia para CM.

En relación al efecto biológico de la variante rs889312 en la carcinogénesis mamaria, esta variante se encuentra en un bloque de desequilibrio de ligamiento de 280 kb en donde se encuentra el gen *MAP3K1*. Por lo tanto, se podría sugerir que la asociación con el riesgo para CM está relacionada con la vía de señalización en donde participa la proteína MAP3K. Sivaraman *et al.*, (1997) presentaron el primer hallazgo que demuestra la activación de esta vía en tejido tumoral de CM, encontrando una mayor actividad de la misma en cáncer invasivo, comparado con tejido de mama normal. Estos hallazgos fueron confirmados por estudios posteriores (Salh *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2000). Hasta donde conocemos, no existen estudios funcionales que aporten antecedentes que permitan establecer el efecto funcional de el SNP rs889312 sobre el gen *MAP3K1*, por lo cual se requiere de estudios que aclaren el efecto biológico que subyace la asociación propuesta con CM.

Para este trabajo de tesis se incorporaron casos con historia familiar de CM (Tabla 14). Dado que la literatura indica que hay una mayor probabilidad de identificar genes de susceptibilidad en casos con historia familiar de CM, fue imperativo realizar una estratificación de acuerdo a los antecedentes familiares de CM. Lo anterior con el propósito de observar la exposición de los diferentes grupos al factor de riesgo genético e identificar el grupo de mayor riesgo para CM. De esta estratificación se observó que los casos sin historia familiar de CM y diagnosticados a edad ≤ 50 años presentaron las mayores asociaciones con el aumento del riesgo para CM, para el caso de los SNPs rs1219648 y rs2420946 (Tablas 5 y 7) del gen *FGFR2*, en comparación con los casos de CM con historia familiar. Sin embargo, para el SNP rs2981582 las estimaciones de riesgo son similares en ambos subgrupos (Tabla 6). A la fecha, son muy pocos los estudios que han descrito el riesgo para CM

estratificando la muestra por historia familiar. Como se mencionó previamente, Easton *et al.*, (2007) en un GWAS, analizaron el patrón de riesgo en los casos con historia familiar para la variante rs2981582 del gen *FGFR2*. Los autores indicaron que este SNP es marginalmente más común en los casos con historia familiar de CM en comparación con los casos de CM sin historia familiar (OR= 1,07 [IC95% 1,02 – 1,12]; p=0,02). En el presente trabajo, el alelo de riesgo para la variante rs2981582 presentó prácticamente la misma frecuencia en casos con historia familiar de CM (0,47) al igual que los casos sin historia familiar y diagnóstico temprano; por lo cual este trabajo de tesis está de acuerdo a las observaciones de Easton *et al.*, (2007). Otros trabajos también han analizado la variante rs2981582 en casos de CM con historia familiar. Latif *et al.*, (2009) en un estudio que incluyó casos británicos, observó asociación con el riesgo para CM familiar de los homocigotos TT del SNP rs2981582 (OR= 1,66 [IC95% 1,13 – 2,43]). Gorodnova *et al.*, (2010) en un estudio caso-control de mujeres con ancestros europeos, al enriquecer la muestra con casos familiares de CM observó mayor frecuencia de los homocigotos TT en los casos sin embargo, no alcanzó significancia estadística (OR= 1,17[IC95% 0,9 – 3,4]) debido posiblemente al reducido tamaño muestral (n= 140). Este trabajo de tesis también reportó asociación de la variante rs2981582 con el aumento del riesgo para CM en los casos sin historia familiar. Otros estudios han analizado el SNP rs2981582 en casos de CM sin historia familiar, o no seleccionados por historia familiar (Barnholtz *et al.*, 2010, Kawase *et al.*, 2009 y Boyarskikh *et al.*, 2009) (Tabla 2). A pesar de que la asociación fue distinta en las poblaciones bajo estudio, los tres autores concluyeron que la variante rs2981582 del gen *FGFR2* se asocia con el riesgo para CM en casos esporádicos de CM. Este trabajo de tesis está de acuerdo a las observaciones de los estudios previos, por lo tanto se podría sugerir que el alelo de riesgo T de la variante

rs2981582 del gen *FGFR2* es un alelo de susceptibilidad para CM tanto en los casos con historia familiar como en los casos sin historia familiar y diagnóstico temprano.

En relación a las otras dos variantes del gen *FGFR2* (rs1219648 y rs2420946), este trabajo de tesis reportó mayor asociación con el riesgo para CM de los SNPs rs1219648 y rs2420946 en los casos de CM sin historia familiar y edad de diagnóstico temprano (≤ 50 años) (OR=2,15 [IC95% 1,1 – 4,1] y OR=2,27 [IC95% 1,2 – 4,2], respectivamente) en comparación con los casos de CM con historia familiar (OR= 1,68 [IC95% 1,0 – 2,7] y OR=

1,91 [IC95% 1,2 – 3,1], respectivamente). Hasta donde conocemos, estas variantes han sido estudiadas sólo en casos de CM esporádicos. La Tabla 2 muestra los estudios realizados a la fecha en donde se describe la asociación de las variantes rs1219648 y rs2420946 en casos de CM esporádico.

Respecto a la variante rs889312 del gen *MAP3K1*, al evaluar el riesgo en los casos de CM por estratificación de la historia familiar se observó que el riesgo fue mayor en los homocigotos de riesgo CC en los casos de CM sin historia familiar (OR= 2,40 [IC95% 1,3 -4,4]) en comparación con los homocigotos de riesgo CC en los casos de CM con historia familiar (OR=1,95 [IC95% 1,2 – 3,1]). Existen estudios que han observado aumento del riesgo en casos de CM con historia familiar. Latif *et al.*, (2009) en un trabajo que incluyó casos con CM familiar, informó que las homocigotas CC presentaron asociación con el riesgo para CM (OR= 1,89[IC95% 1,12 – 3,21]) a diferencia de las heterocigotas AC en donde la asociación no alcanzó significancia estadística (OR= 1,14[IC95% 0,87 - 1,48]). Gorodnova *et al.*, (2010) en un estudio descrito con anterioridad en este trabajo de tesis, no observó asociación significativa con el riesgo para CM en las homocigotas CC debido posiblemente al tamaño muestral muy bajo (n=140) (OR= 1,60 [IC95% 0,68 – 3,64]). García-Closas *et al.*, (2008) analizaron esta variante en una muestra que incluyó 23.039 casos (con historia familiar y esporádicos) y 26.928 controles procedentes de Europa, Norteamérica, Asia y Australia. Los autores observaron que los homocigotos CC presentaron aumento del riesgo de desarrollar CM (OR=1,24[IC95% 1,16 – 1,33]). Los resultados observados en mujeres chilenas con CM familiar están de acuerdo a los estudios descritos anteriormente, obteniéndose OR superiores a los ya descritos en estos estudios. Hasta donde conocemos, no existen otros trabajos que analicen si el riesgo que confiere el alelo de riesgo del SNP rs889312 del gen *MAP3K1* se relaciona con los antecedentes familiares de CM. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la condición homocigótica para el alelo de riesgo C de la variante rs889312 del gen *MAP3K1*, aumenta más el riesgo de desarrollar CM en los casos de CM sin historia familiar en comparación a los casos de CM con historia familiar.

La literatura ha planteado supuestos sobre el origen genético de las enfermedades multifactoriales como el CM. Entre estos supuestos y uno de los más difundidos en la literatura se refiere a la hipótesis "enfermedad común- alelos comunes" denominada CDCV (del

inglés *common disease common variants*) (Chakravarty, 1999; Yang *et al.*, 2005; Frayling *et al.*, 2007). Según esta hipótesis, las enfermedades multifactoriales son causadas por variantes de genes que se encuentran comúnmente en la población con una frecuencia superior al 5% (Stratton y Rahman, 2008), a diferencia de las enfermedades mendelianas que presentan fuerte agregación familiar y son causadas por alelos de alta penetrancia de origen monogénico. Los alelos de riesgo de los cuatro SNPs analizados en esta tesis son de baja penetrancia ya que confieren riesgos cercanos a 2, y presentan una frecuencia alélica entre 0,35 – 0,40 en controles. Esto podría explicar que se haya observado mayor riesgo en el grupo de casos de CM sin historia familiar en comparación al grupo con historia familiar de CM.

Diversos estudios han observado que el riesgo que confieren las variantes en análisis de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* varía de acuerdo al origen étnico de la población bajo estudio. Los estudios que analizan el riesgo en etnias específicas son importantes dado que las frecuencias alélicas de las variantes pueden variar entre las distintas poblaciones. Respecto de lo anterior, Zhang *et al.*, (2010), publicaron un metanálisis que incluyó 14.628 casos y 16.319 controles de Asia, Europa y judíos-asquenazi. Al estratificar la muestra por origen étnico, observaron para las variantes rs1219648 y rs2420946 del gen *FGFR2*, que los individuos de origen caucásico presentaron las mayores asociaciones con el riesgo para CM, en comparación con los de origen asiático. Barnholtz *et al.*, (2010) al estratificar por etnia observaron la mayor asociación del alelo de riesgo de las variantes rs1219648, rs2981582 y rs2420946 en individuos caucásicos (OR alélico =1,30 [IC95% 1,15 – 1,46], OR= 1,29 [IC95% 1,14 – 1,46] y OR= 1,29 [IC95% 1,14 – 1,46], respectivamente) comparado con individuos de origen afroamericano (OR alélico =1,19 [IC95% 1,02 - 1,39], OR=1,19 [IC95% 1,02 – 1,39] y OR=1,17 [IC95% 1,00 – 1,37]). Estos autores observaron el mismo efecto al analizar el SNP rs889312 del gen *MAP3K*: mayor asociación en individuos caucásicos (OR alélico =1,18 [IC95% 1,03- 1,34]), comparado con individuos de origen afroamericano (OR alélico =0,95 [IC95% 0,80-1,13]). Estos autores sugirieron que el riesgo que confieren los alelos de menor frecuencia de *FGFR2* y *MAP3K1* es heterogéneo de acuerdo con el origen étnico de la población analizada. Slattery *et al.*, (2011) publicaron un estudio caso-control en donde incluyeron mujeres con CM esporádico tanto de origen hispanico como no hispanico procedentes del Suroeste de Estados Unidos. Al eva-

luar la asociación de las homocigotas para el alelo de riesgo de las variantes rs1219648 y rs2981582 de *FGFR2* y riesgo para CM entre estos grupos, se observó que las mujeres hispánicas presentaron mayor riesgo a CM (OR= 1,53 [IC95% 1,10 - 2,12] y OR= 1,44 [IC95% 1,03 – 2,00], respectivamente) comparadas con las mujeres de origen no hispánico (OR= 1,26 [IC95% 1,00 – 1,59] y OR= 1,33 [IC95% 1,05 – 1,68], respectivamente). Los autores plantearon que sus resultados pueden ser explicados por la composición étnica de cada población. Probablemente las mujeres hispánicas fueron en su mayoría mexicanas residentes en Estados Unidos, en las que es conocido el importante componente genético amerindio-español. Tomando en consideración los antecedentes genéticos, estas observaciones podrían explicar los resultados observados en mujeres chilenas quienes también presentan un componente genético amerindio-español importante. La población chilena es el resultado de la mezcla entre población amerindia y europea, en su mayoría españoles con un grado de mezcla que se ha estimado en un 40% amerindio y 60% europeo (Cruz-Coke, 1976; Palomino, 1976; Valenzuela *et al.*, 1987).

6.2. Interacción entre los genes *FGFR2* y *MAP3K1*

El gen *FGFR2* es un receptor de factor de crecimiento y participa en la vía de transducción de señales dentro de la cual se encuentra la vía de las MAPK quinazas. La vía de las MAPK quinazas se inicia con la activación del gen *MAP3K1* y finaliza con la expresión de genes importantes para la angiogénesis, proliferación y migración celular (Figura.1). Debido a la acción coordinada de ambos genes en una misma vía de transducción de señales, es posible que exista interacción entre ambos genes. En el análisis de genotipos combinados se observó que el riesgo que confiere la condición doble homocigoto de riesgo es superior al efecto que confiere el ser homocigoto de riesgo para sólo uno de los dos SNPs, alcanzando valores de OR de 4,3. El fenómeno de interacción multiplicativa se observó al estratificar la muestra según antecedentes de CM en la familia. En mujeres sin historia familiar y diagnóstico ≤ 50 años, el OR observado fue superior al OR correspondiente a la multiplicación del efecto individual de cada gen. De acuerdo a lo planteado por Brennan, (2002), este hallazgo sugiere que un factor es dependiente del otro para desarrollar su potencial carcinogénico. De hecho, el ser homocigoto de riesgo sólo para el SNP rs889312 del gen *MAP3K1*, produce aumento del riesgo. Sin embargo, el homocigoto de

riesgo sólo para cualquiera de las variantes del gen *FGFR2* analizadas no aumenta significativamente el riesgo para CM. Es decir, los SNPs del gen *FGFR2* actuarían potenciando el efecto del SNP rs889312 del gen *MAP3K1*. Actualmente, son muy pocos los ejemplos de interacción gen-gen en humanos (Cordel, 2009). Existen estudios donde se ha analizado la interacción entre genes de alta y moderada penetrancia para CM (*CHEK2*, *ATM*, *BRCA1* y *BRCA2*), considerando que estos genes participan en una misma vía de señalización. Turnbull *et al.*, (2011) realizaron un estudio en el cual analizaron interacción entre estos genes. Los autores concluyeron que el riesgo como resultado de la interacción fue menor que el producto multiplicativo de los riesgos individuales y que refleja la relación funcional de las proteínas involucradas en la vía de señalización. La interpretación biológica que proponen los autores es que la pérdida de función de las proteínas que actúan río arriba de *BRCA1* y *BRCA2* en los mecanismos de reparación del DNA: *ATM* y *CHEK2*, no confieren un riesgo adicional en la pérdida de función de *BRCA1* y *BRCA2*.

En la literatura existe sólo un estudio publicado a la fecha en el cual se analiza interacción entre los genes *FGFR2* y *MAP3K1* y riesgo para CM. Rebbeck *et al.*, (2009) han mostrado la acción combinada de algunos *loci* de susceptibilidad para riesgo de CM en individuos de distinto origen étnico. Los autores analizaron interacción entre las variantes: rs2981582 del gen *FGFR2* y la variante rs889312 del gen *MAP3K1* (*p value* para la interacción= 0.022) en mujeres europeo-americanas y afroamericanas. Observaron interacción entre las variantes de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* específicamente en las mujeres de origen afroamericano homocigotas CC o heterocigotas AC para la variante rs889312 y homocigotas CC para el SNP rs2981582 del gen *FGFR2* 1 (OR= 3.84 [IC95% 1.83–8.04]), efecto que no se observó en el grupo de mujeres europeo-americanas. Este hallazgo apoya la hipótesis de que ambos genes están involucrados en forma conjunta en la susceptibilidad al CM; sin embargo, se necesitan de otros estudios para confirmar la interacción propuesta entre ambos genes.

De los resultados obtenidos se destaca la magnitud del riesgo observado para el doble homocigoto de riesgo, en particular en los casos de CM con edad de diagnóstico ≤ 50 años sin historia familiar de CM, los que alcanzaron un valor de OR de 5. Considerando que el 2% de la población posee el genotipo compuesto doble homocigoto de riesgo, el riesgo atribuible poblacional es de 7,5; es decir, se estima que el 7,5% de los casos serían

explicados por este genotipo compuesto. Esto es importante desde el punto de vista de la estimación del riesgo que tiene una mujer de desarrollar CM; por lo tanto, se propone que la genotipificación de los SNPs analizados de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* podría ser una herramienta importante para identificar mujeres con riesgo de desarrollar la enfermedad.

7. Conclusiones

- Las variantes de baja penetrancia de los genes *FGFR2* y *MAP3K1*, se asociaron con aumento del riesgo para CM en mujeres chilenas *BRCA 1/2* negativo. Estos resultados son una importante contribución a la literatura sobre la susceptibilidad genética para el CM en esta población; lo que refuerza la hipótesis de que estos *loci* juegan un rol importante en el desarrollo del CM, como otros estudios han señalado.
- Las variantes analizadas en este trabajo de tesis presentaron frecuencias alélicas mayores al 5%, por lo tanto son variantes comunes en población chilena que confieren bajo riesgo dado los valores de OR observados. Lo anterior guarda relación con el modelo poligénico planteado para las enfermedades de origen multifactorial.
- En el subgrupo de mujeres con CM sin historia familiar y diagnóstico temprano (≤ 50 años), la condición homocigótica para las variantes de riesgo de los genes *FGFR2* y *MAP3K1* aumenta el riesgo para CM, en comparación con el subgrupo de casos con CM con historia familiar.
- El genotipo combinado doble homocigoto de riesgo para la variante del rs1219648 del gen *FGFR2* y rs889312 del gen *MAP3K1* se asoció con aumento del riesgo para CM; por lo tanto es posible que la variabilidad genética en la vía de señalización en donde participan ambos genes contribuya al desarrollo de la carcinógenesis. Esta asociación fue mayor en las mujeres sin historia de CM y diagnóstico temprano.
- Se sugiere interacción entre ambos genes. Esta interacción puede ser explicada por la relación biológica entre las proteínas codificadas por estos genes de susceptibilidad para CM.

8. ANEXOS
Encuesta casos



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. _____				

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 em-										
¿Cuántos meses tenía el embarazo?										
Si su embarazo llegó a término fue										
Nacimiento único										
Nacimiento múltiple										
Mortinato										
Aborto										
Embarazo tubario o ectópico										
Aborto terapéutico										
Tuvo DIUC durante su embarazo (S o N)										

Para los nacidos vivos responda lo siguiente										
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 si 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 pregunta 21

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?

Nom-
bre: _____

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 sí, ¿Qué tipo de trabajo?

c) Indique las fechas:

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

e) Si es sí, explique:

26. Exposición a químicos

a) ¿Se ha expuesto a cancerígenos o a tóxicos químicos? Si
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

Descripción de los de los casos de acuerdo a los criterios de selección: antecedentes familiares de CM y edad de diagnóstico

Tabla 14

Distribución de las familias según criterios de selección

Criterios de Inclusión	Nº de Familias	Frecuencia(%)
Tres o más afectados de CM y/o ovario	79	26%
Dos o más afectados de CM y/o CO	119	39%
Casos de CM sin antecedentes familiares y edad de diagnóstico \leq 50 años	109	35%
Total	307	100

CM: cáncer de mama; **CO:** cáncer de ovario

Tabla 15

Distribución por edad de diagnóstico de los casos de CM familiar y diagnóstico temprano *BRCA1/2* negativo en la muestra completa

Edad de diagnóstico (años)	Nº de casos (%) n= 307
20 - 30	50 (16%)
31 - 40	112 (37%)
41 - 50	88 (29%)
51 - 60	31(10%)
61 - 70	17(5%)
>71	9(3%)

Tabla 16

Distribución por edad de diagnóstico de los casos con historia familiar de CM *BRCA1/2* negativo

Edad de diagnóstico (años)	Nº de casos n= 198
20 - 30	26(13%)
31 - 40	50(25%)
41 - 50	66(33%)
51 - 60	30(15%)
61 - 70	17(9.0%)
>71	9(5%)

Tabla 17

Distribución por edad de diagnóstico de los casos sin historia familiar de CM y diagnóstico temprano (≤ 50 años) *BRCA1/2* negativo

Edad de diagnóstico (años)	Nº de casos n= 109
23 - 30	24(22%)
31 - 40	62(57%)
41 - 50	22(20%)
51	1(1%)

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

Acta y consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE CHILE

"Estudio de Cáncer de Mama Hereditario en Familias Chilenas"

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Investigadores

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

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adnane J.;Dionne C.; Crumley G.; Jaye M., Schlessinger J.; Jeanteur P.; Birnbaum D.; Theillet C. “BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers”. *Oncogene*. 6:659–663,1990.
- Antoniou A.; Pharoah P.; Narod S.; Risch H.; Eyfjord J.; Hooper J.; Loman N.; Olsson H.; *et al.* “Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with *BRCA1* or *BRCA2* Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies”. *Am J Hum Genet*. 72: 1117–1130b, 2001.
- Bansal G.;Cox H.; Marsh S.; Gomm J.; Yiangou C .; Luqmani Y.; Coombes R.; Johnston C. “Expression of keratinocyte growth factor and its receptor in human breast cancer”. *British Journal of Cancer*. 75:1567-1574, 1997.
- Barnholz-Sloan J.; Shetty P.; Guan X.; Nyante S.; Luo J.; Brennan D.; Millikan R. “*FGFR2* and other loci identified in genome-wide association studies are associated with breast cancer in African-American and younger women”. *Carcinogenesis*. 31:417–1423, 2010.
- Berthois Y.; Katzenellenbogen J.; Katzenellenbogen B. “Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:2496–500,1986.
- Botto L. y Khoury M. “Commentary: Facing the Challenge of Gene-Environment Interaction: The Two-by-Four Table and Beyond”. *American Journal of Epidemiology*. 153:1016-1020, 2001.
- Brenna P. “Gene – enviroment interactions and aetiology of cáncer: what does it mean and how can we measure it?”. *Carcinogenesis*. 23: 381 – 387, 2002.
- Boyarskikh U.; Zarubina N.; Biltueva J.; Sinkina T.; Voronina E.; Lazarev A.; Petrova V.; Aulchenko Y.; Filipenko M. “Association of *FGFR2* gene polymorphisms with the risk of breast cancer in population of West Siberia”. *Eur J Hum Genet*. 17:1688–1691, 2009.
- Callahan R.; Smith G. “MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways” .*Oncogene*.19:992–1001, 2000.

- Hall JM, Lee MK, Morrow J, Newman B, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250:1684-1689,1990.
- Chakravarty A. "Population genetics making sense out of sequence". *Nat Genet.* 21: 56 – 60, 1999.
- Chomczynski P.; Sacchi N. "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on". *Nat Protoc.*1:581–585, 2006.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. "Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease". *Lancet.* 358:1389-99, 2001
- Cordell H. "Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans". *Human Molecular Genetics.*11: 2463–2468, 2002.
- Cordell H. "Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases". *Nat Rev Genet.* 10: 392 – 404, 2009.
- Cox A.; Dunning A.; Garcia-Closas M.; Balasubramanian S.; Reed MW.; Poo-ley K.; Scollen S.; *et al.* "A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk". *Nat Genet.* 39:352-8, 2007.
- Cruz-Coke R. "Origen y evolución étnica de la población Chilena". *Rev Med Chile.*101: 365–368,1976.
- Cultek. "PCR en Tiempo Real. Extraído el 11 de Mayo, 2009 de: www.cultek/aplicaciones", 2009.
- Curado M.; Edwards B.; Shin H.; Storm H.; Ferlay J.; Heanue M.; *et al.* Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC Scientific Publications.9: 160, 2007
- Departamento de Estadísticas e Información en Salud (2009). Mortalidad en mujeres, Chile, 2006. Ministerio de Salud de Chile. http://deis.minsal.cl/deis/salidas06/causas06.asp?temp=TODAS_EDADES_MUJ.htm

- Dickson R.; Lippman M. "Growth factors in breast cancer". *Endocr Re.*, 16:559–589, 1995.
- Diez O.; Osorio A.; Duran M.; Martinez-Ferrandis J.; de la Hoya M.; Salazar R.; Vega A.; Campos B.; Rodriguez-Lopez R.; Velasco E *et al.* "Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects". *Hum Mutat.* 22:301–312, 2003.
- Easton D. "How many more breast cancer predisposition genes are there?". *Breast Cancer Res.* 1: 14 – 17, 1999.
- Easton D. "Familial risks of breast cancer". *Breast Cancer Research* 4 :179-181, 2002.
- Easton D.; Pooley K.; Dunning A.; Pharoah P.; Thompson D.; Ballinger D.; Staruewing J.; *et al* . "Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci". *Nature.* 447:1087-93, 2007.
- Ellisen L.; Haber D. "Hereditary breast cancer". *Annual Review of Medicine.* 49:425-436,1998.
- Frayling T.; Timpson N; Weedon M.; et al. "A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity" .*Science.* 316: 889 – 894, 2007.
- Garcia-Closas M.; Chanock S. "Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor (ER) status". *Clin Cancer Res.*14:8000-8009, 2008.
- García-Closas M.; Per H.; Nevanlinna H.; Pooley K.; Morrison J.; Richesson D.; *et al.* "Heterogeneity of Breast Cancer Associations with Five Susceptibility Loci by Clinical and Pathological Characteristics". *Plos Genetics.* 4:1-10, 2008.
- Gonzalez-Hormazábal P.; R-Enriquez S.; Gaete D.; Reyes J.; Peralta O.; Waugh E.; Gómez F.; Margarita S.; Bravo T.; Blanco R.; Diez O.; Jara L. "Spectrum of *BRCA1/2* point mutations and genomic rearrangements in high-risk breast/ovarian cancer Chilean families". *Breast Cancer Res Treat.* 126(3): 705 – 716, 2010.
- Gorodnova T; Kuligina E.; Yanus G.; Katanugina A.; Abysheva S.; Togo A.; Imyanitov E. "Distribution of *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1*, *LSP1*, and 8q24 alleles in genetically enriched breast cancer patients versus elderly tumor-free women". *Cancer Genetics and Cytogenetics* .199: 69-72, 2010.

- Gudmundsdottir K.; Ashworth A. “The roles of *BRCA1* and *BRCA2* and associated proteins in the maintenance of genomic stability”. *Oncogene*. 25: 5864–5874, 2006.
- Hunter D.; Kraft P.; Jacobs K.; Cox D.; Yeager M.; Hankinson S.; *et al.* “A genome-wide association study identifies alleles in *FGFR2* associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer”. *Nat. Genet.* 39: 870–874, 2007.
- Jara L.; Ampuero S.; Santibáñez E.; Seccia L.; Rodríguez J.; Bustamante M.; Martínez V.; Catenaccio A.; Lay-Son G.; Blanco R.; Reyes J . “*BRCA1* and *BRCA2* mutations in a South American population”. *Cancer Genet Cytogenet.* 166:36–45, 2006.
- Jeng M.; Yue W.; Eischeid A.; Wang J.; Santen RJ. “Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long term estrogen deprived human breast cancer cells”. *Breast Cancer Res. Treatment.* 62: 167–175, 2000.
- Jia C.; Cai Y.; Ma Y.; Fu D. “Quantitative assessment of the effect of *FGFR2* gene polymorphism on the risk of breast cancer”. *Breast Cancer Res Treat.* 124:521-8. Doi: 10.1007/s10549-010-0872-5, 2010.
- Katoh M. “Cancer genomics and genetics of *FGFR2*”. *International Journal of oncology.* 33: 233-237, 2008.
- Kawase T.; Matsuo K.; Suzuki T.; Hiraki A.; Watanabe M.; Iwata H.; Tanaka H.; Tajima K . “*FGFR2* intronic polymorphisms interact with reproductive risk factors of breast cancer: results of a case control study in Japan”. *Int J Cancer.*125:1946–1952, 2009.
- Kim-Schulze S.; Lowe W.; Schnaper W and Jr. “Estrogen stimulates delayed mitogen-activated protein kinase activity in human endothelial cells via an autocrine loop that involves basic fibroblast growth”. *Circulation.* 98: 413–421, 1998.
- Kliewer E.; Smith K. “Breast cancer mortality among immigrants in Australia and Canada”. *J Natl Cancer Inst.* 87:1154–61, 1995.
- Koziczak M.; Holbro T.; Hynes NE. “Blocking of *FGFR* signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins”. *Oncogene.* 23: 3501–3508, 2004.
- Latif A.; Hadfield K.; Roberts S.; Shenton A.; Lalloo F.; Black GC.; Howell A.; Evans D.; Newman W. “Breast cancer susceptibility variants alter risks in familial disease”. *J Med Genet.* 47:126-131, 2010.

- Liang J.; Chen P.; Hu Z.; Zhou X.; Chen L.; Li M.; Wang Y.; Tang J.; Wang H.; Shen H. “Genetic variants in fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) contribute to susceptibility of breast cancer in Chinese women. *Carcinogenesis*. 29: 2341–2346, 2008.
- Lichtenstein P.; Holm N.; Verkasalo P.; Iliadou A.; Kaprio J.; Koskenvuo M.; Pukkala E.; Skytthe A.; Hemminki K.; “Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland”. *N Engl J Med*. **343**: 78-85, 2000.
- Lobenhofer E.; Huper G.; Iglehart J.; Marks J. “Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis”. *Cell Growth Differ*.11: 99–110, 2000.
- Lu P; Yang J.; Li C.; Wei M.; Shen W.; Shi L.; Jiang Z.; Zhou N.; Tao G. ”Association between mitogen-activated protein kinase kinase 1 rs889312 polymorphism and breast cancer risk: evidence from 59,977 subjects”. *Breast Cancer Res Treat*. 126 (3): 663 - 670, 2010.
- McClellan J.; Susser E.; King M. “Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *Br j psychiatry*. 190:194-99, 2007.
- Mcinerney N.; Colleran G.; Rowan A.; Walther A.; Barclay E.; Spain S.; Jones A.; Tuohy S.; Curran C.; Miller N.; Kerin M.; Tomlinson I.; Sawyer E. “Low penetrance breast cancer predisposition SNPs are site specific”. *Breast Cancer Res Treat*. 117:151–159, 2009.
- McPherson K.; Steel C.; Dixon J. “ABC of breast disease”. *Breast cancer-epidemiology, risk factors and genetics*. *BMJ*. 321:624-628, 2000.
- Meyer K.; Maia A.; O’Reilly M.; Teschendorff A.; Chin S.; Caldas C., Ponder B. “Allele-Specific Up-Regulation of FGFR2 Increases Susceptibility to Breast Cancer”. *PLoS Biology*. 6: 1098 – 1103, 2008.
- Miki Y.; Swensen J.; Shattuck-Eidens D.;Harshman K.; Tavtigian S.; Liu Q.; Cochran C.; Bennett LM.;Ding W.; *et al.* ” A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*”. *Science*. 266: 66 – 71, 1994.

- Moffa A.; Bannheimer B.; Ethier S. “Transforming Potential of Alternatively Spliced Variants of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Human Mammary Epithelial Cells”. *Mol Cancer Res.*2: 643-652, 2004.
- Mueller H.; Flury N.; Eppenberger-Castori S.; Kueng W.; David F.; Eppenberger U. “Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients”. *Int. J. Cancer.* 89: 384–388, 2000.
- Oldenburg R.; Meijers-Heijboer H.; Cornelisse C.; Devilee P. “Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found?”. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 63: 125–149, 2007.
- Parkin D.; Pisani P.; Ferlay J. “Global cancer statistics”. *CA Cancer J Clin.* 49:33–64, 2009.
- Parkin D. “International variation”. *Oncogene.* 23: 6329–40, 2004.
- Penault-Llorca F.; Bertucci F.; Adelaide J.; Parc P.; Coulier F.; Jacquemier J.; Birnbaum D.; Delapeyrier. “Expression of FGF and FGF receptors in human breast cancer. *Int J Cancer.* 61: 170-176, 1995.
- Peto J.; Mack T. “High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer”. *Nat Genet.* 26:411-4, 2000.
- Pharoah P.; Dunning A.; Ponder B.; Easton D. “Association studies for finding cancer - susceptibility genetics variants”. *Nat Rev Cancer.*11:850 – 860, 2004.
- Pharoah P.; Antoniou A.; Easton D., Ponder B. “Polygenes, Risk Prediction, and Targeted Prevention of Breast Cancer”. *N Engl J Med.* 358 : 2796-803, 2008.
- Reebeck T.; DeMichele A.; Tran T.; Panossian S.; Bunin G.; Troxel A.; Strom B. “Hormone-dependent effects of *FGFR2* and *MAP3K1* in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. *Carcinogenesis.* **30**:269–274, 2009.
- Raskin L.; Pinchev M.; Arad C.; Lejbkowitz F.; Tamir A.; Rennert H.; Rennert G.; Gruber S. “*FGFR2* is a breast cancer susceptibility gene in Jewish and Arab Israeli populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers.*17:1060–5, 2008.
- Salh B.; Marotta A.; Matthewson C.; Ahluwalia M.; Flint J.; Owen D.; Pelech S. “Investigation of the MEK–MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer”. *Anticancer Res.* 19: 731–740, 1999.

- Santen R.; Songb R.; McPherson R.; Kumarc R.; Adamc L.; Jeng M.; Yue W. "The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer". *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 80: 239–256, 2002.
- Santos JL. "Epidemiología Genética, principios y métodos". Editorial Mediterráneo.1:168, 2010.
- Singletary S. "Rating the risk factors for breast cancer". *Ann Surg*. 237:474-482, 2002.
- Sivaraman V.; Wang H.; Nuovo G.; Malbon C. "Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer". *J. Clin.* 99:1478–1483, 1997.
- Stacey S.; Manolescu A.; Sulem P.; Thorlacius S.; Gudjonsson S.; Gudbjörn J.; Jakobsdóttir M.; *et al.* "Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor–positive breast cancer". *Nature genetics*. 40:703-706, 2008.
- Stratton M.; Rahman N. "The emerging landscape of breast cancer susceptibility". *Nat genetics*. 40: 17 – 22, 2008.
- Tamaru N.; Hishikawa Y.; Ejima K.; Nagasue N.; Inoue S.; Muramatsu M.; Hayashi T.; Koji T. "Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis in human breast cancer". *Laboratory Investigation*. 84:1460–1471, 2004.
- Tamimi R.; Lagiou P.; Czene K.; Liu J.; Ekbohm A.; Hsieh C.; Adami H.; Trichopoulos D. "Hall P Birth weight, breast cancer susceptibility loci, and breast cancer risk". *Cancer Causes Control*. 21:689–696, 2010.
- Tapper W.; Hammond V.; Gerty S.; Ennis S.; Simmonds P.; Collins A. "The influence of genetic variation in 30 selected genes on the clinical characteristics of early onset breast cancer". *Breast Cancer Research*. 10:R108 (doi:10.1186/bcr2213), 2008.
- Tavtigian S.; Simard J.; Rommens J.; Couch F.; Shattuck-Eidens D.; Neuhausen S.; Merajver S.; *et al.* "The complete *BRCA2* gene mutations in chromosome 13q-linked kindreds". *Nat Genet.*, 12:333-340, 1996.
- Thomas G.; Jacobs K.; Kraft P.; Yeager M.; Wacholder.; Cox D.; Hankinson S.; *et al.* "A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies

two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). *Nature*. 41:579-584, 2009.

- Turnbull C.; Rahman N. "Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future". *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 9: 321-345, 2008.
- Turnbull C.; Seal S.; Renwick A.; Warren-Perry M.; Hughes D.; Elliot A. "Gene-gene interactions in cancer susceptibility". *Human Molecular Genetics*. 21(4): 958 – 962, 2012.
- Turner N.; Grose R. "Fibroblast growth factor signaling from development to cancer". *Nature Reviews Cancer*. 10:116-129, 2010.
- Valenzuela C.; Acuña M.; Harb Z. "Gradiente sociogenético en la población chilena". *Rev Med Chile*. 115: 295 – 299, 1987.
- Welborena W.; Stunnenberga H.; Sweep F.; Span P. "Identifying estrogen receptor target genes". *Molecular Oncology*. 1:138 – 143, 2007.
- Wooster R.; Bignell G.; Lancaster J.; Swift S.; Seal S.; Mangion J.; Collins N.; Gregory S.; Gumbs C.; Micklem G.; *et al* "Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*". *Nature*. 378: 789-792, 1995.
- Yang Q.; Khoury M.; Friedman J.; *et al*. "How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population?". *Int J Epidemiol*. 34: 1129 – 1137, 2005.
- Zang X.; Pento J. "Keratinocyte growth factor-induced motility of breast cancer cells". *Clinical and experimental metastasis*. 18: 573-580, 2001.
- Zhang J.; Qiu L.; Wang Z.; Leaw S.; Wang B.; Wang J.; Cao Z.; Gao J.; Hu X. "Current evidence on the relationship between three polymorphisms in the *FGFR2* gene and breast cancer risk: a meta-analysis". *Breast Cancer Res Treat*. 124:419-24, 2010.
- Zhang Y.; Kulp S.; Sugimoto Y.; Farrar W.; Brueggemeier R.; Lin Y. "Keratinocyte growth factor induces aromatase activity in cultured MCF-7 human breast cancer cells". *Anticancer Res*. 18: 2541–6, 1998.
- Ziegler R.; Hoover R.; Pike M.; Hildesheim A.; Nomura A.; Wesr D.; *et al*. "Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women". *J Natl Cancer Inst*. 85:1819–27, 1993.

Sitios web

- <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>).
- Applied Biosystems protocol: Taqman ® SNP Genotyping assay (http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/geralddocuments/cms_042998.pdf).

