

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**HOMOGENEIDAD GENÉTICA EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA EN EL
NORESTE DE MEXICO**

Por

M en C. ANA LAURA CALDERÓN GARCIDUEÑAS

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Especialidad en Biología Celular y Genética

Octubre, 2005

HOMOGENEIDAD GENÉTICA EN MUJERES CON CÁNCER

DE MAMA EN EL NORESTE DE MEXICO**Aprobación de la Tesis:**

DR. RICARDO M. CERDA FLORES
DIRECTOR

DRA. ADRIANA ELIZABETH FLORES SUAREZ
SECRETARIA

DR. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ
VOCAL

DR. JOSE ANTONIO HEREDIA ROJAS
VOCAL

DR. MOHAMMAD H. BADDI
VOCAL

SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR****AGRADECIMIENTOS**

|

Expreso mi más sincero agradecimiento al Dr. Ricardo M. Cerda Flores, asesor de mi tesis, así como a los doctores Adriana Elizabeth Flores Suárez, Roberto Mercado Hernández, José Antonio Heredia Rojas y Mohammad H. Baddi que formaron parte de mi Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo para la realización de mi preparación (93354).

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por alentar mi desarrollo profesional y facilitar el tiempo, instalaciones y recursos para la realización de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial al departamento de Bioquímica de la facultad de Medicina, por permitir la realización de parte del trabajo experimental en sus instalaciones y a la valiosa ayuda de la Dra. Rocío Ortiz y del QFB Víctor Manuel Ortiz, así como a la facultad de Biología.

A mis compañeros de las cuales aprendí y con los que compartí las actividades diarias, en especial a Roxana A. Rivera Prieto por su ayuda.

A las pacientes que desinteresadamente contribuyeron con su participación y que motivaron este estudio.

A mi familia, por todo lo que significa para mí.

RESUMEN

Ana Laura Calderón Garcidueñas

Fecha de Graduación: Octubre, 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Biología

Título del estudio: HOMOGENEIDAD GENÉTICA EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA EN EL NORESTE DE MÉXICO.

Número de páginas: 93

Candidata para el grado de Doctor en Ciencias

con

especialidad en Biología Celular y Genética

Área de estudio: Genética

Propósito y Método de Estudio: El cáncer de mama (CM) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en México y es la primera causa de muerte por neoplasia en mujeres de Nuevo León. Aunque existen estudios en el Noreste de México que han probado homogeneidad genética en población aleatoria con el estudio de grupos sanguíneos, DNAm_t y marcadores polimórficos del tipo de D1S80 y HLA-DQA1, es muy importante determinar si existe homogeneidad genética no solo en la población general, sino también en la población con cáncer. En este trabajo se determinó si existe homogeneidad genética en mujeres con cáncer de mama en una muestra de 115 mujeres con CM y 143 individuos de población general. Se utilizaron tres marcadores polimórficos del tipo STRs y se comparó la estructura genética de estas poblaciones seleccionadas versus la estructura genética de un estudio previo en población aleatoria en el Noreste de México. Para la realización de este trabajo se montó y estandarizó la técnica para obtención de DNA, amplificación de los STRs y detección de los polimorfismos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y revelado con plata.

Contribuciones y conclusiones: Las frecuencias génicas de los tres STRs para las poblaciones con y sin CM estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para los 3 STRs (D16S539, D7S820 y D13S317): 1) las heterocigocidades observadas (esperadas) fueron 0.77 (0.78), 0.77 (0.77) y 0.80 (0.80) para CM y 0.76 (0.77), 0.78 (0.78) y 0.81 (0.81) para la población general, 2) las PDs fueron 0.90, 0.91 y 0.92 para CM y 0.89, 0.91 y 0.93 para la población general y 3) las PEs fueron 0.56, 0.55 y 0.61 para CM y 0.55, 0.57 y 0.63 para la población general. Las comparaciones de las frecuencias alélicas y genotípicas entre las poblaciones con y sin CM no fueron significativas. Las contribuciones caucásicas, indígena y africana para la población: 1) CM: 32%, 59% y 9%, 2) General: 45%, 54% y 1%, 3) Hispanos: 44%, 55% y 1% y 4) Honduras: 24%, 59% y 17%. Las comparaciones entre CM, población general e Hispanos no mostraron diferencias significativas entre ellas pero si con la población de Honduras al aplicarse la prueba de Rao. El análisis de componentes principales explicó un 98% de la variabilidad ubicando a las poblaciones en un plano similar, e intermedio a las poblaciones ancestrales caucásicas e indígenas y mínimamente a la africana. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta en el presente estudio. La demostración de homogeneidad genética en esta población seleccionada con CM indica que esta población es adecuada para 1) realizar estudios de marcadores genéticos asociados con la enfermedad en la búsqueda de genes candidatos y 2) de farmacogenómica.

ASESOR: _____

Dr. Ricardo M. Cerda Flores

ABSTRACT

Ana Laura Calderón Garcidueñas

Graduation date : October, 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Biología

Title : GENETIC HOMOGENEITY IN WOMEN WITH BREAST
CANCER IN NORTHEAST MÉXICO

Pages number: 93

**Candidate to PhD in Science, speciality in Cellular
Biology and Genetics.**

Field of study: Genetics.

Purpose and Study Methods : Breast cancer (BC) is the second most frequent Malignant neoplasia in Mexico and the first neoplastic cause of death in women at Nuevo Leon. Although there are studies in the Northeast Mexico that had proved genetic homogeneity in aleatory population using blood groups, DNAm and polymorphic markers such as D1S80 and HLA-DQA1, it is very important to establish if there is genetic homogeneity not only in general population, but also in cancer population. In this work we determined if there was genetic homogeneity in women with breast cancer in a sample of 115 women with BC and 143 healthy individuals. Three polymorphic STR type markers were used and the genetic structure of the selected population was compared with one of a previous study in aleatory population in Northeast Mexico. The techniques employed included DNA obtainment, STRs amplification, and detection of polymorphisms with polyacrilamide gel electrophoresis and silver staining.

Contributions and conclusions: The genetic frequencies of the three STRs for the populations with and without BC were in equilibrium of Hardy-Weinberg. For the 3 STRs (D16S539, D7S820 y D13S317): 1) Observed heterocigocity (expected) were 0.77 (0.78), 0.77 (0.77) and 0.80 (0.80) for BC and 0.76 (0.77), 0.78 (0.78) and 0.81 (0.81) for the general population, 2) The DPs were 0.90, 0.91 and 0.92 for BC and 0.89, 0.91 and 0.93 for general population 3) The EPs were 0.56, 0.55 and 0.61 for BC and 0.55, 0.57 and 0.63 for general population. The comparison of allelic and genotypic frequencies between populations with and without BC was not significant. The Caucasian, Indian and African contributions for the population, were: 1) BC: 32%, 59% y 9%, 2) General: 45%, 54% y 1%, 3) Hispanics: 44%, 55% y 1% y 4) Honduras: 24%, 59% y 17%. Comparisons between BC, general populations and Hispanics did not show significative differences among them, but were evident with the Honduras population with the Rao test. The component analysis explained 98% of the variability, locating the populations in a similar plane, and in the middle way respecting to the Caucasian and Indian ancestries and in minor degree with the African one. These results support the proposed hypothesis in this study. The demonstration of genetic homogeneity in this selected BC population indicates that this population is adequate for: 1) Search BC candidate genes and 2) Research in pharmacogenomics.

ASSESSOR: _____

Ricardo M. Cerda Flores, PhD.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Estructura Biológica	12
1.1.1. Historia	12
1.1.2. La población en América	13
1.1.3. Población de Nuevo León	14
1.1.4. Relaciones genéticas poblacionales	15
1.1.5. Estudios de estructura biológica en México	16
1.2. Cáncer de mama	19
1.2.1. Epidemiología	19
1.2.2. Factores de riesgo	20
1.2.2.1. Etnicidad y cáncer de mama	20
1.2.2.2. Obesidad y cáncer de mama	21
1.2.2.3. Factores reproductivos	23
1.2.2.4. Factores dietéticos	26
1.2.2.5. Factores ambientales	28
1.2.2.5.1. Cadmio	28
1.2.2.5.2. Fluidos para manufactura de metal	29
1.2.2.5.3. Campos magnéticos ocupacionales	29
1.2.2.5.4. Radiación	30
1.2.2.5.5. Actividad física recreacional y riesgo de CM	30
1.2.2.5.6. Uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas	31

1.2.2.6. Factores genéticos	32
1.2.2.6.1. Conceptos generales de cáncer hereditario	32
1.2.2.6.2. BRCA1 y BRCA2: su contribución en diferentes poblaciones	34
1.3. Marcadores y polimorfismos genéticos	36
1.3.1. Conceptos generales	36
1.3.2. Polimorfismos del DNA	37
1.3.3. STR	38
1.3.3.1. Generalidades	38
1.3.3.2. Poder de discriminación	39
1.3.3.3. Información específica del locus	40
1.4. Planteamiento del problema	40
1.5. Justificación	41
1.6. Objetivos	42
1.6.1. Objetivo general	42
1.6.2. Estructura genética	42
1.6.3 Estructura ecológica	42
1.7. Hipótesis	43
2. MATERIAL Y MÉTODOS	44
2.1. Tipo de estudio	44
2.1.1. Estudio de homogeneidad genética	44

2.1.2. Estudio descriptivo de estructura ecológica	44
2.2. Cálculo de tamaño de muestra	44
2.3. Universo de trabajo	45
2.4. Características de las pacientes	45
2.5. Tratamiento estadístico	46
2.6. Técnicas empleadas	47
2.6.1. Extracción del DNA	47
2.6.2. Amplificación de STRs	47
3. RESULTADOS	48
3.1. Características de la población con cáncer de mama	48
3.1.1. Características generales	48
3.1.2. Características migratorias	50
3.2. Análisis genético	51
3.2.1. Frecuencias alélicas	51
3.2.2. Frecuencias genotípicas	54
3.2.3. Número de loci heterocigóticos	56
3.2.4. Estadísticas forenses	58
3.2.5. Contribuciones ancestrales (española, indígena y africana)	60
3.2.6. Análisis de componentes principales	60
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62

5. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	67
REFERENCIAS	68
APÉNDICES	79
1. Carta de consentimiento informado	80
2. Protocolo de homogeneidad genética	81
3. Gel de agarosa al 0.8% con 12 muestras de DNA de pacientes con CM	86
4. Gel de agarosa al 2% que muestra los productos amplificados de los STRs	87
5. Gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata que muestra los 3 STRs	88
6. Artículos publicados	89

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Información del locus de cada uno de los marcadores estudiados.	41
2. Características de las mujeres con CM en el noreste de México	50
3. Distribución por zonas geográfico- poblacionales de acuerdo al lugar de nacimiento de los 4 abuelos.	52
4. Frecuencias alélicas para el locus D7S820 observadas en 115 mujeres con CM.	53
5. Frecuencias alélicas para el locus D7S820 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.	53
6. Frecuencias alélicas para el locus D13S317 observadas en 115 mujeres con CM.	53
7. Frecuencias alélicas para el locus D13S317 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.	54
8. Frecuencias alélicas para el locus D16S539 observadas en 115 mujeres con CM.	54
9. Frecuencias alélicas para el locus D16S539 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.	54
10. Frecuencias genotípicas para el locus D7S820 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.	55
11. Frecuencias genotípicas para el locus D13S317 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.	56
12. Frecuencias genotípicas para el locus D16S539 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.	57
13. Frecuencia de homocigotos y heterocigotos (esperados y observados) para el locus D7S820 en 115 mujeres con CM.	58
14. Frecuencia de homocigotos y heterocigotos (esperados y observados) para el locus D13S317 en 115 mujeres con CM.	58

Tabla	Página
15. Frecuencia de homocigotos y heterocigotos (esperados y observados) para el locus D16S539 en 115 mujeres con CM.	59
16. Número de loci heterocigóticos (NLH) en población con CM y aleatoria para los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539.	59
17. Estadísticos forenses para los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539.	60
18. Porcentaje de contribución española, amerindia y africana.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mapa de México con las 5 regiones migratorias.	51
2. Análisis de componentes principales para poblaciones española, indígena, africana, mestiza mexicana y mestiza con cáncer de mama.	62

HOMOGENEIDAD GENÉTICA EN MUJERES CON CÁNCER DE MAMA EN EL NORESTE DE MÉXICO.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CM) es un grave problema de salud pública que tiene una etiología multifactorial, incluyendo factores genéticos y ambientales. Como factor de riesgo el componente genético es el más importante. La genética del cáncer de mama en nuestro país apenas empieza a ser estudiada (Ruiz- Flores, 2001; Calderón- Garcidueñas 2005). Dada las características de nuestra población mestiza, producto de la mezcla de caucásicos, indios y africanos se requiere investigar si la población con cáncer de mama es genéticamente homogénea y similar a la población aleatoria. Esto es sumamente importante para validar estudios de genes candidatos de susceptibilidad para CM. El propósito de este trabajo fue precisamente investigar si la población con CM es genéticamente homogénea con la población aleatoria, utilizando marcadores polimórficos del tipo de STRs. En los siguientes apartados se presenta un panorama general sobre CM y sobre estudios poblacionales que permite conectar este problema de salud, con la base genética no solo de susceptibilidad sino también a nivel poblacional.

1. 1. Estructura Biológica

1. 1. 1. Historia

A partir de la década de 1960, se da una innovación en el estudio de la estructura biológica de las poblaciones animales: se trata del fin al de la separación entre la ecología de poblaciones y la genética de poblaciones. Ambas, para mediados del siglo, habían alcanzado, independiente y paralelamente, un alto grado de sofisticación en sus conceptos, en sus técnicas, y en las herramientas matemáticas y estadísticas que les sirven de descripción. Sin embargo, el ecólogo de poblaciones seguía su trabajo suponiendo que la población era genéticamente homogénea, que no se daban cambios en la constitución genética a lo largo del tiempo, que los parámetros poblacionales con que se trabajaba no sufrían ningún efecto del ambiente o de los otros organismos, conducente a algún tipo de selección. De manera similar, el genetista de poblaciones analizaba cambios en las frecuencias genéticas, las tasas de mutación, los problemas de retro-cruza, y muchos otros aspectos fundamentales de la genética de poblaciones, haciendo caso omiso de toda una serie de características fundamentales que se dan en las poblaciones y que constituyen el eje sobre el cual elabora su propio edificio el ecólogo de poblaciones; aspectos fundamentales como estructura de edades de la población, proporción de sexos, distribución espacial de los individuos de la población, ciclos de vida, tablas de vida, tablas de fecundidad, eran ignoradas por el genetista de poblaciones (Rabinovich, 1980).

1.1.2. La población en América

Los primeros pobladores de América fueron ancestros asiáticos que cruzaron el estrecho de Bering, por Alaska antes del final de la glaciación Wurm-Wisconsin, hace entre 15,000 y 40,000 años (Serrano-Sánchez, 1993). A partir de estos ancestros, la población se distribuyó a todo lo largo del continente. Sin embargo, a partir de 1492 y con la llegada de Cristóbal Colón, el perfil de la población americana se modificó.

En 1492, los reyes católicos Isabel y Fernando expulsaron definitivamente de España a moros y judíos, excepto a aquellos que se convirtieron al catolicismo (Coon 1969). A pesar de ello, muchos judíos conversos encontraron más seguro marchar a América. Después de 50 años, había 15,000 españoles en América, principalmente andaluces, extremeños, castellanos y vascos (Velasco, 1993).

Dado que la conquista fue una empresa esencialmente masculina y que el número de las mujeres blancas en América era escaso, el mestizaje entre blancos e amerindias se inició rápidamente (Sáenz, 1993). Con la llegada de esclavos negros, pronto se inició la mezcla con otros elementos raciales, predominantemente indígenas, ya que se importaban sobre todo hombres negros en una proporción de 3:1 en relación a mujeres de color (Sáenz, 1993). Para mediados del siglo XVII, los negros sobrepasaban a los españoles. En el año de 1640 habían 150,000 esclavos en México⁵. Con el tiempo la población resultante del cruce de blancos, indios y negros se incrementó y el resultado poblacional fue adquiriendo un aspecto más homogéneo físicamente (Sáenz, 1993). Actualmente, México cuenta con casi 100 millones de habitantes distribuidos en los 32

estados (INEGI, 2000).

1.1.3. Población de Nuevo León

Nuevo León, situado en el noreste de México tiene una superficie de 64,555 km² y una población en el censo del 2000, de 4 millones de habitantes. La capital del estado, Monterrey, se localiza en la parte centro-occidental del territorio y con otras 6 ciudades constituye el área metropolitana de Monterrey, donde se concentra el 78.4% de la población.

En 1821, el estado tenía una población de 78,816 habitantes con un promedio de 52% españoles, 45% indígena y mestiza y 3% africana. En la actualidad se considera que casi el 100% de la población es mestiza con diferentes grados de mezcla génica (Vizcaya, 1969).

La estructura genética de la población de Nuevo León se ha visto influida desde su colonización entre 1577 y 1596 hasta la fecha, por varios eventos. De inicio, las poblaciones antecesoras, como fueron los indios nativos, los indios inmigrantes (Tlaxcaltecas, Lipanos y Comanches), españoles, portugueses, judíos sefarditas, franceses y alemanes (Del Hoyo, 1979). Ocho guerras en las que los habitantes del estado participaron: la independencia de México (1810-1821), la independencia de Texas (1832), la guerra de Estados Unidos- México (1846), la batalla de Ayutla (1854), las invasiones de Lipanos y Comanches (1848- 1870), la guerra de Reforma (1857- 1860), la invasión Francesa (1862- 1866) y la Revolución Mexicana (1910- 1917). Las epidemias de viruela en el siglo XVII (Hernández, 1973) y la de fiebre amarilla en el

siglo XIX (Montemayor, 1971). Finalmente, la inmigración que continúa hasta la fecha debido al crecimiento industrial del área. En 1940, la población en el estado tenía 541,147 habitantes, de los cuales el 39.24% residía en el área metropolitana de Monterrey (AMM). Para 1960 la población se incrementó a 1,078,848 de los cuales el 66.41% residía en el AMM. Este incremento se debió a la migración de 400,000 personas provenientes principalmente de SLP, Coahuila, Zacatecas, la ciudad de México y de algunos países extranjeros (Montemayor, 1971).

1.1.4. Relaciones genéticas poblacionales

Las relaciones genéticas entre poblaciones se pueden medir con diferentes parámetros. Uno de ellos es la mezcla génica, que permite calcular en las poblaciones híbridas, la proporción de genes provenientes de cada una de las poblaciones fundadoras (Chakraborty, 1975).

La mezcla génica consiste en la posibilidad de que dos poblaciones genéticamente diferentes se mezclen entre sí. La fórmula que permite estimar en las poblaciones mestizas la proporción de genes proveniente de cada una de las poblaciones antecesoras es:

% de mezcla génica = $(q^x - Q) / (q - Q) \times 100$, en donde q^x es la frecuencia alélica de la población híbrida (por ejemplo Monterrey), mientras que q (amerindia) y Q (española) representan las frecuencias alélicas de las poblaciones antecesoras (aquellas de que se formó la población mestiza). Habitualmente el único dato experimental con que se cuenta es la frecuencia del gen en la población mestiza, mientras que las frecuencias de las poblaciones base son obtenidas de la literatura, aceptando que son iguales o similares

a las existentes cuando ocurrió la mezcla génica (Chakraborty, 1988).

1.1.5. Estudios de estructura biológica en México

En el estado de Nuevo León se ha calculado el por ciento de mezcla génica usando como marcadores genéticos a los grupos sanguíneos (Garza, 1983). Con estos estudios se ha demostrado que la población tiene contribución española y amerindia y que en los estratos socioeconómicos altos hay mayor contribución española que en los medios y bajos (Cerde-Flores, 1987). También se evidenció que en la generación de 1894- 1923 hubo una mayor contribución española que en la de 1954- 1983 y que en los individuos cuyos cuatro abuelos nacieron en Nuevo León, hay una mayor contribución española que los que nacieron fuera del estado (Cerde- Flores 1989).

En 1991, se estudió a la población Mexicana que reside en el área Metropolitana de Monterrey (AMM), la cual fue agrupada por generaciones y el lugar de nacimiento de sus cuatro abuelos [AMM, San Luis Potosí (SLP) y Zacatecas (ZAC)], para determinar el grado de variación genética y las diferencias genéticas entre los individuos nativos en el AMM y las poblaciones inmigrantes de SLP y ZAC al Estado de Nuevo León. Se determinaron las frecuencias de nueve sistemas de grupos sanguíneos. El análisis de distancia genética indica que SLP y ZAC son semejantes al AMM, independientemente del lugar de nacimiento y de las generaciones. El análisis de diversidad génica (G_{st}) sugiere que más del 96% del total de diversidad génica (H_i) puede ser atribuida a la variación individual dentro de la población. El análisis de

mezcla génica sugiere que los individuos del AMM, SLP y ZAC, estratificados por lugar de nacimiento y generación, han recibido una contribución predominantemente Española (78.5%), seguida por una contribución indígena Mexicana (21.5%). Similarmente se utilizó el análisis de mezcla génica, para conocer el grado de contribución que ha tenido la población de Nuevo León (estratificada en tres generaciones) de las poblaciones del AMM, ZAC y SLP, se observó una mayor contribución del AMM (64.6%), seguida por la de ZAC (22.1%) y la de SLP (13.3%). Se demostró que no hay asociación no-aleatoria de los alelos de los sistemas sanguíneos analizados (por ejemplo, no hubo evidencia de desequilibrio gamético) existiendo además homogeneidad genética en la población aleatoria del Noreste de México, a pesar de que esta población es de origen mestizo (Cerde- Flores, 1991).

En 1994 se realizó una comparación de la distribución de homogeneidad genética de las poblaciones del Noreste de México con las México-americanas utilizando cinco marcadores genéticos no moleculares, no encontrando diferencias en los perfiles entre ellas (Cerde- Flores, 1994).

En el 2000, en un estudio sobre la estructura genética en una población seleccionada de 417 mujeres con fertilidad natural del Noreste de México, se encontró que más del 99.1% del total de la diversidad puede atribuirse a variación entre los individuos dentro de la población. Esta población ha recibido predominantemente una mayor contribución española y una menor Amerindia. Esta población presentó homogeneidad genética (Cerde- Flores, 2000).

En el 2002, se encontró en población aleatoria (n=143), no emparentada y sana

que los haplotipos del DNAm_t era 100% de origen Amerindio (A = 39.86%, B = 4.20%, C = 36.36% y D = 19.58%). Al agruparse la población por lugar de nacimiento de las abuelas maternas se encontró que existió una distribución homogénea de acuerdo a las cuatro zonas (Cerdeira-Flores, 2002-a).

En 143 Mestizos Mexicanos, no emparentados y sanos se encontró que 13 STRs se distribuían homogéneamente en la población del Noreste de México. Además los resultados de mezcla génica fueron similares a los encontrados al utilizar grupos sanguíneos y los sistemas D1S80 y HLA-DQA1 (Cerdeira-Flores, 2002-b).

Posteriormente se compararon los polimorfismos genéticos de los marcadores D1S80 y HLA-DQA1 en tres poblaciones Mestizas Mexicanas (Nuevo León, Jalisco y Distrito Federal) y se determinó que éstas presentan una distribución homogénea (Cerdeira-Flores, 2002-c). Todos estos resultados apoyan el uso de estos marcadores genéticos en el análisis de homogeneidad genética. Esta última publicación sustentó el presente proyecto pues el hecho de haber encontrado que las poblaciones mestizas de los Estados de Nuevo León, Jalisco y el Distrito Federal comparten una estructura y mezcla genética similar, nos hace inferir (desde un punto de vista epidemiológico) que este hallazgo tendrá profundas implicaciones en los estudios de asociación de enfermedades con genes en México ya que se facilitará el muestreo tanto de individuos afectados como de controles sin necesidad de detallar información acerca de su historia residencial o historia de migración entre Estados del país, lo que conduce a la posibilidad de una fácil colecta de grandes series de casos y controles aplicables posteriormente a la búsqueda de genes candidatos. Dado lo anterior, decidimos trabajar con uno de los más graves

problemas de salud en México, el Cáncer de Mama (CM) y probar si esta homogeneidad genética se conserva en población seleccionada como en las mujeres con CM.

1. 2. Cáncer de Mama

1.2.1. Epidemiología

El CM es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en mujeres. Cada año se diagnostican un millón de casos nuevos a nivel mundial y se producen unas 300,000 muertes (Pisan, 1999). Anualmente en los Estados Unidos se reportan 180,000 casos nuevos y 30,000 defunciones por esta causa (Holford, 1991).

México es un país de casi 98 millones de habitantes, el 50% de los cuales son mujeres⁶. En 1993 se reportaron en nuestro país 5,739 casos nuevos de CM, de los cuales el 20% eran residentes de Nuevo León²⁴. En 1998 esta cifra aumentó a 9,490. La tasa de mortalidad promedio en México es de 10.45/100,000 mujeres. El estado de Nuevo León ocupa el tercer lugar en mortalidad con una tasa de 15.9/100,000 habitantes después del Distrito Federal y Coahuila. De hecho, la mortalidad debida a CM es mayor en los estados del norte de México: Coahuila (16.1), Nuevo León, Sonora (14.5), Chihuahua (14.1) y Baja California (13.5) (RHNM, 1993, 1998).

1.2.2. Factores de riesgo

A pesar de los avances oncológicos, el estudio de la etiología del CM está aún en proceso.

Los factores de riesgo que modulan el desarrollo de CM incluyen: edad, país de origen, estado socioeconómico, eventos reproductivos, hormonas, estilo de vida (consumo de alcohol, dieta, obesidad, actividad física), historia familiar de CM (Calderón- Garcidueñas, 2000), densidad mamográfica, historia de enfermedad benigna mamaria, radiación ionizante, densidad ósea, estatura, niveles de prolactina y de IGF-1, agentes quimio- preventivos (Dumitrescu, 2005). Por supuesto los factores genéticos son muy importantes e incluyen: genes de susceptibilidad para CM de alta penetrancia (BRCA1, BRCA2, p53, PTEN, ATM, NBS1 y LKB1) y de baja penetrancia como los genes del citocromo P450 (CYP1A1, CYP2D6, CYP19), la familia del glutatión-S-transferasa (GSTM1, GSTP1), genes del metabolismo del alcohol y de estructuras de un carbón (ADH1C and MTHFR), genes de reparación de DNA (XRCC1, XRCC3, ERCC4/XPF) y genes que codifican moléculas de señalamiento celular (PR, ER, TNF α o HSP70) (Dumitrescu, 2005).

1.2.2.1. Etnicidad y CM.

En Estados Unidos, los estudios epidemiológicos han mostrado que la incidencia de CM es menor en mujeres pertenecientes a minorías étnicas y la mortalidad es mayor en mujeres afro-americanas comparadas con mujeres de raza blanca.

En un estudio de seguimiento (Chlebowski, 2005) de 156, 570 mujeres posmenopáusicas se estudiaron las diferencias raciales o étnicas en la incidencia de CM y en el pronóstico. Después de un seguimiento promedio de 6.3 años, se diagnosticaron

3,938 CM. La incidencia ajustada por edad para todos los grupos minoritarios (Afro-americano, hispánico, amerindio/ nativo de Alaska, y Asiático/ Islas del Pacífico) fue menor que para mujeres blancas, pero el ajuste de factores de riesgo justificó la diferencia en todos los grupos, excepto el afro-americano. El CM en mujeres afro-americanas tiene características desfavorables; el 32% de los CM en estas mujeres fueron de alto grado de malignidad y receptores estrogénicos negativos comparado con el 10% en mujeres blancas (OR = 4.70, 95% CI = 3.12 a 7.09). Después de ajustar los factores pronósticos, las mujeres afro-americanas tuvieron una mortalidad más alta que las blancas (OR = 1.79, 95% CI = 1.05 a 3.05) que correspondió a 9 y 6 muertes por 10,000 mujeres en afro-americanas y blancas respectivamente. Este estudio mostró que las diferencias en las tasas de incidencia de CM entre diferentes grupos étnicos se explicaron por la distribución de factores de riesgo excepto en afro-americanas, en las cuales el tumor tiene un peor pronóstico lo que contribuye a una mayor mortalidad en este grupo.

1.2.2.2. Obesidad y CM.

La obesidad y la ganancia adulta de peso son factores de riesgo bien establecidos para CM posmenopáusico y se relacionan con el hecho de que a mayor grasa en la época posmenopáusica, mayor nivel de estrógenos circulantes debido a la capacidad del tejido adiposo de convertir la androstenodiona (AD) o la testosterona a estrógenos gracias al sistema del citocromo P450 presente en este tejido. La reacción de importancia central es la aromatización del anillo A y el tejido adiposo forma principalmente estrona. Después

de la menopausia, el nivel circulante de AD es alrededor de la mitad del que se ve antes de la menopausia. la mayor parte de esta AD proviene de las suprarrenales y solo una pequeña porción viene de los ovarios. El nivel de testosterona no cae en forma apreciable, y de hecho el ovario posmenopáusico segrega más testosterona que el premenopáusico. El nivel de estradiol circulante después de la menopausia es de 10- 20 pg/ ml (comparar con 200pg/ml durante el pico de ovulación de la mujer fértil) y la mayor parte deriva de la conversión periférica. El nivel circulante de estrona en la menopausia es mayor que la de estradiol y su promedio es de 30 pg/ ml. La producción promedio de estrógenos es de 45µg/24 h. El porcentaje de conversión de la AD se correlaciona con la edad. Mientras que la cantidad de AD disminuye a la mitad, el porcentaje de su conversión se duplica en la mujer posmenopáusica a medida que va aumentando su edad. Estos cambios se compensan uno a otro, lo que mantiene la producción de estrógenos en un nivel estable de 45 µg/ 24 h. El porcentaje de conversión de la AD en estrógeno se correlaciona también con el peso corporal. A mayor peso corporal, mayor conversión, es por eso que la obesidad en posmenopáusicas es factor de riesgo para CM.

La ganancia de peso durante períodos críticos parece relacionarse también con aumento del riesgo de CM. En un estudio reciente (Harvie, 2005) se investigó la asociación de cambios en el peso (pérdida o ganancia en exceso del 5% del peso corporal) usando dos modelos de factores de riesgo: a) edad de 18 a 30 años y edad de 30 años a la menopausia y b) edad de 30 años a la menopausia. Se estudiaron 33,660 mujeres posmenopáusicas en Iowa. Después de un seguimiento de 15 años, ocurrieron

1,987 casos de CM. El patrón de peso corporal más frecuentemente observado fue el incremento progresivo; estas mujeres tuvieron la incidencia más alta de CM y sirvieron como referencia para las comparaciones. Los grupos de riesgo más bajo fueron: (a) mujeres que mantuvieron su peso o lo perdieron de los 18 a los 30 años y después lo perdieron de los 30 a la menopausia [RR= 0.36; 95% CI: 0.22-0.60] y (b) mujeres que mantuvieron o perdieron peso de los 30 años a la menopausia y luego perdieron peso posterior a la menopausia (RR = 0.48; 95% CI, 0.22-0.65). Las mujeres que ganaron peso de los 30 años a la menopausia pero lo perdieron después de ésta experimentaron reducciones del riesgo (RR = 0.77; 95% CI, 0.64-0.92) aunque quizá ligeramente menor que las mujeres que mantuvieron su peso en ambos intervalos (RR = 0.63; 95% CI, 0.55-0.73). Las mujeres que ganaron peso entre los 18 y los 30 años y después lo perdieron de los 30 a la menopausia tuvieron reducciones semejantes de riesgo (RR, 0.61; 95% CI, 0.46-0.8) con mujeres que mantuvieron su peso en ambos intervalos (RR = 0.73; 95% CI, 0.64-0.84). Las mujeres que ganaron peso durante el periodo de los 30 a la menopausia pero que mantuvieron un peso estable después de la menopausia tuvieron tasas similares al grupo de referencia.

Todos estos datos sugieren que la prevención de ganancia de peso entre los 18 años y la menopausia o la pérdida de peso y mantenimiento del mismo durante estos años reducen el riesgo de CM posmenopáusico.

1.2.2.3. Factores reproductivos.

Los factores de riesgo reproductivos incluyen la menstruación temprana, la menopausia tardía y la historia negativa de lactación antes de los 25 años (Calderón-Garcidueñas, 2000). En otro estudio también mexicano, se determinó que los principales factores de riesgo reproductivo para CM fueron no tener hijos, baja paridad y edad tardía para tener el primer hijo (López- Carrillo, 1997).

Las características menstruales y reproductivas se relacionan con el estado hormonal de la mujer, particularmente con el balance entre estrógenos, progesterona y sus derivados. Los estrógenos son activadores de la proliferación celular y actúan directamente sobre receptores nucleares. Por otro lado, las mismas células neoplásicas son capaces de producir promotores de crecimiento que favorecen la proliferación tumoral. Entre estas sustancias destacan el factor de crecimiento epitelial alfa (TGF- α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Viladiu, 1996).

Una menarquía (primera menstruación) temprana y una menstruación tardía favorecen la exposición prolongada a estrógenos. Como se mencionó con anterioridad, entre las influencias hormonales, una función etiológica relevante es la exposición sin oposición a niveles elevados de estrógenos y andrógenos. Los estrógenos son hormonas esteroideas, solubles en lípidos, hidrofóbicas, que se transportan en proteínas acarreadoras específicas, desde el sitio de su liberación hasta el tejido diana. En el tejido, pasan a través de la membrana celular por difusión simple para unirse finalmente a receptores proteicos específicos en el núcleo. El complejo receptor-hormona se une a secuencias específicas de DNA llamadas elementos de respuesta hormonal (ERH) y de

esta manera modifican la expresión génica. Este complejo incrementa o suprime la expresión (transcripción en RNAm) de genes específicos adyacentes a los ERH, y por tanto modifica la síntesis de los productos proteicos (O'Malley, 1991). En otras palabras, el complejo receptor- hormona actúa como la llave que activa la síntesis de DNA y produce actividad replicativa en el tejido blanco, en este caso, las glándulas mamarias, mediante la activación del AMPc. Las hormonas en este contexto son promotoras del proceso carcinogénico. Es más, la evidencia epidemiológica más reciente indica que no solo los factores endocrinos sino también factores metabólicos relacionados con el metabolismo de glucosa, los estados de hiperinsulinemia y resistencia a insulina y la bio-disponibilidad del factor de crecimiento semejante a insulina juegan un papel importante en cáncer de mama. Estos factores endocrinos y metabólicos pueden representar blancos futuros para la prevención del cáncer (Muti, 2004).

Aunque estos factores reproductivos parecen ser aplicados a la población mundial femenina, la operatividad de los mismos puede variar en diferentes poblaciones dependiendo de los cambios en procesos reproductivos (hijos a edades más tardías, ausencia de lactación), por lo que es preciso reevaluar estos procesos en cada población de acuerdo a estos cambios en estudios de casos y controles.

Así, la incidencia de CM en japonesas, que hasta hace poco era una población tradicionalmente de bajo riesgo, se ha incrementado sustancialmente.

Se examinaron 38,159 mujeres japonesas entre 40-79 años de 1988 a 1990 y se siguieron en promedio 7.6 años. En este lapso hubo 151 casos de CM. En esta población

se observó una disminución en el riesgo de CM con el incremento de la paridad entre mujeres con hijos ($P = 0.01$). Las mujeres con 4 o más hijos tuvieron 69% menor riesgo que las nulíparas y el riesgo se mantenía en mujeres posmenopáusicas. El riesgo se incrementó con el incremento de edad al primer parto ($P = 0.05$) y se hizo más aparente en mujeres posmenopáusicas ($P = 0.02$). Comparadas con mujeres que habían tenido su primer hijo antes de los 25, aquellas que retardaron el evento hasta después de los 34 tuvieron un RR de 2.12 (95% CI: 0.72-6.21) y 3.33 (1.07-10.3) entre el total de sujetos y las menopáusicas respectivamente. En esta población no hubo asociación con riesgo de CM entre la edad de la menarquía o menopausia. En este estudio se concluyó que de acuerdo a los factores de riesgo reproductivo el CM en Japón es similar a lo que se observa en países occidentales y que el número de partos y la edad del primer parto puede ser factores importantes en la etiología del CM en mujeres japonesas (Tamakoshi, 2005).

Dentro de factores reproductivos también se ha investigado la historia de abortos como factor de riesgo. En un estudio de casos y controles se analizaron 2828 mujeres con CM y 8781 controles. Después de estratificar por edad al diagnóstico, paridad, y edad al primer nacimiento, la razón de momio (RM o OR) para CM fue de 1.02 (IC 0.88-1.18) en mujeres con historia previa de aborto y 0.80 (IC 0.72- 0.89) en aquellas con aborto inducido. En este estudio se concluyó que la historia de aborto previo natural o inducido no representa un riesgo sustancial para el futuro desarrollo de CM (Brewster, 2005).

1.2.2.4. Factores dietéticos.

Existen múltiples estudios de casos y controles que han demostrado que el consumo de vegetales y frutas protegen contra CM. También se ha demostrado que la obesidad y el consumo alto en grasas y bajo en fibras de las sociedades occidentales se asocian con un aumento en los niveles de estrógenos, que incrementan el riesgo de desarrollar CM. La hiperinsulinemia asociada a la obesidad sinergia la acción de los estrógenos en estimular la progresión de la lesiones pre-neoplásicas en las mamas de mujeres posmenopáusicas. El incremento en la ingesta de fibra puede reducir la resistencia a la insulina y reducir los niveles circulantes de estrógenos (Stoll, 1997). Existen algunos estudios con corto seguimiento de casos, en los que no parece haber asociación relevante entre el consumo de vegetales y el de frutas y el desarrollo o prevención de CM (Clavel, 2005).

En un estudio se examinó la asociación entre la dieta y el riesgo de CM posmenopáusico. Entre 1984 y el 2000 se estudiaron 3,206 casos de CM. En estas pacientes se identificaron dos patrones de dieta. El patrón prudente se caracterizó por un consumo alto de frutas, vegetales, granos enteros, productos lácteos bajos en grasa, pescado y pollo, mientras que la dieta occidental se caracterizó por mayor consumo de carne roja y carne procesada, granos refinados, dulces, postres y productos lácteos altos en grasa. Ninguno de los dos patrones se relacionó con un riesgo mayor de CM posmenopáusico. Sin embargo se observó una asociación positiva entre el patrón occidental y el hábito de tabaquismo (RR = 1.44, 96% IC = 1.02- 2.04; p= 0.03). También fue evidente una asociación inversa entre la dieta prudente y los cánceres con receptores de estrógeno negativo (RR = 0.62; 95% IC = 0.45- 0.88; p= 0.006). Entre los grupos (un alto consumo de frutas RR por incremento de un servicio / día = 0.88; 95%

IC = 0.80-0.97; $p= 0.009$) y vegetales (RR = 0.94; 95% IC = 0.88- 0.99; $p= 0.03$) se asociaron con riesgo disminuido de receptores de estrógeno negativo. La conclusión fue que el tipo de dieta occidental puede elevar el riesgo de CM entre fumadoras y la dieta prudente puede proteger contra tumores con receptores de estrógenos negativos (Fung, 2005).

En otro estudio se observó una disminución en el riesgo de enfermedad fibroquística proliferativa (EFP) y de EFP y CM con el mayor consumo de frutas y vegetales (Li, 2005).

En general, la mayoría de los estudios apuntan en lo positivo del consumo de frutas y verduras y la prevención no solo del CM sino de otras neoplasias y de enfermedades cardiovasculares.

1.2.2.5. Factores ambientales.

Existen factores ambientales que pueden influir en el riesgo para desarrollar CM.

1.2.2.5.1. Cadmio. Algunos estudios recientes han sugerido que el cadmio es un compuesto estrogénico que puede potenciar el riesgo para CM. En 164 mujeres japonesas se investigó la relación entre las concentraciones urinarias de cadmio y las concentraciones séricas de estrona, testosterona y sulfato de dehidro-epi-androsterona (SDHA). Se encontró una asociación significativa positiva entre los niveles urinarios de cadmio y los niveles séricos de testosterona después de ajustar por edad e índice de masa corporal. El nivel medio de testosterona fue 28% más alto en mujeres con cadmio

urinario alto ($\geq 3.00 \mu\text{g/g}$ creatinina) que en aquellas con cadmio bajo ($< 2.00 \mu\text{g/g}$ creatinina). Los niveles urinarios de cadmio no se asociaron significativamente con los niveles de estrona sérica ni de SDHA. Estos datos sugieren que la exposición a cadmio está asociada con niveles elevados de testosterona. Como los niveles altos se han asociado con riesgo para CM, la participación del cadmio en el riesgo de CM, deberá evaluarse en estudios futuros (Nagata, 2005).

1.2.2.5.2. Fluidos para manufactura de metal. Los fluidos para manufactura de metal se usan para la lubricación del metal durante su manufactura. Algunos estudios han reportado riesgo elevado para algunos cánceres en trabajadores expuestos a estos fluidos. Se ha hipotetizado que estos fluidos pueden incrementar el riesgo de CM debido a su poder carcinogénico y/ o a químicos que alteran las vías metabólicas hormonales. Se realizó un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de 4,680 trabajadoras de la industria automovilística que habían sido empleadas cuando menos durante tres años consecutivos entre el 1/1/41 y el 1/1/85 con seguimiento hasta 1994. Se identificaron 99 casos de CM y se identificaron 625 controles apareados por edad. Se observó una asociación débil positiva entre el tiempo acumulativo de exposición a fluidos solubles y el riesgo de CM. La asociación más fuerte se observó para fluidos solubles usados en la década previa al diagnóstico. Se observó una RM de 1.18 (95% IC = 1.02- 1.35) por mg/m^3 por año de exposición acumulativa a fluidos solubles en ese periodo de 10 años. Este estudio sugiere que puede existir alguna asociación entre exposición a fluidos solubles y riesgo de CM. Se requieren estudios confirmatorios (Thompson, 2005).

1.2.2.5.3. Campos magnéticos ocupacionales. Varios estudios epidemiológicos recientes sobre exposición laboral a campos magnéticos han sugerido una asociación con CM. Sin embargo, el más reciente de ellos, realizado en mujeres empleadas entre 1976 y 1999 en Suecia mostró otros resultados. Se identificaron 20,400 casos de CM en el registro de CM y se seleccionaron al azar 116,227 controles. La RM observada para mujeres expuestas a $0.30 \mu\text{T}$ o más fue de 1.01 (95%; IC: 0.93-1.10). Este resultado no apoyó la hipótesis de que los campos magnéticos aumentan el riesgo de CM (Forssen, 2005).

1.2.2.5.4. Radiación. Los datos epidemiológicos disponibles apoyan una relación lineal dosis-respuesta con dosis tan bajas como 100mSv. La magnitud del riesgo por unidad de dosis depende de cuando ocurrió la exposición a radiación, la exposición antes de los 20 años tiene el mayor riesgo. Otras características que pueden influenciar la magnitud del riesgo en función de la dosis específica son la edad a la que se observa el riesgo, la edad al primer hijo, la paridad, exposición a radiación durante el embarazo y factores genéticos (Ronckers, 2005).

1.2.2.5.5. Actividad física recreacional y riesgo de CM. En un estudio de cohorte multicéntrico (Macera, 2005) sobre ejercicio y riesgo de CM en 74,171 mujeres de 50-79 años con seguimiento promedio de 4.7 años se presentaron 1780 casos de CM. Las mujeres que tenían historia de ejercicio intenso \geq a 3 veces por semana a la edad de

35 años, tenían disminución del riesgo de CM (RR ajustado multivariado RR 0.86; 95% IC, 0.78- 0,95) comparado con las mujeres que no tuvieron esta característica. La asociación no fue significativa a los 50 ni a los 18 años. En general, la actividad física es protectora contra CM. Comparado con las que no hacían ejercicio, el riesgo se redujo para las que sí, en un 18%, 11%, 17% y 22% si se ejercitaban 5.1-10, 10.2-20, 20.1-40 y >40 h/ semana. Las horas de actividad física moderada no se asociaron significativamente con riesgo para CM (P para la tendencia, 0.12), aunque la duración más prolongada de >7 h/ semana, comparada con 0/ semana mostró una reducción significativa en riesgo (RR, 0.79; CI, 0.63-0.99). Cuando las mujeres se dividieron por tertiles de índice de masa corporal (IMC con cortes a 24.13 y 28.44 Kg. / m) la actividad física mayor fue protector contra CM para aquellos en el tercil más bajo de IMC (P = 0.03) pero no para aquellas en los tertiles superiores. La conclusión de este estudio fue que la actividad física se asocia a una disminución en el riesgo de CM en mujeres posmenopáusicas americanas. Una hora al día de ejercicio moderado o intenso provee el mayor beneficio.

1.2.2.5.6. Uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas. El uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINES), especialmente aspirina, se ha asociado con riesgo disminuido de CM en estudios de casos y controles. Sin embargo los estudios prospectivos han mostrado resultados menos consistentes. En el estudio de Cohorte de prevención del cáncer y nutrición II (Jacobs, 2005), se examinó la asociación entre AINES y la incidencia de CM, ajustado para múltiples factores de riesgo entre 77, 413

mujeres. Durante el seguimiento de 1992 al 2001, se observaron 3,008 casos de CM incidental. La información sobre el uso de AINES se obtuvo mediante cuestionarios llenados al inicio y durante el seguimiento. Ni el uso total de AINES (aspirina y otros) ni el uso exclusivo de aspirina se asociaron con la incidencia de CM aún a niveles altos de uso (RM 1.07, IC 95% 0.96-1.21) o \geq a 60 pastillas por mes. Incluso el uso de larga duración (30 pastillas o más por mes por 5 años o más) no se asoció con incidencia de CM. Aunque en este estudio no se pudo excluir una pequeña reducción en el CM asociado a AINES, los resultados apuntan a que no se logra una reducción importante en el riesgo.

1.2.2.6. Factores genéticos.

El mayor factor de riesgo para el cáncer de mama es una historia familiar positiva. En los casos de agregación familiar donde no se puede demostrar un patrón mendeliano, el desarrollo del CM se debe probablemente a mutaciones en genes de baja penetrancia y/o a factores ambientales. Otras familias presentan un patrón de herencia autosómico dominante en las cuales son frecuentes mutaciones en los genes BRCA1 (Cromosoma 17: 17q21) y BRCA2 (Cromosoma 13: 13q12-13) (Viladiu, 1996). Mutaciones en el gen BRCA1 predisponen predominantemente al CM y al cáncer de ovario, mientras que mutaciones en el gen BRCA2 predisponen al CM tanto en mujeres como en varones, así como a otras neoplasias como cáncer de próstata, gástrico pancreático y cerebral. Ambos genes son de gran tamaño, actúan como supresores de tumores, funcionan de una manera

dependiente del ciclo celular y se piensa que los dos participan, tanto en la activación de la transcripción de diversos genes, como en la reparación del DNA. Las mutaciones en estos genes son responsables del 90% del CM hereditario (Viladiu, 1996).

1.2.2.6. 1. Conceptos generales de cáncer hereditario. Se estima que cerca del 5-10% de los casos de CM se deben a predisposición hereditaria. Hasta ahora, se han identificado dos genes principales de susceptibilidad, BRCA1 y BRCA2. El gen BRCA1 (Cromosoma 17q) posee 5592 nucleótidos distribuidos en una región genómica de 100 kb. Los 22 exones codifican para una proteína de 1863 aminoácidos.

Aunque los primeros estudios de ligamiento sugirieron que la mayoría de los CM en familias de alto riesgo eran debidos a mutaciones en estos genes, estudios recientes han mostrado que la proporción de familias en los que BRCA1 y BRCA2 participan, varía de acuerdo a la población analizada y al tipo de familia. Es claro, que en el contexto de familias con un perfil modesto de CM, que de hecho son las familias más numerosas encontradas en la práctica clínica, el porcentaje de mutaciones encontradas es más bajo que los previamente considerado. En un estudio español (Osorio, 2000) de 32 familias que tenían al menos tres casos de mujeres con CM, y al menos una de ellas diagnosticada antes de los 50 años, la proporción de mutaciones en BRCA fue baja, de un 25%. Este hallazgo apoya la idea de que en la mayoría de familias de riesgo moderado las mutaciones se presentan en genes de susceptibilidad de baja penetrancia diferentes de BRCA.

Los genes BRCA se requieren para la recombinación homóloga y la reparación del

rompimiento del DNA. Las dos proteínas se han encontrado como constituyentes de complejos críticos en el proceso de reparación. Las mutaciones pleiotrópicas en BRCA1 pueden asociarse con defectos de la interacción proteína- proteína. En contraste el rol de BRCA2 en la reparación del DNA se define por su interacción directa con la recombinasa RAD51 (Liu, 2002).

Las mujeres que llevan una mutación en los genes BRCA1 y BRCA2 tienen un riesgo de desarrollar CM del 80% en el curso de sus vidas (Nardo, 2000) ; este riesgo puede modificarse por factores ambientales como el lactar antes de los 25 años. Dado que estos genes son genes supresores de tumores se requiere que el individuo herede una copia defectuosa y la otra se pierda o altere en el curso de la vida (Scully, 2000).

1.2.2.6.2. BRCA1 y BRCA2: su contribución en diferentes poblaciones. Las tasas de incidencia ajustada por edad para CM varían más de 10 veces en el mundo, con las tasas más altas reportadas en Norteamérica y en Europa. En Asia, la tasa más alta se presenta en Filipinas (47.7/ 100,000 por año). En ese país, en población abierta con CM la prevalencia de mutaciones en los genes BRCA es de 5.1% (95% CI: 2.6-7.6%), con una prevalencia de 4.1% (95% CI: 1.8-6.4%) para mutaciones en BRCA2 exclusivamente (BRCA2 4265delCT y 4859delA). En esta población, la mutación en BRCA1 5454delC es fundadora. En mujeres filipinas, el gen BRCA2 contribuye más que el gen BRCA1 en la incidencia de CM (De León, 2002).

Aunque el CM es una patología predominantemente de mujeres, uno de cada 100 pacientes es hombre. Los hombres que heredan una mutación en BRCA2 tienen un

riesgo de desarrollar CM del 6% a los 70 años. En canadienses, entre el 10-12% de los hombres con CM tienen mutación en BRCA2 (Wolpert, 2000).

En Rusia, la frecuencia de familias con mutaciones en BRCA es de 16%. Se han encontrado mutaciones fundadoras (BRCA1 5382insC) y mutaciones noveles en esta población, tres del tipo corrimiento en el marco de lectura (695insT, 1528del4, 9318del4) y una sin sentido (S1099X) (Tereschenko, 2002).

En España, por otro lado, aunque se han reportado numerosas mutaciones ninguna parece tener la frecuencia suficiente para ser considerada mutación fundadora (Llort, 2002)).

En población Suiza se estudiaron 262 mujeres con CM de aparición temprana (antes de los 41 años). Casi la mitad (48%) tenían alguna historia familiar de CM o de ovario y 9% de los casos de inicio temprano estaban asociados con mutaciones en línea germinal en BRCA1 o en BRCA2. Las mutaciones fueron más frecuentes en mujeres con al menos un familiar de primero o segundo grado con CM o de ovario y mujeres con CM bilateral (Loman, 2001).

En población mexicana el carcinoma mamario de inicio temprano (CMIT) representa el 8% del total. Existe únicamente un estudio en donde se describe la evolución clínica y las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en un grupo de 22 mujeres con CMIT. En este estudio se realizó detección de mutaciones por análisis de heteroduplex (AH) y secuenciación y seguimiento clínico durante 5 años. El 63.6% mostró banda variante

por AH: 8 polimorfismos; 4 mutaciones de significado incierto; 2 mutaciones noveles en el exón 11: BRCA1 (3587delT) y BRCA2 (2664InsA). La mortalidad mostró una tendencia positiva con la etapa clínica (OR = 8.4, $p < 0.008$). Se concluyó que el 9% de los casos se asociaron a mutaciones significativas en los genes BRCA1 y 2. La etapa clínica fue un factor determinante para la mortalidad (Calderón- Garcidueñas, 2005).

En mujeres norteamericanas se identificaron alteraciones en BRCA1 en el 10% de mujeres con CM de inicio temprano y al igual que en otras poblaciones, las mutaciones no se limitaron a mujeres con historia familiar de CM o de ovario (Langston, 1996).

En conclusión, el mayor factor de riesgo para el cáncer de mama es una historia familiar positiva (Ruiz- Flores, 2001). En los casos de agregación familiar donde no se puede demostrar un patrón mendeliano, el desarrollo del CM se debe probablemente a mutaciones en genes de baja penetrancia y/ o a factores ambientales. El estudio de la genética del CM, incluyendo estos genes de susceptibilidad y la búsqueda de otros genes candidatos, requiere de saber si la población que se estudia es genéticamente homogénea. Si la población lo es, se simplifica el proceso de muestreo y se evitan sesgos debido a diversidades genéticas.

1.3. Marcadores y Polimorfismo Genético

1.3.1. Conceptos generales

Cuando se habla de la ocurrencia en una población de dos o más alelos para un

locus con frecuencias alélicas mayores que lo que podría ser mantenido por mutación, estamos hablando de un polimorfismo genético. Los polimorfismos proporcionan variación dentro de las especies. Se dice que un polimorfismo existe si el alelo más común para un locus tiene una frecuencia menor al 99%. Existen polimorfismos genéticos que son fácilmente detectables, a estos se les llama marcadores genéticos. Un marcador puede ser o no ser parte de un gen expresado. En general, los marcadores genéticos más valiosos son aquellos que son más polimórficos (Friedman , 1996).

Los marcadores genéticos han sido importantes herramientas en el estudio de la estructura genética de las poblaciones humanas. Al principio se utilizaron marcadores no moleculares (sistema ABO, etc.), posteriormente como consecuencia del desarrollo de las nuevas técnicas para analizar los loci altamente polimórficos o hipervariables (microsatélites y minisatélites), se han utilizado marcadores de DNA, que son amplificados por PCR y detectados por electroforesis (Helmuth, 1990).

1. 3. 2. Polimorfismos del DNA

Los polimorfismos en la estructura del DNA son la base de los análisis genéticos. Las primeras variantes de secuencia en el DNA humano que fueron analizadas fueron los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs), que son variaciones hereditarias en la secuencia del DNA que resultan en la ganancia o pérdida de un sitio reconocido por una enzima de restricción (por ejemplo, *EcoRI* o *TaqI*). Son transmitidos como características simples codominantes y han sido ampliamente usados en los estudios de ligamento y mapeo genético (Budowle, 2000).

Aproximadamente el 10% del genoma está compuesto por secuencias de DNA satélite (secuencias repetidas en tandem) que pueden ser utilizadas como marcadores genéticos. El DNA satélite se clasifica en dos categorías, dependiente del tamaño de la secuencia que se repite:

a) Microsatélites o polimorfismos de repeticiones cortas en tandem (STRs), también llamadas simples secuencias repetitivas (SSRs) tienen por lo general una longitud menor a 1 kb y se componen de unidades repetitivas en tandem de 2, 3, o 4 nucleótidos. Están presentes en el genoma humano en numerosas copias. Como las secciones del DNA a los lados de cada repetición tandem son diferentes, los loci repetitivos se pueden distinguir utilizando técnicas de PCR. Se transmiten como características codominantes simples (Budowle, 2000).

b) Minisatélites, son repeticiones en tandem que van de 1 a 30 kb de longitud, son más grandes y más complejas que los STRs. Cuando se presentan en un solo sitio en el genoma se dice que son sondas mono-locus, mientras que cuando se presentan repeticiones similares en muchos sitios diferentes del genoma se denominan sondas multi-locus. Se transmiten como características codominantes simples (Budowle, 2000).

Un tipo especial de minisatélite y RFLP son los polimorfismos en tandem de número variable (VNTRs); son secuencias minisatélites de DNA que pueden ser identificadas ya que estos marcadores presentan sitios reconocidos por enzimas de restricción (Budowle, 1996).

Otro tipo de polimorfismos utilizados en Genética de Poblaciones son los polimorfismos del DNA mitocondrial (Merriwether, 1995), DNA nuclear y del

cromosoma Y (Bianchi, 1998).

Los marcadores genéticos más valiosos son los más polimórficos (Friedman, 1996). Un marcador genético es una característica genética, hereditaria con alelos reconocibles de inmediato.

1. 3. 3. STR

1. 3. 3.1. Generalidades.

Los STRs (short tandem repeat) consisten en secuencias repetidas de 3-7 pares de bases. Estas repeticiones están bien distribuidas a todo lo largo el genoma humano, y son marcadores polimórficos fácilmente detectables mediante análisis con PCR. Los alelos de estos loci se pueden diferenciar por el número de copias de la secuencia repetida que se encuentran en el fragmento amplificado. El producto amplificado se separa por electroforesis y después se evidencian los fragmentos con detección fluorescente, radiactividad o tinción con plata.

La tipificación de STR es tolerante al uso de templados de DNA degradados en comparación con otros métodos de tipificación, dado que los productos de amplificación son menores de 400 pares de bases, mucho más pequeños que los que se utilizan para AMP-FLP o VNTRs (GenePrint SRT Systems 2004).

Existen estuches comerciales para análisis. Uno de ellos es el Silver STR III Triplex (Promega) que incluye el análisis de D16S539, D7S820 y D13S317 y que es en forma aislada el estuche de STR más validado en población hispana. El estuche analiza 9 alelos diferentes de cada locus con tamaños de 264-304 pb para D16S539, de 215-

247 pb para D7S820 y de 165-197 para D13S317 (GenePrint SRT Systems 2004).

1.3.3.2. Poder de discriminación.

La probabilidad de coincidencia entre dos individuos con el estuche Silver STR III Triplex de Promega, para afro-americanos, caucásicos e hispanoamericanos es de 1 en 1,152, 2,552 y 2,493, respectivamente (GenePrint SRT Systems 2004).

Una medida de discriminación que se usa a menudo en análisis de paternidad es el índice de paternidad (IP), que representa la probabilidad de paternidad dados los genotipos de la madre cuando se prueba un niño y el padre putativo. El índice de paternidad para el estuche mencionado para afro-americanos, caucásicos e hispanoamericanos es de 7.6, 7.7 y 14.1 respectivamente.

Un cálculo alternativo usado en análisis de paternidad es el poder de exclusión (PE) de que un individuo sea el padre biológico de un niño. Este PE para afro-americanos, caucásicos e hispanoamericanos es 0.877, 0.880 y 0.929 respectivamente (GenePrint SRT Systems 2004).

1.3.3.3. Información específica del locus.

El carácter polimórfico de los sitios STRs es el resultado de la variabilidad en el número de repeticiones en tandem de un alelo a otro. Se han descrito diferentes tipos de loci STRs, di- tri- y tetranucleótidos (Edwards, 1991). Actualmente, el análisis de los STRs es un método ampliamente utilizado para realizar la identificación de individuos (Kimpton, 1994).

La información condensada de los STRs empleados en este estudio se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Información del locus de cada uno de los marcadores estudiados.

Locus STR	Localización Cromosómica	Secuencia repetida 5'-3'	Tamaño del alelo (bases)	Tamaño del alelo (# repeticiones)
D7S820	7q11.21-22	AGAT	215-247	6,7,8,9,10,11,12,13,14
D13S317	13q22-q31	AGAT	165-197	7,8,9,10,11,12,13,14,15
D16S539	16q24-qter	AGAT	264-304	5,8,9,10,11,12,13,14,15

La amplificación (PCR) algunas veces genera artefactos que aparecen como bandas tenues por debajo de los alelos. Estos productos probablemente resultan de un proceso conocido como "slippage", deslizamiento o desdoblamiento, que ocurre en regiones que contienen STR. Una vez que se reconoce, no causa problemas de interpretación, sobre todo si se utiliza un control de DNA de alelo conocido (GenePrint SRT Systems 2004).

1.4. Planteamiento del Problema

La estructura biológica de toda población tiene dos componentes: la estructura genética y la estructura ecológica. Por lo general en el diseño de todo estudio se considera que el 100% de la población presenta homogeneidad genética. El aceptar este criterio puede propiciar que el investigador obtenga posibles sesgos en sus resultados ya que las ecuaciones en los campos de la ecología y epidemiología asumen homogeneidad

genética. En el campo de la genética de poblaciones se sabe que las poblaciones mexicanas tienen diferentes componentes ancestrales (caucásicos, amerindios y africanos) dependiendo de la región geográfica. Si bien en México ya se ha probado que existe homogeneidad genética en población abierta en el Noreste de México, es importante saber si esta homogeneidad se conserva en pacientes con patologías específicas como el cáncer de mama.

Este proyecto consta de dos fases: I. Descripción de la estructura ecológica de una muestra de la población Mestiza del Noreste de México y II. Descripción de la estructura genética de dicha población y comparación de la misma con la de población general.

1.5. Justificación

Tanto en el estudio epidemiológico como en el clínico del CM que afecta a las poblaciones mestizas mexicanas, es necesario primeramente realizar un estudio de la estructura genética y ecológica para conocer si existe homogeneidad genética.

De encontrarse homogeneidad genética y con el banco de DNA de estas muestras, nos daríamos a la tarea en el futuro, de buscar (en poblaciones urbanas y aisladas) nuevos genes candidatos o en la validación de algunos ya reportados en la literatura con los propósitos de realizar futuros estudios de Epidemiología Molecular, Medicina Genómica y Farmacogenómica en México.

Dado que en general, el noreste del país y en particular, las zonas urbanas y metropolitanas de Nuevo León han estado sometidas durante varias décadas a un fuerte proceso de inmigración, es necesario conocer si dicho proceso ha afectado su estructura genética y ecológica, mediante el uso de marcadores moleculares altamente

polimórficos.

1.6. Objetivos

El objetivo general de este estudio fue el conocer la estructura ecológica y genética de la población con CM en los estados del noreste de México y comparar esta estructura genética con aquella de la población general.

Dentro del presente proyecto de investigación, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Conocer la estructura genética de la población con cáncer de mama en una muestra de 115 pacientes mediante el uso de tres marcadores genéticos del tipo STR (Silver STR III Triplex, Promega) y compararla con la estructura genética de un estudio previo en población aleatoria en el Noreste de México (Cerdeña-Flores, 2002-b).
2. Describir las características ecológicas de las pacientes con CM de acuerdo a los siguientes parámetros: edad, estado civil, escolaridad, ocupación, zona de residencia, fertilidad, edad en que fue diagnosticada la enfermedad, tipo de tumor y etapa clínica y analizar el porcentaje de migración en función del lugar de nacimiento de los 4 abuelos.
3. Establecer con las muestras biológicas y la información clínica y para-clínica de las pacientes con CM, un banco de DNA.

1.7. Hipótesis

Mediante el uso de los marcadores moleculares no codificantes D16S539, D7S820

y D13S317, consideramos que la estructura genética de la población mestiza seleccionada con CM presenta homogeneidad genética con respecto a la población general.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2. 1. Tipo de Estudio

2.1.1. Estudio de homogeneidad genética

El estudio realizado fue retrospectivo, observacional, descriptivo y comparativo.

2.1.2. Estudio descriptivo de estructura ecológica

Este estudio fue retrospectivo, observacional y descriptivo.

2.2 Cálculo del Tamaño de Muestra

Chakraborty⁶⁸ utilizando la teoría de equilibrio mutación-derivada para el modelo de mutaciones alelo-infinito concluyó que para un promedio de heterocigocidad para un locus de

70% o mayor, una muestra de 100 por población deberá ser requerida para tener una adecuada información de la variación intra-poblacional. Para las poblaciones aleatorias del Noreste de México, por ejemplo, la heterocigocidad de los marcadores D16S539, D7S820 y D13S317 fueron de 0.7972, 0.8112 y 0.7902 respectivamente (Cerdeña-Flores, 2002-b), por lo tanto una muestra de 115 pacientes es adecuada para obtener la información requerida en los objetivos.

2.3. Universo de Trabajo

Se estudiaron 115 mujeres con Cáncer de Mama. Estas pacientes, casos nuevos de CM, acudieron al Hospital de Especialidades No 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Monterrey, Nuevo León México, en el año 2002. Los criterios de inclusión fueron: casos nuevos de CM, mujeres adultas, residentes por 10 años o más en el noreste de México que desearan participar voluntariamente en el estudio previa firma de carta de consentimiento informado (anexo 1), que pudieran contestar un cuestionario (anexo 2) y que donaran 5 mililitros de sangre venosa periférica.

2.4. Características de las pacientes

A cada paciente se le aplicó un cuestionario (ver anexo 2) donde se incluían datos sobre edad, lugar de residencia, ocupación, escolaridad, estado civil, antecedentes heredo-familiares para cáncer, antecedentes gineco-obstétricos y características de la enfermedad (etapa clínica, tipo histológico y tamaño tumoral). Los datos de este cuestionario se complementaron con los reportes médicos de la historia clínica de cada paciente.

2.5. Tratamiento estadístico

Se utilizaron los siguientes métodos:

1. Para el cálculo de las frecuencias alélicas, genotípicas y de equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el paquete DNATYPE (Reed, 1968).
2. La comparación de las distribuciones de las frecuencias alélicas y genotípicas entre las poblaciones con y sin CM para todos los marcadores se realizó mediante un análisis de tablas de contingencia (Estadístico G con 10,000 simulacros) para todos los marcadores (Cerdeira-Flores, 2002-b), (Cerdeira-Flores, 2002-c).
3. Cálculo del grado de variación genética mediante el programa NSTGST de Chakraborty (Chakraborty, 1984).
4. Cálculo de porcentaje de mezcla génica total (grado de contribución ancestral, española, indígena y africana) mediante el método de Elston para poblaciones trihíbridas

(Elston, 1971).

5. Comparación de las proporciones de mezcla génica mediante la prueba de Rao: X^2 para proporciones (Rao, 1973).

6. Cálculo de asociaciones no aleatorias entre los loci genéticos (número de loci heterocigóticos 0,1, 2, 3) mediante el método de Brown y Chakraborty (Brown, 1980), (Chakraborty, 1981).

7. Cálculo de estadísticos forenses: Poder de Discriminación (Jones,1972) (PD) , heterocigocidad, Poder de exclusión (PE), (Ohno, 1982) y Contenido de Información Polimórfica (PIC) mediante los métodos de Ohno y Jones.

2. 6. Técnicas empleadas

2. 6. 1. Extracción del DNA

Se realizó con la técnica de "Salting out" de Miller (Miller, 1988) de acuerdo a las instrucciones del autor. La integridad del DNA se revisó mediante corrimiento de la muestra en geles de agarosa al 0.8%, tinción con bromuro de etidio y observación en aparato de fotodocumentación fluorescente (gel-Doc) (anexo 3)

2. 6. 2. Amplificación de los STRs

El DNA obtenido se sometió a un proceso de PCR utilizando el estuche comercial Gene Print Silver STR III System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y siguiendo

las instrucciones del proveedor (GenePrint,2004). La mezcla de DNA y reactivos se amplificó en un Termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems). Se comprobó la amplificación de los alelos con corrimiento por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (anexo 4). Para la tipificación de los alelos, los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y se tiñeron con plata(GenePrint,2004). La identificación de cada una de las muestras se realizó mediante comparación visual con escaleras alélicas específicas para cada uno de los tres STRs. Las técnicas empleadas se describen a continuación.

2.6.2.1. Condiciones de optimización de la amplificación de STRs.

Los volúmenes de los componentes de la PCR para los STRs se siguió de acuerdo al protocolo sugerido por Promega, pero se ajustaron los volúmenes para obtener un volumen total de reacción de 15µl. El volumen de DNA en la reacción varió, ya que de acuerdo a su concentración era necesario ajustarlo para obtener 4ng de DNA por microlitro de reacción. Los volúmenes finales de reacción para 15 µl fueron : Buffer 10X 1.5µl, mezcla de iniciadores 1.5µl, Taq polimerasa 5U/ µl, 0.09 µl, BSA 100X, 0.24 µl, DNA 50 ng/ µl, 1.0 µl, agua MQ 10. 57 µl.

El programa de amplificación fue de 9 pasos: 1, 96 ° C x 2'; 2, 94 ° C x 1'; 3, 60 ° C x 1'; 4, 70 ° C x 1.5'; 5, ir 10 veces al paso 2; 6, 90 ° C x 1'; 7, 60 ° C x 1'; 8, 70 ° C x 1.5'; 9, 60 ° C x 30'.

Una vez obtenido el producto amplificado se somete a electroforesis. Los pasos a seguir se describen a continuación.

2.6.2.2. Gel de poliacrilamida: Preparación, corrimiento y teñido con plata.

2. 1. Preparación del gel de poliacrilamida.

1.- Ambos vidrios (15 x 35 cm) se tallan (con kimwipes) y etanol al 100% 4 veces, dejando pasar 5 minutos entre cada uno de los lavados.

2.- Al vidrio corto (el que tiene la muesca) se le aplican 3 μ l de Bindsilane (1 ml de *ácido acético-etanol + 3 μ l de BindSilane) que se esparcen uniformemente sobre el vidrio con ayuda de kimwipes.

3.- Se deja secar por una hora .

4.- Aplicar 3 lavados con etanol al 100 % dejando pasar 5 minutos entre cada uno. Se deja secar.

5.- Al vidrio largo se le aplican 1.5 ml de silmacote.

6.- Se deja secar por espacio de media hora.

7.- Quitar el exceso de silmacote lavando suavemente con 1.5 a 2 ml de agua MQ con ayuda de kimwipes. Se montan los vidrios con los separadores de 1 mm de grosor con ayuda de cinta adhesiva y pinzas de presión.

8.- Se prepara la solución del gel para un volumen de 50 ml (50 ml acrilamida al 6% + 800 μ l **persulfato 10% + 80 μ l TEMED).

9.- Se vacía esta solución entre los vidrios con ayuda de una jeringa, cuidando que no se formen burbujas.

10.- Se deja polimerizar por espacio de 15-30 minutos.

11.- Se quita la cinta de la parte inferior y se lleva a lavar a la llave de agua para quitar el exceso de acrilamida, aquí también se quita el peine.

12.- Se montan los vidrios en la cámara vertical con buffer TBE 0.5X.

13.- Ya montado el gel, se quita el exceso de acrilamida de los pozos con una pipeta.

*250 microlitros de ac. acético aforar a 50 ml con etanol al 95%

** persulfato al 10%

Soluciones de acrilamida:

Acrilamida-bis 40% (250 ml)

Acrilamida-----95 gr

Bis-acrilamida-----5 gr

Aforar a 250 ml con agua MQ

Acrilamida-bis 6% (300 ml)

Urea-----126.4 gr

Agua MQ-----145 ml

TBE 10X-----15 ml

Acrilamida 40%----45 ml

2.6.2.3. Preparación de muestras y corrimiento del gel.

1.-Es indispensable precorrer el gel antes de cargar las muestras. Condiciones de precorrimento: 2000 volts, 40 miliampers y 50 watts durante 40 minutos.

2.- En tubos de PCR se colocan de 0.5 a 1 μ l de muestra + la misma cantidad de colorante formamida.

3.- Antes de cargar las muestras es necesario desnaturalizarlas. Esto se realiza en un termociclador a 95° C por 5 minutos.

4.- En cuanto salgan las muestras del termociclador se ponen en hielo y se cargan inmediatamente con una puntilla delgada. Se carga todo el contenido de la muestra.

5.- Se ponen 1.5-1.8 μ l de la escalera alélica cada 4-5 muestras, además de un control ya tipificado.

6.- Condiciones de corrimiento: 2000 volts, 40 miliampers y 50 watts durante 1 hora.

7.- Transcurrido el tiempo de corrimiento se desmonta el gel y se pasa a teñir.

2.6.2.4. Tinción del gel con nitrato de plata.

El siguiente proceso es necesario realizarlo sobre una plancha de agitación.

Se desmonta el gel de la cámara de electroforesis:

Se quitan las cintas adhesivas de los lados del vidrio con mucho cuidado

Con ayuda de un separador se despegan suavemente los vidrios iniciando por la parte de superior y se continua hasta terminar en la parte inferior (es muy importante despegar adecuadamente, porque si se rompe el gel se pierde todo el trabajo anterior).

Se lleva al recipiente donde se encuentra la solución fijadora

1.- Se coloca el vidrio en la solución fijadora (ácido acético glacial al 10%) por 20 minutos.

2.- Se realizan 4 lavados del vidrio con agua destilada con una duración de 2 minutos cada una.

3.- Se pasa a la solución de tinción por 30 minutos.

4.- Se realiza un lavado con agua destilada por 10 segundos.

5.- Se pasa a la solución reveladora y se espera a que aparezcan las bandas, esto sucede aproximadamente en 3-4 minutos.

6.- Se fija y se detiene la tinción, vertiendo solución fijadora en la solución anterior (5 minutos).

7.- Se realizan dos lavados con agua destilada (de 2 minutos cada uno).

8.- Se deja secar al medio ambiente para leer hasta el siguiente día.

Solución de tinción:

Nitrato de plata ----- 1gr
Formaldehído al 37% ----- 1.5 ml
Agua destilada ----- 1 litro

Solución reveladora:

Carbonato de sodio ----- 30 gr
Agua destilada ----- 1 litro

Disolver lo anterior y enfriar en hielo por media hora. Inmediatamente antes de usarla agregar:

Tiosulfato de sodio 10 % ----- 200 μ l
Formaldehído 37% ----- 1.5 ml

Solución fijadora (Ac acético 10%)

Ácido acético glacial ----- 100ml
Agua MQ----- 900 ml

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3. 1. Características de la Población con CM

3.1.1. Características generales

Las características clínicas de la población estudiada se observan en la tabla 2. Es de destacar que la gran mayoría de las mujeres eran peri-menopáusicas con un promedio de 51 años y prácticamente el 70% estaba casada. Dado que el hospital donde se realizó el trabajo es de concentración para toda la zona noreste del país y que el IMSS atiende a un 70-80% del total de la población, en este trabajo se contó con pacientes de los diferentes

estados que conforman esta región geográfica del país. Como un reflejo del nivel educacional que prevalece en México, un 60% de las mujeres solo tuvieron una escolaridad máxima de primaria. Solo un 12% no habían tenido nunca hijos. Desafortunadamente el 90% de los casos llegaron a solicitar atención médica cuando la enfermedad estaba ya avanzada, con carcinomas invasores y tumores que en promedio midieron 5 cm.

Tabla 2. Características de las mujeres con CM en el noreste de México

Edad al diagnóstico (años)		51 ± 11
Estado civil		soltera 17.4 % casada 61.7 %
Estado de residencia		Nuevo León 43.12 % Coahuila 24.37 % San Luis Potosí 11.87 % Tamaulipas 9.37 % Otros 11.27 %
Escolaridad:		Primaria 56.5 % Secundaria 18.3 % Técnica-comercial 13.9 % Preparatoria 3.5 % Universitaria 6.1 %
Antecedentes gineco-obstétricos:		
Edad de la menarquia	13	± 2
Edad de la menopausia	47	± 5
Fertilidad	(# de gestas):	(# de abortos):

0	12.2 %	0	67.8 %
1-2	16.5 %	1	15.7 %
3-4	35.6 %	2	12.2 %
5-6	13.1 %	≥ 3	4.3 %
≥ 7	22.6 %		

Etapa clínica del CM	I	11 %
	IIA	16 %
	IIB	38 %
	IIIA	21 %
	IIIB	10 %
	IV	4 %

Tamaño tumoral (cm) 5.20± 1.56 (2.5-8)

Tipo histológico de tumor Lobulillar = 12 % Ductal = 88%

3.1.2. Características migratorias

Con respecto al lugar de origen de pacientes, padres y abuelos que nos habla de los fenómenos migratorios en el noreste de México, se analizó en función de 5 regiones (I-V) previamente establecidas en el trabajo de González- Quiroga (González- Quiroga, 2002) y col (figura 1).



Figura 1. Mapa de México con las 5 regiones migratorias.

Se observó que el porcentaje total de abuelos de Nuevo León fue del 29.35% y de otras zonas fue del 70.65%, que constituye el porcentaje de inmigración (tabla 3).

Tabla 3. Distribución por zonas geográfico-poblacionales de acuerdo al lugar de nacimiento de los 4 abuelos.

Zona	ABAM	ABOM	ABAP	ABOP	Total	%
I	30	31	37	37	135	29.35
II	63	60	53	53	229	49.78
III	8	9	9	10	36	7.83
IV	11	12	9	8	40	8.70
V	3	3	7	7	20	4.35

Zona: Zonas geográfico-poblacionales de México, ver texto y figura 1. ABAM: Abuela maternal; ABOM: Abuelo materno; ABAP: Abuela paterna; ABOP: Abuelo paterno.

3. 2. Análisis Genético

3.2.1. Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas de los locus STRs D7S820, D13S317 y D16S539 tanto para la población con CM como para la aleatoria estuvieron en equilibrio de Hardy - Weinberg y se muestran en las tablas 4-9.

Tabla 4. Frecuencias alélicas para el locus D7S820 observadas en 115 mujeres con CM.

Alelo	Número	Porcentaje	Banda sencilla
7	3	1.304	0
8	26	11.304	1
9	13	5.652	0
10	56	24.348	5
11	81	35.217	12
12	41	17.826	5
13	7	3.043	0
14	3	1.304	0
Total	230	100.00	23

Tabla 5. Frecuencias alélicas para el locus D7S820 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.

Alelo	P. CM	P. Aleatoria
7	3	4
8	26	24
9	13	26
10	56	83

11	81	80
12	41	57
13	7	11
14	3	1

P: población CM: Cáncer de mama

Chi cuadrada = 8.3287 p= 0.2980

G estadística = 8.4021 p= 0.3280

Tabla 6. Frecuencias alélicas para el locus D13S317 observadas en 115 mujeres con CM.

Alelo	Número	Porcentaje	Banda sencilla
8	13	5.652	0
9	51	22.174	2
10	22	9.565	1
11	40	17.391	4
12	72	31.304	9
13	20	8.696	2
14	12	5.217	0
Total	230	100.000	18

Tabla 7. Frecuencias alélicas para el locus D13S317 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.

Alelo	P. CM	P. Aleatoria
8	13	26
9	51	66
10	22	20
11	40	56
12	72	72
13	20	35
14	12	11

P: población CM: Cáncer de mama

Chi cuadrada = 7.1595 p= 0.2950

G estadística = 7.2166 p= 0.2980

Tabla 8. Frecuencias alélicas para el locus D16S539 observadas en 115 mujeres con CM.

Alelo	número	porcentaje	Banda sencilla
8	2	0.870	0
9	29	12.609	2
10	31	13.478	2
11	64	27.826	8

12	72	31.304	10
13	29	12.609	2
14	2	0.870	0
15	2	0.435	0
Total	230	100.00	24

Tabla 9. Frecuencias alélicas para el locus D16S539 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.

Alelo	P. CM	P. Aleatoria
8	2	1
9	29	28
10	31	56
11	64	91
12	72	77
13	29	28
14	2	5
15	1	0

P: población CM: Cáncer de mama

Chi cuadrada = 8.7344 p= 0.2580

G estadística = 9.1816 p= 0.3030

3.2.2. Frecuencias genotípicas

Las frecuencias genotípicas de los locus STRs D7S820, D13S317 y D16S539 tanto para la población con CM como para la aleatoria estuvieron en equilibrio de Hardy - Weinberg y se muestran en las tablas 10- 12.

Tabla 10. Frecuencias genotípicas para el locus D7S820 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.

Genotipo	P. CM	P. Aleatoria
7/8	0	1
7/10	1	2
7/11	1	1
7/12	1	0
8/8	1	1
8/9	2	3
8/10	8	9

8/11	12	5
8/12	1	4
8/13	1	0
9/9	0	1
9/10	3	7
9/11	7	9
9/12	1	4
9/13	0	1
10/10	5	9
10/11	18	22
10/12	12	20
10/13	2	5
10/14	2	0
11/11	12	12
11/12	15	17
11/13	3	2
11/14	1	0
12/12	5	4
12/13	1	3
12/14	0	1

P: población CM: Cáncer de mama
 Chi cuadrada = 21.4025 p= 0.7930
 G Estadística = 25.1464 p= 0.8250

Tabla 11. Frecuencias genotípicas para el locus D13S317 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.

Genotipo	P. CM	P. Aleatoria
8/8	0	2
8/9	5	5
8/10	2	4
8/11	1	6
8/12	3	4
8/13	1	1
8/14	1	2
9/9	2	11
9/10	5	1
9/11	9	12
9/12	17	18
9/13	8	5
9/14	3	3
10/10	1	0
10/11	2	6

10/12	10	5
10/13	1	4
11/11	4	5
11/12	15	12
11/13	2	5
11/14	3	5
12/12	9	9
12/13	4	14
12/14	5	1
13/13	2	3

P: población CM: Cáncer de mama

Chi cuadrada = 31.2090 p= 0.1160

G estadística = 34.1615 p= 0.1490

Tabla 12. Frecuencias genotípicas para el locus D16S539 en población con CM y población aleatoria del Noreste de México.

Genotipo	P. CM	P. Aleatoria
8/9	1	0
8/10	1	1
9/9	2	2
9/10	7	8
9/11	6	8
9/12	9	5
9/13	2	2
9/14	0	1
10/10	2	1
10/11	6	23
10/12	7	10
10/13	6	11
10/14	0	1
11/11	8	12
11/12	26	27
11/13	9	8
11/14	1	1
12/12	10	14
12/13	8	6

12/14	1	1
12/15	1	0
13/13	2	0
13/14	0	1

P: población CM: Cáncer de mama
 RXC 10, 000 simulaciones
 Chi cuadrada = 19.8188 p= 0.6270
 G estadística = 23.6092 p = 0.6760

3.2.3. Número de loci heterocigóticos

El número de loci heterocigóticos (NHL) para los tres marcadores en la población con CM y en la aleatoria se muestra en los cuadros 13-16. El 78% de las pacientes con CM era heterocigota para dos de los 3 marcadores analizados. La comparación entre la población con CM y la aleatoria no mostró diferencia significativa.

Tabla 13. Frecuencia de homocigotos y heterocigotos (esperados y observados) para el locus D7S820 en 115 mujeres con CM.

	Observados		Número de esperados y porcentaje	
	No.	%	Sesgado	No sesgado
Homocigoto	23	20.00	26.72 (23.23%)	26.33 (22.90%)
Heterocigoto	92	80.00	88.28 (76.77%)	88.67 (77.10%)
Chi-cuadrada			0.673760	0.546798
Grados de libertad			1	1
Probabilidad			0.411744	0.459629

Tabla 14. Frecuencia de homocigotos y heterocigotos (esperados y observados) para el locus D13S317 en 115 mujeres con CM.

	Observados		Número de esperados y porcentaje	
	No.	%	Sesgado	No sesgado
Homocigoto	18	15.65	23.00 (20.00%)	22.60 (19.65%)
Heterocigoto	97	84.35	92.00 (80.00%)	92.40 (80.35%)
Chi-cuadrada			1.360866	1.166510
Grados de libertad			1	1
Probabilidad			0.243387	0.280120

Tabla 15. Frecuencia de homocigotos y heterocigotos (esperados y observados) para el locus D16S539 en 115 mujeres con CM.

	Observados		Número de esperados y porcentaje	
	No.	%	Sesgado	No sesgado
Homocigoto	24	20.87	25.94 (22.56%)	25.55 (22.22%)
Heterocigoto	91	79.13	89.06 (77.78%)	89.45 (77.78%)
Chi-cuadrada			0.187184	0.120923
Grados de libertad			1	1
Probabilidad			0.665271	0.728036

Tabla 16. Número de loci heterocigóticos (NLH) en población con CM y aleatoria para los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539.

Población	NLH				Total
	0	1	2	3	

CM	0	14	37	64	115
Aleatoria	1	15	53	74	143
Total	1	29	90	138	258

RXC con 10,000 simulacros
 $p = 0.757840$; grados de libertad = 3

3.2.4. Estadística Forense

Los resultados de la estadística forense para la población analizada con CM y para la población aleatoria utilizando los marcadores, D7S820, D13S317 y D16S539 fueron:

- 1) Las h observadas (esperadas) fueron 0.77 (0.77), 0.80 (0.80) y 0.77 (0.77) para CM y 0.78 (0.78), 0.81 (0.81) y 0.76 (0.77) para la población general.
- 2) El PIC fue similar para ambas poblaciones.
- 3) Las PD fueron 0.91, 0.92 y 0.90 para CM y 0.91, 0.93 y 0.89, para la población general.
- 4) Las PEs fueron 0.55, 0.61 y 0.56 para CM y 0.57, 0.63 y 0.55, para la población general.

Los datos se observan en la tabla 17.

Tabla 17. Estadísticos forenses para los microsatélites D7S820, D13S317 y D16S539.

Estadísticos Forenses	Cáncer de mama (n = 115)	Aleatoria (n = 143)
Heterocigocidad	Observados	Observados
D7S820	Esperados	Esperados
D13S317	0.77 0.77	0.78 0.78
D16S539	0.80 0.80	0.81 0.81
	0.77 0.78	0.76 0.77
PIC		
D7S820	0.74	0.74
D13S317	0.77	0.79
D16S539	0.73	0.73

PD		
D7S820	0.91	0.91
D13S317	0.92	0.94
D16S539	0.90	0.90
PE		
D7S820	0.56	0.57
D13S317	0.61	0.63
D16S539	0.56	0.55
Combinada	0.92	0.93

Al comparar ambas poblaciones con la prueba estadística de Z para proporciones, no se encontraron diferencias significativas.

3.2.5. Contribuciones ancestrales (española, indígena y africana)

Los resultados obtenidos del modelo trihíbrido utilizado en esta investigación indicaron una contribución caucásica, indígena y africana de 32%, 59% y 9% en pacientes con CM y de 45%, 54% y 1% en población general, que es muy similar a la de los hispanos de ascendencia mexicana radicados en Texas (44%, 55% y 1%). Las comparaciones entre CM, población general e hispanos no mostraron diferencias significativas entre ellas pero si con la población de Honduras (24%, 59% y 17%) al aplicarse la prueba de Rao. Los datos se observan en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentaje de contribución española, amerindia y africana.

Población	Caucásica	Amerindia	Africana
Cáncer de mama	0.3199 ± 0.083265	0.589900 ± 0.059741	0.090200 ± 0.066594
Aleatoria ^a	0.450143 ± 0.077026	0.539990 ± 0.052395	0.009957 ± 0.062644
Hispanica ^b	0.440330	0.550299	0.009401

	± 0.066549	± 0.045420	± 0.052983
Honduras ^c	0.240299	0.589907	0.169794
	± 0.069476	± 0.058855	± 0.054752

^a Cerda-Flores RM, Budowle B, Jin L, Barton SA, Chakraborty R. Maximum loglikelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am J Hum Biol* 2002; 14: 429- 439.

^b Cerda-Flores RM, Barton SA, Hanis CL, Chakraborty R. Genetic variation by birth-cohorts in Mexican Americans of Starr County, Texas. *Amer. J. Hum. Biol.* 1994; 6:669-674.

^c Matamoros M, Silva S, García O. Population data on nine short tandem repeat loci and D1S80 in a sample from Honduras. *Forensic Science International* 2004; 141: 39-40.

3.2.6. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales explicó un 98% de la variabilidad ubicando a las poblaciones en un plano similar e intermedio a las poblaciones ancestrales caucásicas e indígenas y mínimamente a la africana (figura 2).

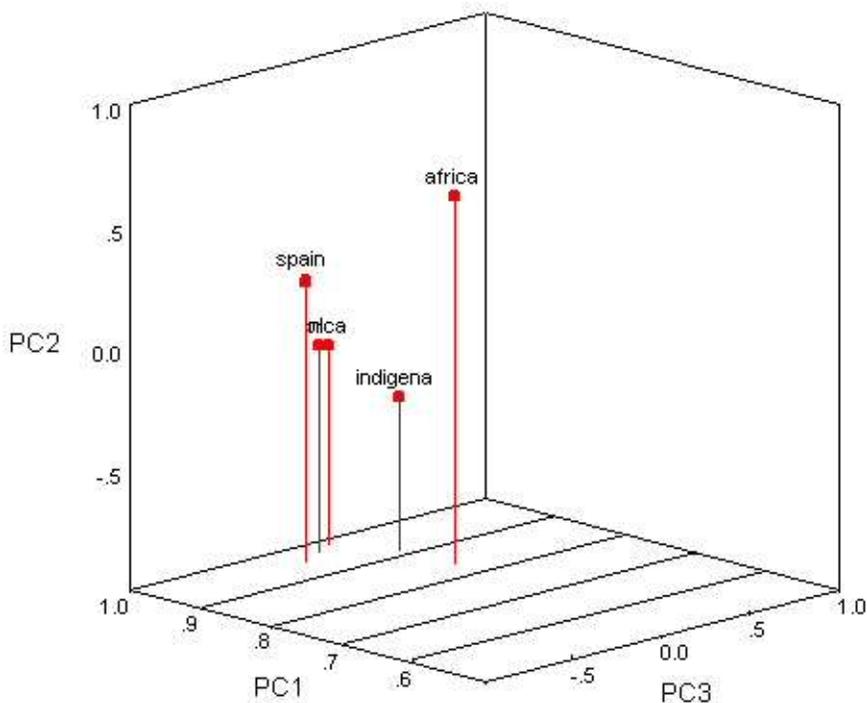


Figura 2. Análisis de componentes principales para poblaciones española, indígena, africana, mestiza mexicana y mestiza con cáncer de mama.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este es el primer estudio de homogeneidad genética en población mestiza mexicana con cáncer de mama, utilizando 3 STRs altamente polimórficos. En general, los estudios poblacionales realizados en los diferentes continentes se centran en población abierta (Chakraborty, 1995).

La población actual en México es resultado de un proceso inicial de mestizaje predominantemente entre mujeres indígenas americanas y hombres españoles; a este mestizaje contribuyeron posteriormente, en menor grado, esclavos negros africanos (Lisker, 1981). Cuando Hernán Cortez (Del Hoyo, 1979) arribó a nuestro actual país en 1519, acompañado de soldados españoles, la contribución española fue mayor y predominante; conforme la afluencia de españoles a través de los años se redujo, y la población mestiza se mezcló entre sí y con la población indígena remanente, la mezcla génica fue haciéndose más homogénea.

La población en México, salvo quizá algunos núcleos aislados enclavados en regiones geográficas poco accesibles, presenta una gran movilidad, propiciada sobre todo por la búsqueda de mejores condiciones de vida. De esta manera, se han creado polos de crecimiento que tienen sus representantes más importantes en las ciudades de Guadalajara, Monterrey y México, DF.

La estructura genética de una población se caracteriza por el número de subpoblaciones dentro de ella, la frecuencia de los diferentes alelos (variantes genéticas)

en cada subpoblación y el grado de aislamiento genético de las subpoblaciones (Chakraborty, 1986). Las poblaciones naturales casi siempre muestran diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de una región geográfica a otra (Chakraborty, 1992). La frecuencia alélica de un determinado alelo en un grupo de individuos es simplemente la proporción de todos los alelos del gen que son del tipo prescrito (Bowcock, 1991). La frecuencia de un alelo es igual al doble del número de homocigotos para el alelo más el número de heterocigotos para ese alelo dividido entre dos veces el número de individuos en la muestra. La importancia del concepto de alelo es que constituye el sustento del polimorfismo. Precisamente estudios como el realizado se basa en el concepto de genes polimórficos. Un gen polimórfico se define como aquel en el cual el alelo más común tiene una frecuencia de menos de 0.95. De aquí la importancia de calcular la heterocigocidad del marcador. La heterocigocidad nos indica la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomados al azar sean distintos y se calcula determinando el número total de individuos heterocigotos para cada gen y dividiendo esto por el número total de individuos de la muestra (Bowcock, 1991). En nuestro caso, todos los marcadores utilizados tuvieron una heterocigocidad individual superior a 0.77, lo que nos permite afirmar que efectivamente son polimórficos y por tanto útiles para identificar no solo individuos, sino poblaciones.

Los estudios poblaciones realizados hasta la fecha con marcadores moleculares y no moleculares han demostrado que la población actual del noreste, centro y occidente de México comparten un legado ancestral semejante y un perfil genético homogéneo (Cerde-

Flores, 2002-b); sin embargo, se requería corroborar que este perfil genético se mantenía incluso cuando se estudiaban poblaciones seleccionadas. Esto es muy importante, especialmente en patologías con factores genéticos que pueden conferir susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad, como es el caso del cáncer de mama (Jeffy, 2002), en donde es indispensable asegurarse de que la población es genéticamente homogénea para considerar como representativos de la población, los estudios en numerosos campos incluyendo el de los genes de susceptibilidad, farmacogenómica y epigenética (Jeffy, 2002), entre otros.

En este estudio se corroboró que esta homogeneidad persiste incluso cuando se estudian individuos seleccionados, siempre y cuando se utilicen marcadores moleculares no relacionados con la enfermedad, como es el caso de los 3 STRs utilizados en el estudio (GenePrint, 2004).

La contribución de las poblaciones ancestrales española, amerindia y africana en pacientes con cáncer de mama fue similar a la encontrada en población general en México. Estudios previos hechos en población abierta, utilizando diferentes marcadores como D1S80, HLA-DQA1 (Cerdeira-Flores, 2002-b), ApoB y por supuesto STRs mostraron que la contribución es similar a la encontrada en las pacientes con CM. Los resultados obtenidos del modelo trihíbrido utilizado en esta investigación indicaron una contribución caucásica, indígena y africana de 32%, 59% y 9% en pacientes con CM y de 45%, 54% y 1% en población general, que no muestra diferencia significativa, y que es muy similar a la de los hispanos de ascendencia mexicana radicados en Texas; sin

embargo, fue evidente una diferencia importante con la población mestiza de Honduras, sobre todo con respecto a la contribución ancestral africana, que le confiere a esa población un perfil genético diferente del nuestro, aún cuando ambas poblaciones son mestizas y latinoamericanas. Esto pone en evidencia que cada población tiene características genéticas propias y que si bien algunos conceptos pueden ser aplicados en general, muchos otros deberán ser estudiados y validados en cada población(Chakraborty, 1992).

La contribución de las poblaciones antecesoras en la población mestiza mexicana sirven para examinar la validez de las suposiciones de las asociaciones aleatorias dentro y entre los loci utilizados en el estudio. La población mestiza actual mexicana se encuentra a una distancia intermedia entre la contribución amerindia y la caucásica.

También se comprobó que la población de CM está en equilibrio de Hardy-Weinberg y que las frecuencias genotípicas observadas con respecto a las esperadas fueron semejantes. Este concepto es importante ya que asume que los patrones de apareamiento entre genes se realiza al azar y por tanto la probabilidad de que un individuo con unos alelos determinados para un gen dado se aparee con otro individuo con el mismo genotipo será igual a la frecuencia de dicho genotipo en la población. Se sabe que las frecuencias alélicas no cambian de generación en generación y por tanto en cualquiera de ellas la frecuencia genotípica será p^2 , $2pq$ y q^2 para AA, Aa y aa si nos referimos a dos alelos. Que la población estudiada esté en equilibrio de Hardy-Weinberg traduce una constancia de la frecuencia alélica y por tanto de la composición genotípica de dicha población, y que a menos que existan factores evolutivos específicos que fuercen a un

cambio en la frecuencia alélica, el mecanismo de herencia Mendeliana mantendrá la frecuencia alélica constante y preservará la variación genética (Bowcock, 1991).

Se considera que para obtener un perfil adecuado de un individuo y de una población, entre más marcadores genéticos se manejen, la confiabilidad del perfil será mayor. En este trabajo se utilizaron tres marcadores y los resultados fueron semejantes a los encontrados con 13 STRs(Cerda-Flores, 2002-b), y a su vez fueron similares a los obtenidos con marcadores genéticos no moleculares (Garza- Chapa, 1983). De hecho cuando se evaluaron los estadísticos forenses de estos tres marcadores (h, PE, PD y PIC) en la población con CM comparada con la población aleatoria se encontraron valores similares lo que nos indica que independientemente de la selección que se haga de una población, en este caso con CM, el uso de los marcadores STRs permitirá una identificación confiable del perfil del mestizo mexicano.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas fue semejante, lo que apoya que no hay diferencia entre la población de mujeres con CM y la población general y que la población mestiza mexicana se sitúa a una distancia génica intermedia entre sus dos principales contribuciones ancestrales, la española y la amerindia.

Perspectivas: El probar que existe homogeneidad genética en nuestra población incluso en subpoblaciones seleccionadas por patologías específicas es una información valiosa que nos permitirá en el campo de la investigación clínica y epidemiológica diseñar estudios con poblaciones de las diferentes zonas geográficas estudiadas, sabiendo que comparten un pool genético semejante, con lo que se facilita el muestreo poblacional. También validará los estudios genes de susceptibilidad, farmacogenómica y epigenética (Jeffy, 2002), entre otros.

REFERENCIAS

Bianchi NE, Catanesi CI, Bailliet G, Martínez- Marignac VL, Bravi CM, Vidal- Rioja LB, Herrera RJ, Lopez- Camelo JS. Characterization of ancestral and derived Y - Chromosoma haplotypes of New World Native populations. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1862- 1871.

Bowcock AM, Kidd JR, Mountain JL, Herbert JM, Corotenuto L, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL. Drift, admixture, and selection in human evolution; A study with DNA polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 839- 844.

Brewster DH, Stockton DL, Dobbie R, Bull D, Beral V. Risk of breast cancer after miscarriage or induced abortion: a Scottish record linkage case-control study. *J. Epidemiol Community Health* 2005; 59 (4): 283-287.

Brown AHD, Feldman MW, Nevo E. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 1980; 98:523-536.

Budowle B, Smith J, Moretti T, DiZinno J. DNA typing protocols: molecular biology and forensic analysis. Natick, MA: Eaton 2000:41-42.

Budowle B, Monson KL, Chakraborty R. Reestimating minimum allele frequencies for DNA profile frequency estimates for PCR-based loci. *Int J Leg Med*, 1996; 108: 173-176.

Budowle B, Baechtel S, Smerick JB, Presley KW, Giusti AM, Parsons G, Alevy MC, Chakraborty R. D1S80 population data in African Americans, Caucasians, Southeastern Hispanics, Southwestern Hispanics, and Orientals. *J Forensic Sci* 1995; 40 (1): 38-44.

.**Coon CS**. Las razas humanas actuales.1a. Ed. Ediciones Guadarrama, SA, Madrid 1969, España.

Cerda- Flores RM, Ramírez- Fernández E, Garza- Chapa R. Genetic admixture and distances between populations from Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, and their putative ancestral populations. Hum Biol 1987; 59: 31- 49.

Cerda- Flores RM, Garza-Chapa R. Variation in the gene frequencies of three generations of humans from Monterrey, Nuevo Leon, Mexico. Hum Biol 1989; 61: 249-61.

Cerda-Flores RM, Kshatriya GK, Barton SA, Leal-Garza CH, Garza-Chapa R, Schull WJ, Chakraborty R. Genetic structure of the populations migrating from San Luis Potosi and Zacatecas to Nuevo León in Mexico. Hum. Biol. 1991; 63:309-27.

Cerda-Flores RM, Barton SA, Hanis CL, Chakraborty R. Genetic variation by birth-cohorts in Mexican Americans of Starr County, Texas. Amer. J. Hum. Biol. 1994; 6:669-674.

Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI. Natural fertility in northeastern México. Genetic structure by birthyear and birthplace. Arch Med Res, México 2000; 31:520-525.

Cerda-Flores RM, Jin L, Barton SA, Chakraborty R. . Distribution of mtDNA data in Northeastern Mexico. Am J Hum Biol 2002 (a); 14: 257- 263.

Cerda-Flores RM, Budowle B, Jin L, Barton SA, Chakraborty R. Maximum loglikelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. Am J Hum Biol 2002 (b); 14: 429- 439.

Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldaña HA, Cortes-Prieto L,

Barajas LO, Rivas F, Carracedo A, Zhong Y, Barton SA, Chakraborty R. Genetic admixture in three Mexican mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1. *Am J Hum Biol* 2002 (c); 14: 429- 439.

Calderón Garcidueñas Ana, Parás- Barrientos Franklin Uriel, Cárdenas- Ibarra Lilia, González- Guerrero Juan Francisco, Villarreal-Ríos Enrique, Staines-Boone Tamara, Barrera- Saldaña Hugo Alberto. Risk Factors of breast cancer in Mexican women. *Salud Pública de México* 2000; 42(1): 26-33.

Calderón-Garcidueñas AL, Ruiz-Flores P, Cerda-Flores RM, Barrera-Saldaña HA. Clinical follow up of Mexican women with early onset of breast cancer and mutation in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Salud Pública Mex* 2005; 47 (2) 1-6.

Chakraborty R. Estimation of race admixture: a new method. *Am J Phys Anthropol* 1975; 42: 507- 511.

Chakraborty R, Weiss KM. Admixture as a tool for finding linked genes and detecting that difference from allelic association between loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9119- 9123.

Chakraborty R. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Hum. Biol* 1992; 64:141-159.

Chakraborty R. Detection of non-random association of alleles from the distribution of the number of heterozygous loci in a sample. *Genetics* 1984; 108:719-731.

Chakraborty R. The distribution of the number of heterozygous loci in natural populations. *Genetics* 1981; 98:461-466.

Chakraborty R. Gene admixture in human populations: models and predictions. *Yrbk.*

Phys Anthropol 1986; 29:1-10.

Chakraborty R, Deka R, Jun L, Ferrell RE. Allele sharing at six VNTR loci and genetic distances among three ethnically defined human population. Amer. J Hum Biol. 1992; 4: 387- 392.

Chlebowski RT, Chen Z, Anderson GL, Rohan T, Aragaki A, Lane D, Dolan NC, Paskett ED, McTiernan A, Hubbell FA, Adams-Campbell LL, Prentice R. Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. J Natl Cancer Inst. 2005; 97(6):439-48.

Clavel-Chapelon F, Thiebaut A, Kesse E, Sieri S, Palli D, Tumino R, et al. Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. JAMA 2005 ; 293 (2) : 183- 193.

De Leon Matsuda ML, Liede A, Kwan E, Mapua CA, Cutiongco EM, Tan A, Borg A, Narod SA. BRCA1 and BRCA2 mutations among breast cancer patients from the Philippines. Int J Cancer 2002; 98(4):596-603.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? J Cell Mol Med. 2005; 9 (1):208-221.

Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet 1991; 49: 746- 756.

Elston RC. 1971. The estimation of admixture in racial hybrids. Ann Hum Genet 35:9-17.

Forssten UM, Rutqvist LE, Ahlbom A, Feychting M. Occupational magnetic fields and female breast cancer: a case-control study using Swedish population registers and new exposure data. *Am J Epidemiol.* 2005;161(3):250-9.

Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR. *Genetics*. 2nd. Ed. Williams & Wilkins 1996, NY.

Fung TT, Hu FB, Holmes MD, Rosner BA, Hunter DJ, Colditz GA, Willett WC. Dietary patterns and the risk of postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer* 2005, Mar 8; (Epub ahead of print).

Garza- Chapa R. Genetic distances for ABO and Rh (D) blood groups in the state of Nuevo Leon, Mexico. *Soc Biol* 1983; 30: 24- 31.

GenePrint STR Systems (Silver Stain Detection).

www.promega.com/tbs/tmd004/tmd004.pdf

Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48:361-372.

Harvie M, Howell A, Vierkant RA, Kumar N, Cerhan JR, Kelemen LE, Folsom AR, Sellers TA. Association of gain and loss of weight before and after menopause with risk of postmenopausal breast cancer in the Iowa women's health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14 (3):656-61.

Helmuth R, Fieldes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C, Stoneking M, Schmill N, Klitz W, Higuchi R, Erlich H. HLA-DQA1 allele and genotype frequencies in various human populations, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet* 1990; 47:515-523.

Hernández Garza TL. Breve Historia de Nuevo León. 3a. Ed. Editorial Trillas 1973, México.

Holford TR, Roush GC, McKay LA. Trends in female breast cancer in Connecticut and the United States. *J Clin Epidemiol* 1991; 44 (1): 29-39.

Hoyo H del. Historia del Nuevo Reino de León (1577- 1723). 2nda. Ed. Editorial Libros de México, SA 1979, México.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática 2000. XII Censo general de población y vivienda. México, 2000. Demographic information: <http://www.inegi.gob.mx>.

Jacobs EJ, Thun MJ, Connell CJ, Rodriguez C, Henley SJ, Feigelson HS, Patel AV, Flanders WD, Calle EE. Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(1):261-4.

Jeffy BD, Chirnomas RB, Romagnolo DF. Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors. *Environ Mol Mutagen* 2002; 39(2-3):235-44

Jones DA. Blood sample: probability of discrimination. *J Forensic Sci Doc* 1972; 12: 355- 359.

Kimpton CP, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, Gill P. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Legal Med* 1994; 106: 302- 311.

Langston A, Malone K, Thompson J, Daling J, Ostrander A. BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med* 1996; 334: 137- 142.

Li W, Ray RM, Lampe JW, Lin MG, Gao DL, Wu C, et al. Dietary and other risk factors in women having fibrocystic breast conditions with and without concurrent breast cancer: A nested case-control study in Shanghai, China. *Int J Cancer* 2005; European publication ahead.

Lisker R. Estructura genética de la población mexicana: Aspectos médicos y antropológicos. Salvat Mexicana de Ediciones. México, 1981.

Liu Y, West SC. Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Res* 2002;4 (1):9-13.

Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(16):1215-23.

López-Carrillo L, Bravo-Alvarado J, Poblano-Verastegui O, Ortega-Altamirano D. Reproductive determinants of breast cancer in Mexican women. *Ann NY Acad Sci* 1997; 837: 537- 550.

Llort G, Munoz CY, Tuser MP, Guillermo IB, Lluch JR, Bale AE, Franco MA. Low frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain. *Hum Mut* 2002; 19 (3): 307.

Macera CA. Past recreational physical activity and risk of breast cancer. *Clin J Sport Med*. 2005; 15 (2): 115- 6.

Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. Distribution of the four founding lineages haplotypes in native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol* 1995; 98: 411- 430.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.

Montemayor- Hernández A. Historia de Monterrey. Asociación de Editores de Monterrey Ac, 1971, México.

Muti P. The role of endogenous hormones in the etiology and prevention of breast cancer: the epidemiological evidence. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1028:273-82.

Nagata C, Nagao Y, Shibuya C, Kashiki Y, Shimizu H. Urinary cadmium and serum levels of estrogens and androgens in postmenopausal Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14 (3):705-8.

Narod SA. Hormonal prevention of hereditary breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 200; 952:36-43.

Ohno Y, Sebetan JM, Akaishi S. A simple method of calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. *Forensic Sci Int* 1982; 19: 93- 98.

O'Malley BW, Tsai SY, Bagchi M, Weigel NL, Schrader WT, Tsai MF. Molecular Mechanism of action of a steroid hormone receptor. *Recent Prog Horm. Res*. 1991; 47: 1-26.

Osorio A, Barroso A, Martinez B, Cebrian A, San Roman JM, Lobo F, Robledo Benitez J. Molecular analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in 32 breast and/or

ovarian cancer Spanish families. Br J Cancer 2000; 82(7):1266-70.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from cancer in 1990. Int J Cancer 1999; 83 (1): 18-29.

Rabinovich JE. 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. México: CECSA.

Rao CR. 1973. Linear statistical inference and its applications, 2nd Ed. New York: John Wiley.

Reed TE, Schull WJ. A general maximum likelihood estimation program. Am J Hum Genet 1968; 20: 579- 580.

Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Departamento General de Estadística, Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1993 and 1998.

Roff DA, Bentzen P. The statistical analysis of mitochondria DNA polymorphisms: X^2 and the problem of small samples. Mol Biol Evol 1989; 6:539-545.

Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. Breast Cancer Res. 2005;7(1):21-32.

Ruiz-Flores P, Calderón-Garcidueñas AL, Barrera-Saldaña HA. Genética del cáncer de mama. BRCA1 y BRCA2: Los principales genes de predisposición a la enfermedad. La Revista de Investigación Clínica 2001; 53:46-64.

Sáenz- Faulhaber ME. El mestizaje en la integración de la población colonial. El poblamiento de México (una visión histórico-demográfica). Tomo II. El México colonial. Consejo Nacional de Población 1993, México.

Serrano-Sánchez C. Origen del hombre americano y perfil biológico de la población prehispánica de México. El poblamiento de México. (Una visión histórico-demográfica).

Tomo I. El México prehispánico. Consejo Nacional de Población, 1993, México.

Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 2000; 408(6811):429-32.

Stoll BA. Macronutrients supplements may reduce breast cancer risk: how, when and which? *Eur J Clin Nutr* 1997; 51 (9): 573- 577.

Tamakoshi K, Yatsuya H, Wakai K, Suzuki S, Nishio K, Lin Y, Niwa Y, Kondo T, Yamamoto A, Tokudome S, Toyoshima H, Tamakoshi A; JACC Study Group. Impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Japan: results of the JACC study. *Cancer Sci.* 2005; 96(1): 57-62.

Tereschenko IV, Basham VM, Ponder BA, Pharoah PD. BRCA1 and BRCA2 mutations in Russian familial breast cancer. *Hum Mutat* 2002; 19(2):184.

Thompson D, Kriebel D, Quinn MM, Wegman DH, Eisen EA. Occupational exposure to metalworking fluids and risk of breast cancer among female autoworkers. *Am J Ind Med.* 2005; 47(2):153-60.

Velasco MF. La migración ibérica y africana: características e impactos regionales. El poblamiento de México (Una visión histórico-demográfica). Tomo II. El México colonial. Consejo Nacional de Población 1993, México.

Viladiu P, Izquierdo A, de San José S, Bosch FX. A breast cancer case-control study in Girona, Spain. Endocrine, familial and lifestyle factors. *European J of Cancer Prevention* 1996; 5: 329- 335.

Vizcaya-Canales I. Composición étnica de la población de Nuevo León a la consumación de la Independencia. Anuario del CEH de la UANL. Humanitas 1969; 10: 447-450.

Wolpert N, Warner E, Seminsky MF, Futreal A, Narod SA. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in male breast cancer patients in Canada. Clin Breast Cancer 2000;1(1):57-63.

APENDICES

Anexo 1.

**Instituto Mexicano del Seguro Social
Clínica de Mama
UMAE 25 y Hospital de Gineco-Obstetricia No. 23
Monterrey, Nuevo León.**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente hago constar que estoy informada (o) de la realización del proyecto "Implementación de un banco de DNA y tejidos en pacientes con cáncer de mama" que servirá para realizar investigación científica en el campo de esta enfermedad.

Tengo conocimiento que mi participación es confidencial y que solamente bajo petición mía, por escrito, se podrá relacionar cualquier dato obtenido de dicha investigación con mi persona. Así mismo, podré en cualquier momento que lo considere conveniente y con requisición por escrito, darme de baja como donadora (or) y todo el material suministrado será destruido.

Mi participación en este proyecto incluye contestar a un cuestionario que he revisado, donar 10 ml. de sangre obtenida por punción de una vena periférica y en el caso pertinente autorizar a tomar una muestra de tejido del material mamario obtenido por el procedimiento quirúrgico terapéutico correspondiente, siempre y cuando no interfiera con el diagnóstico de la enfermedad.

He sido informada (o) que los resultados de las investigaciones serán de interés para la población en general y el campo médico en particular, pero no específicamente para mi persona.

Acepto participar en este proyecto de conformidad.

Fecha _____

Nombre _____

Firma _____

ANEXO 2.**Protocolo de homogeneidad genética. IMSS.**

Fecha _____ Cédula _____ Clínica/ hospital _____
 Nombre _____ Fecha nac _____
 Dirección _____ Años de residen _____
 Escolaridad _____ Edo. civil _____ Ocupación _____
 teléfono _____ casa: propia ___ rentada ___ prestada ___ Agua ___ drenaje _____
 Casa: # personas que habitan _____ # de recámaras _____
 Ocupación del esposo: _____

Parentesco	Edad	Lugar de nacimiento	vive	causa muerte	Historia de CA (edad al diagnos.)	Otras enfermedades
Control						
Madre						
Abuelo M.						
Abuela M.						
Padre						
Abuelo P.						
Abuela M.						

Hermanos: total ___ vivos: H ___ M ___ Muertos: H ___ M ___ Causa de muerte _____

Si alguno de sus hermanos tuvo cáncer, especifique de que tipo y a que edad: _____

Hijos total: ___ hombres: ___ edades: _____ mujeres: ___ edades: _____ Si alguno ha padecido cáncer? _____ ¿A que edad y de que tipo? _____

En su familia ¿ha habido algún otro familiar con cáncer? _____ ¿quién (parentesco), donde tuvo el cáncer, a qué edad? _____

Morfometría

Peso _____ Talla _____ IMC _____ Cintura _____ Cadera _____

Antecedentes gineco-obstétricos

IVSA _____ G _____ Abortos _____ Partos nls _____ Cesáreas _____ óbitos _____

edad al primer parto _____ edad a la primera lactación _____ Meses totales por hijo _____

Edad menopausia _____ Causa

menopausia _____

Uso de anticoncept: No ___ Si ___ Tipo (años de uso): DIU _____ Condón _____
 orales _____ inyectados _____ Otros _____

Fuma: No ___ Sí ___ # por día _____ # años _____ **Alcohol :** bebe (sí/no) ___ Tipo de bebida _____ cantidad / día _____ Años de consumo _____

Drogas. ¿Consume o consumió algún tipo de drogas, marihuana, cocaína, thinner,

cemento? No ___ Sí ___ ¿Qué tipo? _____ Cantidad _____
frecuencia del consumo _____

Exposición a tóxicos. En casa o en el trabajo ¿está expuesto a algún tóxico (insecticidas, gases anestésicos, gases de desecho industrial, pinturas, calor excesivo, etc)? No _____
Sí _____ Especifique tipo, horas de exposición diaria y tiempo de exposición en años _____

Exposición a radiaciones. ¿Trabaja al aire libre? no ___ sí ___ horario _____
¿qué hace? _____ ¿Qué tipo de protección usa
contra el sol? _____

¿Vive o trabaja a menos de 500 metros de torres de alta tensión o de transformadores
eléctricos? No ___ Sí ___ ¿Cuántos años tiene viviendo o trabajando ahí? _____

¿Cuántas horas diarias? _____

¿Está expuesto a algún tipo de radiación por causa laboral? No ___ Sí ___ Tipo _____
Tiempo de exposición _____

Alimentación

Tipo de alimento	Frec /semana	Frec / día	tipo (nombres de frutas/ verduras)	cantidad
Frutas				
Verduras				
Pan				
Tortillas				
Carne res				
Carne de puerco				
Carne de pollo				
Pescado				
Pastas				
Frijoles (legum)				
Leche/yogourt				
Salsas picantes				
Refrescos embot				
Huevos				
Café/ té negro				
Pastelillos				
Frituras				
Dulces				

Antecedentes personales patológicos (tipo y edad de presentación)

Enfermedades propias de la infancia: _____

Historia de traumatismos: _____

Enfermedades

infecciosas: _____

Enfermedades

venéreas: _____

Enfermedades crónico-degenerativas: _____

Historia de cirugías: _____
 Enfermedad ginecológica (mama, útero, ovarios) _____
 Otras enfermedades: _____
Exploración física: TA _____ FC _____ FR _____ T _____

TUMOR

Fecha de detección (mes, año) _____ Forma de detección _____
 Tiempo entre detección (si ésta fue hecha por la paciente) y acudir al médico _____
 Etapa clínica: _____ en base a T _____ N _____ M _____
 Tamaño del nódulo (dos dimensiones, cm) _____ Lado _____ Cuadrante _____
 Cambios en la piel _____
 Cambios en el pezón _____
 Número de ganglios linfáticos clínicamente afectados: _____
 Sitos de Metástasis _____
Hallazgos mamográficos: BIRAD _____ Lesión: Única o múltiple _____ Lado _____
 Cuadrante _____ Tamaño: _____ Micro-calcificaciones: únicas _____ Múltiples _____
 Observaciones: _____

Diagnóstico histopatológico:

BAAF: Fecha: _____ Hospital: _____ Número citología : _____
 Diagnóstico: _____
Biopsia por trucut: fecha: _____ Hospital _____ Número de biopsia _____
 Diagnóstico: _____ Tipo histológico _____
 In situ _____ Invasor _____ Mixto _____
 Diferenciación. Clasificación de Bloom-Richardson: _____
 Van Nuys _____

Inmunohistoquímica: Receptores estrogénicos _____ Receptores progesterona _____
 P53 _____ Ki67 _____ Her2neu _____

Procedimiento quirúrgico en Clínica de Mama: fecha _____

Tipo y número de quirúrgico:
 Biopsia con arpón _____
 Cuadrantectomía _____
 Cuadrantectomía con disección axilar _____
 MRM _____
 Mastectomía simple _____
 Otros: _____

Diagnóstico:

a. Lado: _____ Tamaño del tumor: _____ Cuadrante (s) _____
 Multicentricidad (# focos/ lesiones) _____ Distancia del lecho quirúrgico _____
 Bordes quirúrgicos (+/-) _____ Afectación cutánea /pezón _____
 b. Tipo histológico _____ In situ _____ Invasor _____ Ambos _____

c. Grado de diferenciación _____
 d. Invasión (1,2,3+): linfática _____ vascular: _____ perineural _____
 e. Carcinoma in situ: foco único _____ múltiple _____ Microcalcificaciones _____
 e. Patología acompañante (en caso de EFQ, especificar tipo) _____

g. Número de ganglios linfáticos resecados _____ Total con Metástasis _____
 Tipo de Metástasis (3): micro-metástasis _____ macro-metástasis _____
 h. Inmunohistoquímica: RE _____ RP _____ Ki67 _____ P53 _____ Her2neu _____

Plan de tratamiento general: _____

Quimioterapia: Pre _____ tipo _____ ciclos _____ Fecha inicio _____
 Post _____ tipo _____ ciclos _____ Fecha inicio _____

Tratamiento quirúrgico: Tipo _____ Fecha inicio _____

Radioterapia: Dosis _____ Gy Sesiones _____ Fecha inicio: _____

Hormonales: Tipo _____ Dosis _____ Fecha inicio: _____ Duración _____

Otros: _____

Resumen de
 Hallazgos _____

Diagnóstico: _____

Evolución

Fecha	Estado clínico	Tratamiento

ARBOL GENEALÓGICO.

REPÓRTE HISTOPATOLÓGICO EN PATOLOGÍA MAMARIA

No. referencia _____

Paciente: _____ Cédula _____ Edad _____

Diagnóstico clínico: _____

Tipo de espécimen: _____ Lado: _____

Observaciones: _____

1. Descripción macroscópica:**2. Relación de cortes:****3. Descripción microscópica (si se requiere):****4. Diagnóstico:**

A. Tipo de espécimen (BAAF, biopsia trucut, biopsia con arpón, tumorectomía, cuadrantectomía, mastectomía (tipo) c/ s disección axilar) y lado.

B. Tipo histológico de carcinoma (ductal y variantes, lobulillar, mixto).

C. Grado histológico, clasificación usada (grado histológico de Nottingham , Elston-Ellis modificado por Scarff-Bloom- Richarson/ van Nuys). Especificar # mitosis /10 CSF.

D. Tamaño del tumor (tres dimensiones)

E. Especificar si es invasor o in situ o ambos. Especificar si existe permeación vascular.

F. Número total de ganglios linfáticos resecados.

G. Número de ganglios con metástasis y la dimensión mayor de la metástasis más grande. Especificar si existe extensión extranodal del tumor.

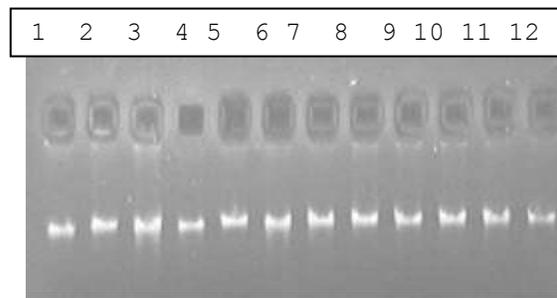
H. Receptores de estrógeno y progesterona (% de células positivas e intensidad +,++,+++). Especificar método y kit comercial usado.

I. Her2-neu (erbB-2), método y reactivo empleado. % de inmunopositividad en las células malignas invasivas. Definir el score.

J. P53 y Ki67 : % de positividad.

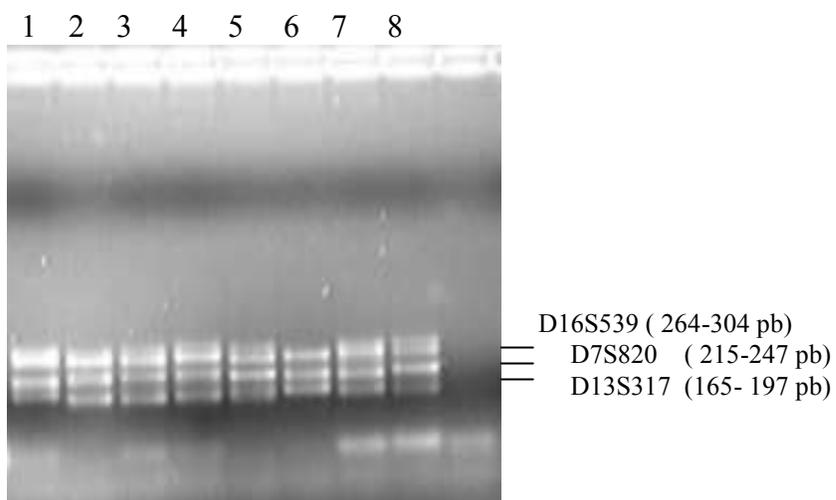
ANEXO 3.

Gel de agarosa al 0.8% con 12 muestras de DNA de pacientes con CM.



ANEXO 4.

Gel de agarosa al 2% que muestra los productos amplificados de los 3 STRs en 8 pacientes.



ANEXO 5.

Gel de poliacrilamida al 6% teñido con plata que muestra los diferentes alelos de los 3 STRs estudiados.

L: marcador alélico. Pacientes: 1- 4.



Anexo 6. Artículos publicados.

