



Facultad de Biología
Universidad de La Laguna

Estudio de SNPs asociados con susceptibilidad a cáncer
de mama en pacientes con cáncer de ovario

Study of SNPs associated with breast cancer susceptibility in patients
with ovarian cancer



Raquel García Toste

Grado en Biología

Julio, 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales

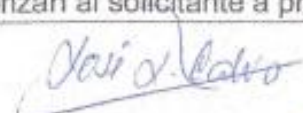
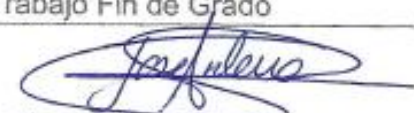
Nº DNI o pasaporte: 43380807R	Nombre y Apellidos: Raquel García Toste
Teléfono: 627684367	Dirección de correo electrónico: raket.tnf@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

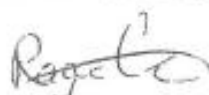
Estudio de SNPs asociados con susceptibilidad a cáncer de mama en pacientes con cáncer de ovario

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. José Julián Calvo Andrés	
Profesor/a del Departamento de Fisiología y Fisiopatología	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
	
Fdo.: José Julián Calvo Andrés	Fdo.: José Antonio Pérez Pérez

La Laguna, a 23 de Junio de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

ÍNDICE

1. Abstract	
2. Introducción.....	2
2.1: El cáncer. Epidemiología.....	2
2.2: Cáncer de ovario. Incidencia, tipos.....	3
2.3: Factores de riesgo del cáncer de ovario.....	3
2.3.1.: Edad	
2.3.2.: Antecedentes familiares	
2.3.3.: Obesidad	
2.3.4.: Endometriosis	
2.3.5.: Alteraciones genéticas	
2.3.6.: Cáncer de mama	
2.3.7.: Etnia	
2.3.8.: Antecedentes reproductivos	
2.3.9.: Hormonas	
2.4: Cáncer de ovario hereditario.....	6
2.4.1.: Prevalencia de las mutaciones en BRCA	
2.4.2.: Penetrancia de las mutaciones	
2.4.3.: Polimorfismos	
2.5.: Genes BRCA.....	9
2.5.1.: Estructura del gen y la proteína BRCA1	
2.5.2.: Estructura del gen y la proteína BRCA2	
2.5.3: Funciones de BRCA1 y BRCA2	
2.5.4: Polimorfismos de BRCA1	
2.6.: Polimorfismos en otros genes.....	14
2.6.1.: TP53	
2.6.2.: miR146	
2.6.3.: FGFR2	
2.6.4.: Región 8q24	

3.-Hipótesis de trabajo y objetivos.....	16
4.- Pacientes y métodos.....	16
4.1: Pacientes y controles en estudio.....	16
4.2: Discriminación alélica mediante sondas Taqman.....	17
4.3: Análisis estadístico.....	20
5.- Resultados.....	21
5.1: Detección de mutaciones patológicas en BRCA1 en pacientes con cáncer de ovario.....	21
5.2: Estudio de los SNPs de BRCA1.....	24
5.3: Estudio de SNPs de genes de susceptibilidad a cáncer de mama.....	26
5.4: Análisis de riesgo de los SNPs de FGFR2.....	26
6.- Discusión.....	27
7.- Conclusiones.....	28
8. –Referencias.....	29

1.- ABSTRACT

El cáncer es una enfermedad producida por una serie de cambios en el genoma resultado de la interacción entre factores exógenos y endógenos, cuyo efecto final es la transformación de las células normales en cancerígenas. El cáncer no se hereda, sin embargo, hay muchos estudios que demuestran que poseer mutaciones patogénicas o polimorfismos en ciertos genes de susceptibilidad puede elevar el riesgo a padecer algunos tipos de tumores, como el de mama o el de ovario. El objetivo de este trabajo es estudiar la frecuencia de las mutaciones patogénicas en BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer de ovario, así como analizar una serie de polimorfismos presentes en algunos de estos genes de susceptibilidad (BRCA1, TP53, MIR146 y región 8q24), comparando los datos de pacientes con cáncer de ovario frente a controles sanos. El estado de los polimorfismos se estudió mediante discriminación alélica por sondas Taqman, se agrupó toda la información en una base de datos y se realizó un análisis estadístico. Los resultados obtenidos fueron que más de la mitad de las pacientes no presentaba mutación en BRCA1 ni BRCA2, y que los polimorfismos en estado homocigoto presentes en BRCA1 y en FGFR2 aportan a los individuos que los presentan una ventaja de disminución del riesgo a padecer cáncer de ovario.

PALABRAS CLAVE: BRCA, cáncer, mutación, ovario, polimorfismo.

Cancer is a disease caused by a series of changes in the genome produced by the interaction between exogenous and endogenous factors, whose final effect is the transformation of normal cells into cancer cells. Cancer is not inherited, however, there are many studies showing that to possess pathogenic mutations or polymorphisms in certain susceptibility genes can raise the risk of developing some types of tumors, such as breast or ovarian. The objective of this work is study the frequency of pathogenic mutations in BRCA1 and BRCA2 in patients with ovarian cancer, as well as to analyze a series of polymorphisms present in some of these susceptibility genes (BRCA1, TP53, MIR146 and 8q24 region), comparing data from ovarian cancer patients with healthy controls. The state of the polymorphisms was studied by allelic discrimination by Taqman probes, all information is grouped in a database and a statistical analysis was performed. The results were that more than a half of patients had no mutation in BRCA1 or BRCA2, and that polymorphisms in homozygous state present in BRCA1 and in FGFR2 bring to the individuals who have an advantage of decreased risk of developing ovarian cancer.

KEYWORDS: BRCA, cancer, mutation, ovarian, polymorphisms.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1. El cáncer. Epidemiología.

El cáncer es una enfermedad producida por una serie de cambios en el genoma resultado de la interacción entre factores exógenos y endógenos, cuyo efecto final es la transformación de las células normales en cancerígenas. El cáncer es, por tanto, una enfermedad genética.

Se denominan carcinógenos a los agentes externos que originan mutaciones en el genoma. Dada la heterogeneidad de la población, la susceptibilidad al daño para una misma exposición es diferente entre los distintos individuos, jugando un papel muy importante en esta interacción la variabilidad genética.

Desde un enfoque biológico, las células cancerosas se caracterizan por presentar un crecimiento incontrolado, perder la diferenciación y tener capacidad de difundir invadiendo los tejidos vecinos originando metástasis³³.

Esta alteración es una de las causas de muerte principales en todo el mundo. En 2012 hubo 14 millones de casos nuevos y alrededor de 8 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad (informe mundial sobre el cáncer 2014, IARC: Internacional Agency for Research on Cancer). Además, se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. En cuanto al tipo de tumores los más frecuentemente diagnosticados para la población general en España en el año 2012 fueron el cáncer de colon (32.240 casos nuevos), seguido del cáncer de próstata (27.853 casos nuevos), pulmón (26.715 casos nuevos), mama (25.215 casos nuevos) y vejiga (13.789 casos nuevos), (figura 1). (Datos aportados por la Sociedad Española de Oncología Médica, SEOM).

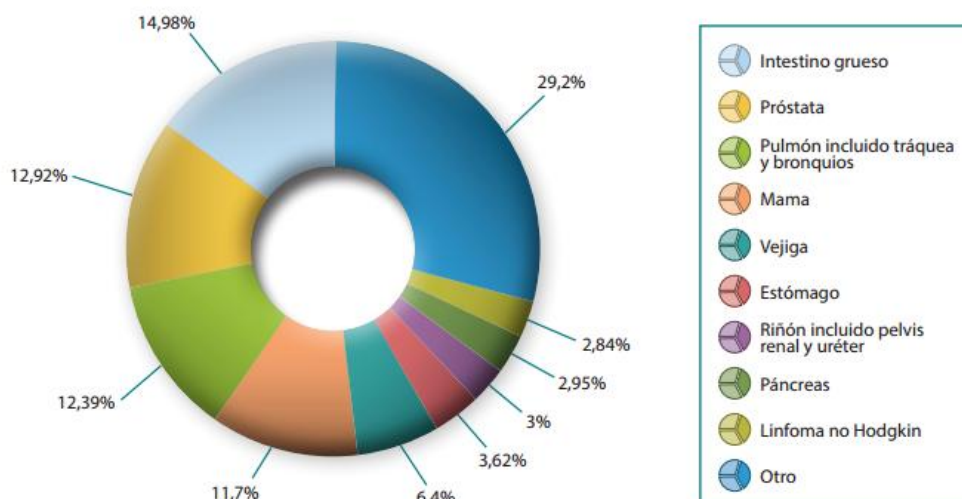


Figura 1: Incidencia de tumores en España en el año 2012. Los datos del proyecto fueron proporcionados por IARC a través del proyecto EUCAN. Gráfica elaborada por SEOM.

2.2.- Cáncer de ovario. Incidencia, tipos.

En España se diagnostican unos 3.300 casos de cáncer de ovario anuales (figura 2), lo que representa el 5,1% de los cánceres entre las mujeres, por detrás de los de mama, colorrectales, de endometrio y de pulmón. La incidencia en nuestro país se puede considerar alta, con un ascenso lento pero constante desde los años 60.

Es un tumor propio de las edades medias de la vida ya que la mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y los 75 años. Hay un número significativo de casos desde los 30 años y no es infrecuente diagnosticar tumores en jóvenes desde los 15.

Hay varios tipos histológicos de cáncer de ovario. Los más frecuentes son los carcinomas serosos (32%), los adenocarcinomas (20%) y los carcinomas mucinosos (12%). Los tumores germinales sólo representan el 2% de los tumores, pero son éstos precisamente los que se diagnostican en las más jóvenes, los que mejor responden a los tratamientos y por lo tanto, los que mejor supervivencia tienen. En países en vías de desarrollo, los tumores germinales representan hasta el 18-20% del total. (Datos aportados por la Asociación Española Contra el Cancer, AECC).

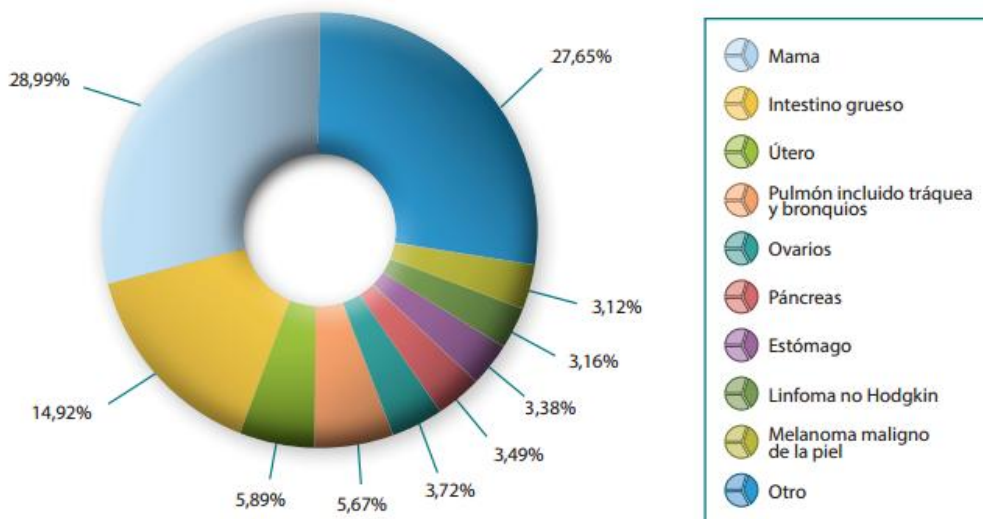


Figura 2: Incidencia en mujeres en España en 2012 por tipo de tumor. Los datos del proyecto fueron proporcionados por IARC a través del proyecto EUCAN. Gráfica elaborada por SEOM.

2.3.- Factores de riesgo del cáncer de ovario.

Si bien los factores de riesgo influyen con frecuencia en el desarrollo del cáncer, la mayoría no provoca cáncer de forma directa. Algunas personas con varios factores de riesgo nunca presentan cáncer, mientras que otras personas sin factores de riesgo conocidos sí lo hacen.

Los siguientes factores pueden elevar el riesgo de una mujer a presentar cáncer de ovario.

2.3.1. Edad:

El riesgo de una mujer de desarrollar cáncer de ovario aumenta con la edad. Las mujeres de todas las edades tienen riesgo de cáncer de ovario, pero las mujeres mayores de 50 años son más propensas a desarrollarlo. El 68% de las mujeres con cáncer de ovario son mayores de 55 años (el promedio es el diagnóstico a los 61 años).

2.3.2. Antecedentes familiares:

En las mujeres con un pariente de primer grado (madre, hija o hermana) con cáncer de ovario se triplica el riesgo a desarrollar la enfermedad, y ese riesgo aumenta junto con el número de familiares afectados. Además, el cáncer de mama, de próstata y de páncreas también elevan el peligro a padecer cáncer de ovario, ya que éstos están relacionados genéticamente:

Entre el 10% y el 15% de los cánceres de ovario se producen debido a una mutación genética que ha sido transmitida dentro de una familia (cáncer de ovario hereditario). Si bien es menos frecuente, es posible que el cáncer de ovario relacionado con el gen BRCA (*Breast cancer*) se desarrolle en mujeres que no tienen antecedentes familiares de cáncer de ovario ni de mama.

2.3.3. Obesidad:

Debido a la condición fisiológica que se produce en la obesidad, ésta constituye un factor de riesgo para diferentes patologías, entre las cuales se encuentran la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer. La obesidad se ha asociado con cánceres de origen ginecológico como el de mama y endometrio, pero con el cáncer de ovario la relación no es tan clara y existen diferentes estudios al respecto.

En un meta-análisis de mujeres pre-menopáusicas con sobrepeso (índice de masa corporal (IMC) entre 25 y 29 Kg/m²) se estableció un aumento del 16% de desarrollar cáncer de ovario, y el riesgo se elevó al 30% cuando eran obesas (IMC \geq 30 Kg/m²). Dicha asociación no se observa en mujeres post-menopáusicas. Además, también se observa que las mujeres con peso normal presentan una mayor supervivencia al cáncer de ovario⁴⁰.

Todo esto sucede porque una hormona secretada por el tejido adiposo (claramente relacionado con la obesidad), la leptina, genera dos efectos en el ovario: aumento de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis, lo que contribuiría al desarrollo del cáncer y, por lo tanto,

permite asociar a nivel molecular la obesidad y el desarrollo del cáncer de ovario. En relación con la adiponectina que secreta el tejido adiposo en mayor cantidad y que en obesos se encuentra disminuida, existen antecedentes que la relacionan con procesos moleculares de desarrollo de otros cánceres ginecológicos como el cáncer de mama y endometrio; sin embargo, no existen antecedentes que la asocien específicamente con el cáncer de ovario.

Por otro lado, en el tejido adiposo también se produce síntesis de estrógenos endógenos debido a la aromatización de andrógenos, proceso que permite asociar la obesidad con el cáncer de ovario, ya que los estrógenos producidos provocan un aumento en la proliferación celular de la superficie epitelial del ovario, que puede contribuir al desarrollo del cáncer de ovario en aquellos subgrupos de pacientes COE (cáncer de ovario epitelial) que expresan el receptor a estrógenos⁴⁰.

2.3.4. Endometriosis.

Esto es una afección que consiste en que el revestimiento interior del útero crece fuera de éste y afecta a otros órganos cercanos. Esto puede causar varios problemas, pero hay disponible tratamiento eficaz. La endometriosis puede aumentar el riesgo de ciertos tipos de cáncer de ovario que incluyen el cáncer endometriode de ovario o cáncer de ovario de células claras. Se sigue investigando si afecta a algún otro tipo.

2.3.5. Alteraciones genéticas.

Hay muchas otras alteraciones genéticas relacionadas con un mayor riesgo de cáncer de ovario. Algunas de las más frecuentes incluyen:

-Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC), causado por mutaciones en varios genes, aumenta el riesgo de cáncer de ovario y cáncer de útero, así como de otros entre los que se encuentran el colorrectal, el de estomago, el de hígado y posiblemente el de mama.

-Síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), causado por una mutación genética específica, se asocia con múltiples pólipos en el tracto digestivo que se convierten en tumores no cancerosos y con el aumento de pigmentación (manchas oscuras en la piel) en la cara y en las manos. Además de un mayor riesgo de cáncer de ovario, el PJS también aumenta el riesgo de cáncer de mama, de útero y de pulmón, pero es muy poco frecuente.

-Síndrome del carcinoma nevoide de células basales (NBCCS). Las mujeres con NBCCS, tienen un mayor riesgo de desarrollar fibromas, los cuales son tumores

fibrosos benignos de los ovarios. Existe un riesgo mínimo de que estos fibromas puedan convertirse en un tipo de cáncer de ovario llamado fibrosarcoma. Las personas con NBCCS a menudo tienen múltiples carcinomas basocelulares y quistes mandibulares, y pueden desarrollar meduloblastoma en la infancia.

2.3.6. Cáncer de mama.

Tener un diagnóstico de cáncer de mama aumenta el riesgo de cáncer de ovario, incluso cuando la prueba de mutación genética de *BRCA* es negativa.

2.3.7. Etnia.

Las mujeres de herencia norteamericana, europea del norte o judía ashkenazi tienen más riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Estadísticamente se ha comprobado que en estas poblaciones son más frecuentes las mutaciones en *BRCA*.

2.3.8. Antecedentes reproductivos.

Las mujeres que nunca tuvieron hijos, que presentan esterilidad sin razón aparente, que no tomaron píldoras anticonceptivas o que tuvieron su primer hijo después de los 30 años tienen un riesgo mayor de sufrir cáncer de ovario. Además, también las que iniciaron la menstruación antes de los 12 años de edad y/o atraviesan la menopausia más tarde en la vida.

2.3.9. Hormonas.

Las mujeres que han tomado la terapia de reemplazo hormonal (HRT) solo con estrógenos después de la menopausia, tienen un mayor riesgo de cáncer de ovario (los estrógenos aumentan la proliferación de las células del epitelio del ovario).

2.4.- Cáncer de ovario hereditario

Uno de los objetivos principales de la lucha contra el cáncer es la identificación de los genes implicados en el desarrollo tumoral. Las proteínas codificadas por estos genes normalmente regulan procesos claves, tan importantes como proliferación, diferenciación y muerte celular. También se relacionan con tumorigénesis las que intervienen en la reparación del DNA.

La gran mayoría de los cánceres de ovario son de tipo esporádico: ciertas células del ovario acumulan daños genéticos (por radiaciones, tabaco, alcohol, etc.) durante su vida que desembocan en la aparición del tumor.

Sólo el 5-10% de los cánceres de ovario son hereditarios (sobre todo los epiteliales serosos) y se han relacionado con la mutación de dos genes fundamentalmente: BRCA1 y BRCA2 (la mayoría con el primero), aunque también pueden influir mutaciones en los genes P53, PTEN, ATM, NBS1 y LKB1¹⁰.

Estos genes son genes supresores de tumores, es decir, transmiten continuamente señales de carácter negativo sobre la proliferación

celular y su inactivación provoca, por defecto, divisiones descontroladas. Heredar una copia dañada del gen aumenta la predisposición al cáncer, pero es necesaria otra mutación para inactivarlo completamente y que se inicie la transformación neoplásica⁶.

Por otra parte siguen un modelo de herencia autosómico dominante de alta penetrancia²⁸.

Para las portadoras de mutaciones patológicas en BRCA1 el riesgo a padecer cáncer de ovario comienza a elevarse a los 30 años y se estima que alcanza el 25 al 40%¹⁴. Por su parte, las mujeres que tienen mutaciones en BRCA2 el aumento del riesgo se valora en un 15-25%³¹. Sin embargo, sólo la mitad de los cánceres de mama-ovario hereditarios son debidos a mutaciones de BRCA, por tanto existen otros genes implicados y aún desconocidos, y no todas las pacientes con mutación de BRCA desarrollarán un cáncer de ovario. Además se han descrito más de 600 mutaciones y variantes alélicas en el gen BRCA1 y unas 450 para el BRCA2³⁸. La mayoría de las mutaciones consisten en pequeñas deleciones o inserciones cuya distribución se sitúa a lo largo de toda la secuencia genómica, no pudiéndose señalar puntos calientes o áreas de mayor concentración de las mismas, lo cual dificulta su detección.

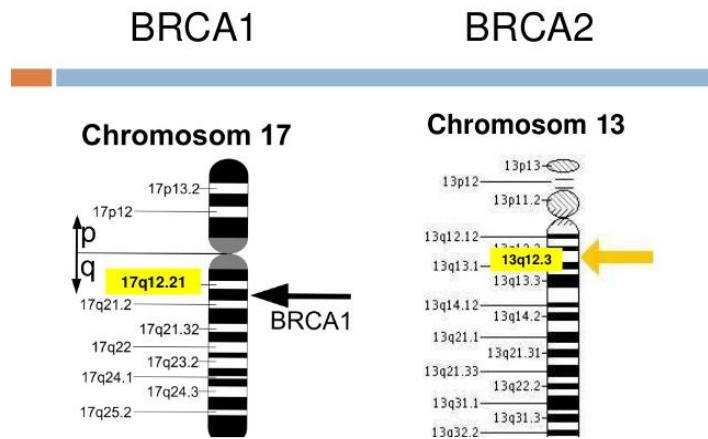


Figura 3: Localización genes BRCA1 y BRCA2

2.4.1: Prevalencia de las mutaciones en BRCA1

Varía dependiendo de la población de estudio. En la mayoría de poblaciones las mutaciones en los genes BRCA son muy raras, en torno al 0,3%³⁹.

Sin embargo, si elegimos una muestra compuesta por familiares con múltiples miembros afectados de cáncer de mama/ovario desde edades tempranas o pertenecientes a una etnia en la que existen mutaciones ancestrales (judíos Ashkenazi), la prevalencia de mutaciones BRCA puede ser alta. En el primer caso es donde encontramos una mayor prevalencia, estimándose un 52% de mutaciones BRCA1 y un 32% de BRCA2; en el segundo caso las mutaciones de BRCA1 son del 1,09% y de BRCA2 del 1,52%.

Existe una correlación positiva entre número de miembros de la familia afectos, edad más temprana al diagnóstico y frecuencia de la mutación²².

2.4.2: Penetrancia de las mutaciones

La penetrancia de un gen describe la probabilidad de que la característica visible que el gen controla –el fenotipo– se manifieste.

La penetrancia de los genes BRCA1 y 2 es menor del 100% (penetrancia incompleta); sin embargo, dependerá de las características de la población estudiada. Así, la incidencia de cánceres diagnosticados será mayor en portadoras de la mutación del gen que pertenecen a familias con múltiples casos que en aquellas portadoras no seleccionadas por su historia familiar. Ello es debido a que existen diversos factores que modulan la expresión de las mutaciones en los genes BRCA, tales como:

- Factores no genéticos: factores de riesgo que aumentan el riesgo de tener cáncer en la población general (factores ambientales, estilos de vida, obesidad, menarquia precoz, menopausia tardía...)

- Factores genéticos: polimorfismos en los genes BRCA o en otros genes, interacción de los genes BRCA con otros genes y el tipo y localización de las mutaciones.

Se han detectado diferencias significativas en el riesgo de cáncer de mama/ovario en función del tipo de mutación. Las mutaciones en el gen BRCA1 se relacionan con un riesgo más elevado de padecer cáncer de mama y ovario que las mutaciones en el gen BRCA2. También

influye la localización de las mutaciones (aquellas localizadas en el extremo 3' se relacionan con un mayor riesgo de cáncer de mama, y las localizadas en el extremo 5' con un mayor riesgo de cáncer de ovario).

Según series anglosajonas, la probabilidad de desarrollar cáncer a lo largo de la vida para los portadores de una mutación BRCA1 está en torno al 65% para el cáncer de mama y al 40% para el de ovario. El riesgo de presentar cáncer en portadoras de mutaciones en el gen BRCA2 está en torno al 45% para el cáncer de mama y al 11% para el de ovario²².

2.4.3: Polimorfismos

Un polimorfismo es una variación en la secuencia del DNA entre los individuos de una población. Aquellos que afectan a la secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos (por ejemplo, el color de los ojos). Aparecen cuando se producen mutaciones en algunos individuos que se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones (para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer en al menos el 1% de la población). Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silenciosos o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades. El análisis de los polimorfismos genéticos permite identificar genes que confieren susceptibilidad a presentar enfermedades.

Los polimorfismos que consisten en el cambio de un único nucleótido o base nitrogenada se conoce como SNP (de este tipo son todos los estudiados en este trabajo).

2.5. Genes BRCA

2.5.1. Estructura del gen y la proteína BRCA1

El gen BRCA1 ("breast cáncer 1") se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, más concretamente en la posición 17q21.31 (figura 3). Es un gen que contiene 81155 pares de bases y consta de 24 exones, de los cuales el primero y el cuarto no son codificantes¹⁰.

Al transcribirse da lugar a una molécula de RNA mensajero de 7191 pares de bases. A partir de este transcrito primario se han descrito distintas isoformas de la proteína BRCA1 que surgen por maduración alternativa. La mayoritaria, o forma completa (BRCA1a), tiene 1863

aminoácidos y un peso molecular de 207,72 kDa. A partir de ésta surgen isoformas más cortas que han perdido uno o varios exones y también existen isoformas completas que tienen un origen de transcripción distinto (NCBI geneID 672, NM_007294 y NP_009225; GENECARD referencia GC17M038450).

La proteína BRCA1 consta de distintos dominios funcionales que le permiten interactuar con otras proteínas y con el DNA (figura 4)²⁸.

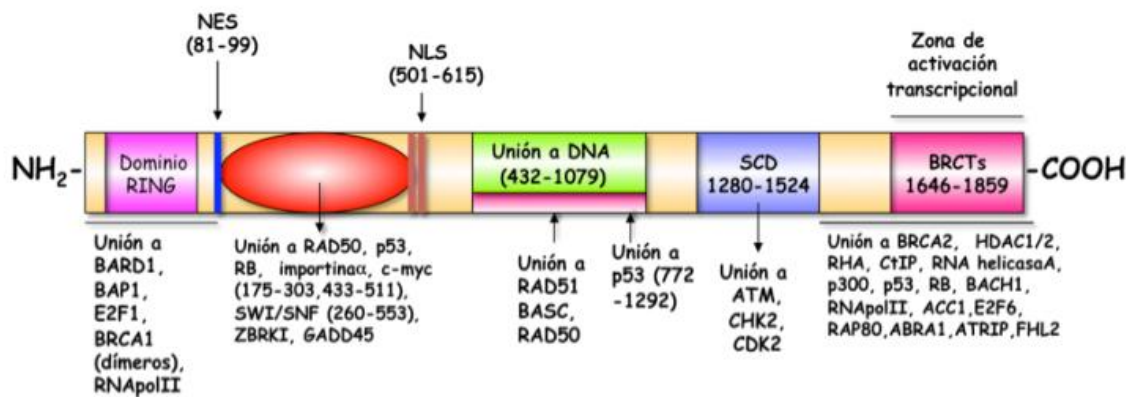


Figura 4: esquema de los dominios estructurales de BRCA1 y proteínas que se unen a los mismos. NLS: señal de localización nuclear; NES: señal de exportación nuclear.

2.5.2. Estructura del gen y la proteína BRCA2

El gen BRCA2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 13, en concreto en la posición 13q12.3 (figura 3). Es aún mayor que BRCA1: contiene 84193 pares de bases de región genómica y consta de 27 exones (de los cuales el primero no es codificante). El transcrito de RNA mensajero tiene 11386 pares de bases y al traducirse da lugar a una proteína de 3418 aminoácidos y 384,22 kDa de peso molecular¹⁰. Hasta la fecha no existen datos sobre isoformas de BRCA2 más cortas surgidas de la maduración alternativa de su mRNA (NCBI GeneID: 675, NM_000059, y NP_000050; GENECARD GC13P031787)²⁸.

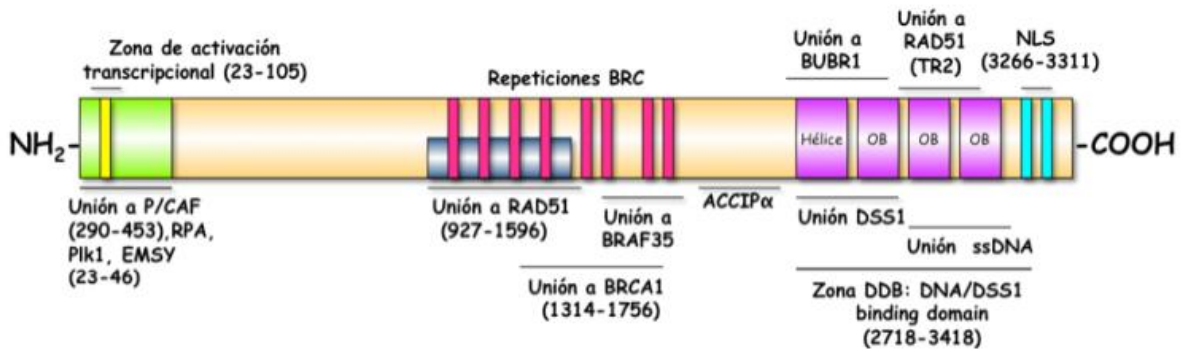


Figura 5: esquema de los dominios funcionales de BRCA2 y proteínas que se unen a los mismos.

Estas proteínas están involucradas en la respuesta al daño celular. La respuesta al daño del DNA implica la activación de mecanismos de control del ciclo celular que evitan la progresión del ciclo mientras se activan las rutas de reparación del daño. Dentro de los distintos daños que puede sufrir el DNA, BRCA1 y BRCA2 se encargan principalmente de la reparación de las roturas de doble cadena (DSB: Double Strand Breaks). Los mecanismos de reparación de estas roturas se pueden llevar a cabo mediante dos vías, la de la recombinación homóloga (HR) y la de la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Cualquiera de estas vías consta de tres tipos de moléculas: las sensoras, que son aquellas que reconocen el daño en el DNA; las efectoras, que son las que reparan el daño, y las mediadoras que facilitan la interacción entre las dos anteriores²⁹.

BRCA1 ejerce sus funciones mediante su capacidad de interactuar con otras proteínas. En este contexto, las interacciones establecidas a través del dominio RING con la proteína BARD1 parecen participar, por un lado, en la estabilidad de la misma y, por otro, en potenciar la capacidad ubiquitin ligasa del complejo. Muchas de las señalizaciones ejercidas por BRCA1 están mediadas por residuos de ubiquitina. Sin embargo, el dominio BRCT es el que define en cuál de sus múltiples funciones participará BRCA1 según cuál sea la proteína que esté unida a él. Mecanísticamente se conoce con más profundidad la función de BRCA1 en HR que en NHEJ.

BRCA1 forma parte de 4 macrocomplejos diferentes^{15, 27}: BRCA1A, BRCA1B, BRCA1C y BRCC (Figura 6).

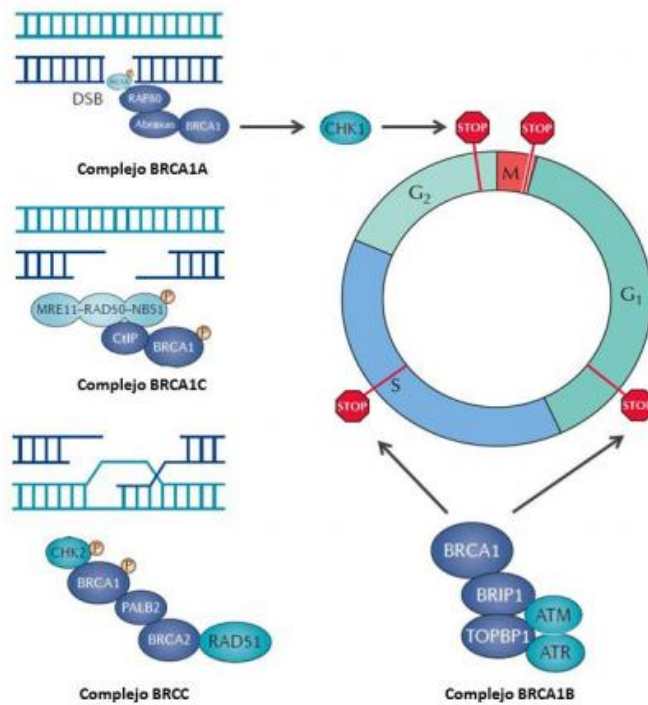


Figura 6: En respuesta a la generación de DSB, BRCA1 forma 4 complejos macromoleculares diferentes que participan en la regulación del ciclo celular y en la reparación del daño mediante recombinación homóloga.

-El complejo BRCA1A actúa como sensor del daño al DNA y adicionalmente regula el punto de control de ciclo celular G2/M.

-El complejo BRCA1B participa en los puntos de control del ciclo celular G1-S e intra-S, que aseguran la integridad genómica previo a la síntesis del DNA.

-El complejo BRCA1C media en la reparación del DNA mediante HR, facilitando la formación de DNA de cadena sencilla como paso previo a la HR.

-El complejo BRCC es capaz de reconocer el DNA de cadena sencilla formado previamente y mediar la invasión de la hebra homóloga. Se considera el efector en la recombinación homóloga.

Se han descrito funciones de BRCA1 adicionales a la reparación del DNA, como la capacidad de regular la expresión mediante la interacción con la RNA polimerasa II¹⁹ y la capacidad de remodelación de la cromatina mediante la interacción con el complejo SWI/SNF³ y con desacetilasas de histonas⁴⁶.

En comparación con BRCA1, que posee un papel central en la regulación de la recombinación homóloga, del ciclo celular y de otros procesos celulares, BRCA2 parece estar implicado principalmente y de una manera muy directa, en la recombinación homóloga. Especialmente interesante es la relación de BRCA2 con la ruta de anemia de Fanconi. La ruta de anemia de Fanconi se activa en respuesta a daño al DNA que induce la formación de enlaces covalentes intercatenarios (ICL). La ruta se compone de un “core” multiproteico que ejerce las funciones de sensor; el complejo ID, que ejerce de mediador y una serie de efectores que incluyen a la proteína BRCA2, denominada en este contexto FANCD1. Uno de los eventos más relevantes en la transmisión de señales es la ubiquitinación de la proteína FANCD2, llevada a cabo por la única proteína con actividad ubiquitin ligasa de esta ruta, FANL.

Los patrones de expresión de BRCA2 son dependientes del ciclo celular, observándose un pico de expresión en la fase G1/S⁴¹. Esta regulación depende de la expresión de la proteína ZAR2. Ambos genes aparecen adyacentes en el genoma y están regulados por un promotor bidireccional. Durante la fase G1, la expresión de ZAR2 es máxima. ZAR2 es transportada al núcleo, uniéndose posteriormente al promotor de BRCA2 silenciando su expresión²³. Aunque existe también un promotor bidireccional que regula la expresión del gen BRCA1³⁵, no se ha descrito para esta proteína funciones similares a las de ZAR2. De hecho, algunos autores han detectado regulación de la expresión de BRCA1 durante el ciclo¹¹ y otros no³⁰. La localización de estas proteínas también está regulada a lo largo del ciclo, a modo de ejemplo BRCA1 permanece en el citosol y en el inicio de la fase S es traslocada al interior del núcleo⁸.

2.5.4. Polimorfismos en BRCA1

Los estudios de asociación tienen una capacidad limitada para la identificación de las variantes genéticas causantes de la modificación del riesgo debido a la existencia de desequilibrios de ligamiento (LD) entre los SNPs próximos. Esto es particularmente cierto en el caso de BRCA1, localizado dentro de un gran bloque de LD de 390 Kb. En esa enorme región de LD se han localizado más de 120 SNPs, entre los cuales se encuentran los SNPs c.2731C>T (Pro971Leu; rs799917), c.3232A>G (Glu1038Gly; rs16941) y c.3667A>G (Lys1183Arg; rs16942) (nomenclatura según *Breast Cancer Information Core, BIC*).

Las tres variantes indicadas forman uno de los múltiples haplotipos existentes en BRCA1. La presencia de estas variantes *missense*, podría alterar la función o la estabilidad de la proteína BRCA1; sin embargo, ninguna de estas variantes está localizada en un dominio funcional.

2.6. Polimorfismos en otros genes

Elegimos estos genes porque otros estudios han demostrado su influencia en el riesgo de padecer cáncer de mama²⁸.

2.6.1. TP53

El gen supresor tumoral TP53 está localizado en el cromosoma 17p13.1 y codifica una proteína (p53) implicada en múltiples rutas celulares que controlan la proliferación celular, el ciclo celular, la apoptosis y la reparación del DNA. El gen TP53 es uno de los más extensamente estudiados, desde que su asociación con la tumorigénesis fue demostrada en 1979.

La expresión de este gen se activa en respuesta a diferentes señales de estrés, incluyendo el daño al DNA. Esta proteína puede inducir tanto muerte celular como parada del ciclo celular, de forma que la pérdida de función de TP53 suprime un mecanismo de protección frente a la acumulación de alteraciones genéticas^{26, 2}.

Entre los individuos portadores de mutaciones germinales en el gen TP53 la probabilidad de desarrollar cáncer es de aproximadamente el 50% a la edad de 30 años y de más del 90% a los 70 años²¹. Además es el gen más frecuentemente mutado de manera adquirida en los cánceres humanos.

2.6.2. miR146

Este gen transcribe un microRNA (miRNA) de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos. Cualquier desregulación de los miRNA podría conllevar problemas regulatorios en la célula, induciendo quizá fenotipos cancerosos. De hecho, se ha mostrado que los perfiles de expresión de los miRNA están modificados en un gran número de tipos de cáncer²⁰ y que la sobreexpresión forzada de los miRNA podría conducir al desarrollo de tumores¹³.

Existen estudios donde se comparan pacientes BRCA1 y BRCA2 negativos, enfermos de cáncer de ovario o de mama con antecedentes familiares, con personas sanas, estudiando el papel que podrían tener los miRNA, entre ellos miR146a. Los resultados obtenidos descartan la función de éstos como factores desencadenantes de la predisposición al cáncer, pero sugieren que miR146a podría repercutir en la edad de aparición de la enfermedad, ya que los sujetos con un genotipo poco frecuente (tanto heterocigoto, GC, como homocigoto, CC) de

miR146a desarrollaban tumores a edad más temprana en comparación con los que tenían genotipo salvaje (GG)²⁵.

Por otra parte en este gen se localiza el SNP rs2910164(G>C). Múltiples estudios muestran este polimorfismo como modificador del riesgo a padecer diversos tipos de cáncer. Portadores del alelo C presentan un riesgo incrementado de cáncer gástrico²⁴ y una disminución en el riesgo a cáncer de próstata⁴⁵; mientras que individuos homocigotos CC muestran una disminución en el riesgo de padecer cáncer papilar de tiroides¹⁷ y portadores del genotipo GG muestran incremento tanto del riesgo a desarrollar carcinoma hepatocelular⁴⁵ como de padecer carcinoma escamoso de esófago¹².

2.6.3. FGFR2

Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 (posición 10q26). Codifica una proteína llamada receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2. Es uno de los cuatro receptores de este tipo, que intervienen en importantes procesos como la división celular, la regulación del crecimiento celular y su maduración, formación de vasos sanguíneos, cicatrización o desarrollo embrionario. Es una proteína transmembrana que interacciona con factores de crecimiento específicos y recibe señales que ayudan a la célula a responder al ambiente. Hay varias isoformas ligeramente diferentes de la proteína FGFR2.

Las mutaciones de cambio de sentido (missense) de FGFR2 o el aumento de expresión de este gen están presentes en cáncer de endometrio, de pulmón, de mama, gástrico y ovario. Además, las mutaciones somáticas y los cambios de isoformas de FGFR2 inducen una aberrante señalización de activación de FGFR2 en células tumorales.

Por otra parte en el intrón 2 de este gen se encuentra el SNP rs2981582(C>T). Este polimorfismo aparece asociado al cáncer de mama en no portadores de mutación en los genes BRCA, modificando muy levemente el riesgo de padecer cáncer de mama, del 10% al 12-14%⁵ y asociado al cáncer de mama en individuos portadores de mutación en BRCA2, actuando multiplicativamente con ésta e incrementando el riesgo del individuo portador¹.

2.6.4. Región 8q24

El SNP rs13281615(A>G) está localizado en la región 8q24. Esta variante está implicada en el riesgo a desarrollar cáncer de mama, colorrectal y de próstata en diferentes grupos étnicos⁵.

^{37,42}. También se asocia al cáncer de mama bilateral con un riesgo relativo 1,21 veces superior al de la población no portadora³⁶. A pesar de esto múltiples estudios descartan esta variante como modificadora del riesgo, ya que no encuentran resultados significativos que permitan asociarla con el riesgo a padecer cáncer de mama, tanto en portadores de mutación BRCA1 como en BRCA2⁴.

3.- HIPÓTESIS DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

En muchos estudios se señala la implicación de las mutaciones de los genes BRCA en el riesgo de padecer cáncer de mama y ovario, así como la posible relación entre los polimorfismos en algunos de los genes anteriores y el riesgo a desarrollar cáncer de mama.

Por ello la hipótesis de nuestro trabajo es que los polimorfismos en los genes BRCA1 y BRCA2 o en genes de susceptibilidad al cáncer de mama pueden modificar el riesgo de cáncer de ovario.

En este estudio el objetivo principal es estudiar los polimorfismos de varios genes con el mayor o menor riesgo de padecer cáncer de ovario.

4.- PACIENTES Y MÉTODOS

4.1. Pacientes y controles

Se recogieron los datos de 117 pacientes con cáncer de ovario, todas de Ávila, Zamora, León o Salamanca entre el 2002 y el 2015, que habían sido estudiadas en la Unidad de Consejo Genético de Salamanca.

Los criterios que cumplen todas estas mujeres son, según la Junta de Castilla y León, los siguientes:

INDEPENDIENTEMENTE DE LA HISTORIA FAMILIAR

I: mujer con cáncer de mama y cáncer de ovario sincrónico o metacrónico

Ila: cáncer de mama con 35 años o menos.

Ilb: cáncer de mama con 40 años o menos en familias no informativas (menos de dos mujeres vivas hasta los 45 años en cada rama de la familia).

III: cáncer de mama bilateral (el primero pronosticado con cuarenta o menos).

IV: cáncer de mama triple negativo con 50 años o menos.

Va: cáncer de ovario epitelial de alto grado no mucinoso (o cáncer de trompas de Falopio o cáncer peritoneal)

CON DOS O MÁS CASOS DE FAMILIARES DE PRIMER GRADO CON UNA DE LAS SIGUIENTES CARACTERÍSTICAS:

Vb: cáncer de mama bilateral y otro caso de cáncer de mama menor de 50 años.

VI: cáncer de mama en varón.

VII: cáncer de mama y de ovario.

VIII: dos casos de BC diagnosticados antes de los 50.

CON TRES O MÁS CASOS (DOS EN PRIMER GRADO) DE CÁNCER DE MAMA Y/U OVARIO

-Por otra parte, para poder hacer un análisis estadístico estas 117 pacientes se compararon con 249 mujeres que no habían padecido ningún tipo de cáncer a lo largo de su vida. Los individuos control presentaban un amplio rango de edades.

Además es importante mencionar que, para llevar a cabo el estudio genético de estos individuos se extrajo el DNA genómico a partir de una muestra de sangre periférica de cada uno de ellos.

4.2 Discriminación alélica mediante sondas Taqman

Esta técnica se utilizó para el análisis de los SNPs de los diferentes genes de susceptibilidad al cáncer de ovario.

Los SNPs estudiados se resumen en la tabla 1.

Gen	SNP	Cambio
BRCA1	rs799917	g.41244936G>A/p.Pro871Leu
BRCA1	rs16941	g.41244435T>C/p.Glu1038Gly
BRCA1	rs16942	g.41244000T>C/p.Lys1183Arg
TP53	rs1042522	g.7579472G>C/p.Pro72Arg
FGFR2	rs2981582	g.123352317A>G
miR146	rs2910164	g.160485411C>G
Región 8q24	rs13281615	g.128355618A>G

Tabla 1: SNPs estudiados en este trabajo

En la PCR con sondas TaqMan o sondas de hidrólisis, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores utilizados para llevar a cabo la PCR con sondas TaqMan incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

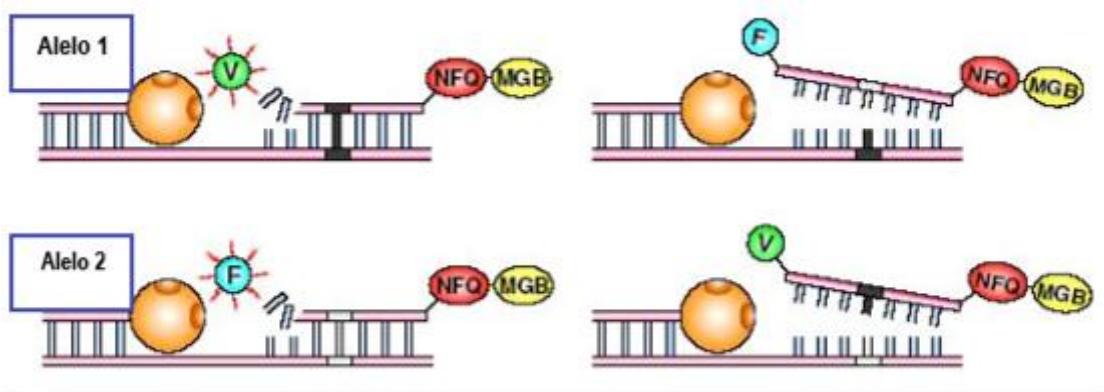
Para la discriminación alélica hemos empleado sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En todos nuestros ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqM an los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM (Tabla 2).

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la Taq Polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 7).

Fluorocromo	Máx λ_{exc} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
VIC	538	554
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460, 502	526, 650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480, 565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480, 565	613
Rojo Texas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849

Tabla 2: principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la reacción de PCR con sondas Taqman

Figura 7: Mecanismo de la reacción PCR con sondas TaqMan. La esfera naranja representa la Taq polimerasa. V: colorante VIC. F: colorante FAM.



El incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Esta técnica permitió analizar eficazmente la distribución de las variantes alélicas de los genes BRCA1, FGFR2, miR146 y de la región genómica 8q24 (Tabla 3) (Figura 8).

Gen/Región	Identificación	Sonda Applied Biosystem
BRCA1	rs16941	c_2287888_10
BRCA1	rs16942	c_2287889_20
BRCA1	rs799917	c_2287943_10
FGFR2	rs2981582	c_2917302_10
miR146	rs2910164	c_15946974_10
8q24	rs13281615	c_1332250_10

Tabla 3: Sondas de Applied Biosystem empleadas en la discriminación alélica de polimorfismos de baja penetrancia.

Nuestro estudio se realizó en el termociclador *StepOnePlus* de *Applied Biosystems* que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados⁶.

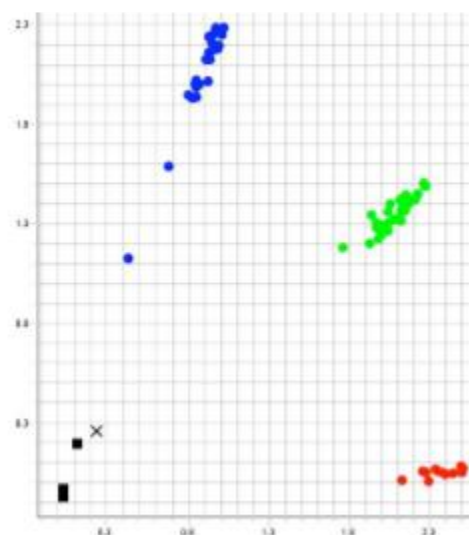


Figura 8: Discriminación alélica del polimorfismo C2731T (rs799917)

4.3.- Análisis estadístico

El estudio estadístico se llevó a cabo en el programa SPSS

Hemos analizado si existen relaciones entre pares de variables. En función del tipo de variable se utilizan distintos modelos de análisis estadísticos.

En nuestro caso las dos variables son cualitativas: por un lado el tipo (paciente o control) y por otro el valor de los propios polimorfismos en sí. Por ello el análisis que se lleva a cabo es a partir de las tablas de contingencia, con el test chi-cuadrado y el Fisher, de dónde extraemos el p-valor, y a partir de la regresión logística binaria, de donde obtenemos el odd ratio.

Estudiamos tanto las codominancias como las dominancias.

CODOMINANCIAS:

Estudiamos el homocigoto salvaje, el heterocigoto y el homocigoto mutado. Para obtener el p-valor realizamos las tablas cruzadas, relacionando el tipo (paciente o control) con los genotipos del polimorfismo. Obtuvimos una serie de tablas para cada polimorfismo. Consideramos que p-valor $<0,05$ es significativo. Si uno de los genotipos tiene una frecuencia menor del 5% tendríamos que coger el test de Fisher, en vez de Chi-Cuadrado.

DOMINANCIAS:

Las dominancias estudian la influencia que tienen ambos alelos, tanto normal como mutado, para el fenotipo de protección o de riesgo. Para obtener información de las dominancias (dominante y recesiva) realizamos una regresión logística binaria, obteniendo el odd-ratio, que es una medida que nos dice si un determinado polimorfismo ejerce riesgo o protección de padecer una enfermedad. El valor neutro es 1, es decir, un odd-ratio de 1 no nos va a dar ni protección ni riesgo. En cambio, un valor mayor que 1 indica que aumenta el riesgo y un valor menor que ejerce un efecto protector. Nuevamente el p-valor $<0,05$ indica que el resultado es significativo.

5.- RESULTADOS

5.1. Detección de mutaciones patológicas en BRCA1 en pacientes con cáncer de ovario.

En la tabla 4 se encuentran recogidos los datos de la frecuencia de las mutaciones patogénicas en los genes BRCA, así como de las que tienen significado desconocido, de un total de 117 pacientes con cáncer de ovario.

Como podemos observar es mucho mayor la frecuencia de mutaciones patogénicas en BRCA1 que en BRCA2 en este tipo de tumor, algo que ya se esperaba debido a estudios previos. No obstante, el 75% de los casos no presenta ninguna mutación, lo que implica la existencia de otro tipo de factores de riesgo.

	Número de pacientes	Frecuencia
Mutación patogénica en BRCA1	16	13.675%
Mutación patogénica en BRCA2	6	5.128%
Mutación patogénica en otros genes	1 (MSH2)	0.85%
Mutación de significado clínico desconocido (UV)	7	5.98%
Sin mutación	87	74.35%
Total	117	100%

5.

Tabla 4: Número de pacientes y estado de los genes BRCA1 y BRCA2

5.1.1. Mutaciones patogénicas en BRCA1:

La tabla 5 recoge las mutaciones patogénicas encontradas en BRCA1. Dos de ellas aparecen con mayor frecuencia en nuestros pacientes. Esto sugiere que posiblemente estos cambios genéticos se encuentren en mayor número de casos de cáncer de ovario que el resto de mutaciones en BRCA1.

Mutación	Localización	Número de pacientes	% (de mutaciones BRCA1)	% (del total de pacientes)
2636delCA/Stop850	Exón 11C	1	6.25	0.85
3450delCAAG/stop1115	Exón 11D	5	31.25	4.27
3335delA/Stop1080	Exón 11D	1	6.25	0.85
3324C>T/Q1069X	Exón 11D	1	6.25	0.85
1793delA/Stop571	Exón 11E	1	6.25	0.85
1806C>T, Q563X	Exón 11E	4	25	3.41
c.1731C>T/Q538X (nomenclatura HGVS)	Exón 11E	1	6.25	0.85
IVS20+1G>A	Intrón 20	1	6.25	0.85
Deleción no determinada	Exones 2-12	1	6.25	0.85

Tabla 5: Mutaciones patogénicas en BRCA1 (nomenclatura BIC) encontradas en nuestras pacientes

5.1.2. Mutaciones patogénicas en BRCA2

Existe una mutación en BRCA2 más frecuente que en el resto, pero con un total de apenas 6 mutaciones en BRCA2 esto no es significativo.

Mutación	Localización	Número de pacientes	% (de mutaciones en BRCA2)	% (del total de pacientes)
c.886delGT/stop223 (nomenclatura HGVS)	Exón 8	1	16.6	0.85
2041insA/Stop615	Exón 10E	1	16.6	0.85
3036delACAA stop958	Exón 11E	1	16.6	0.85
3817A>T/Lys1197Stop	Exón 11I	2	33.3	1.7
IVS15+1G>A	Intrón 15	1	16.6	0.85

Tabla 6: Mutaciones patogénicas en BRCA2 (nomenclatura BIC) encontradas en nuestras pacientes

5.1.3. Mutaciones de significado desconocido (UV)

En la tabla 7 están recogidas todas las mutaciones de significado desconocido encontradas en nuestros pacientes. Éstas están cada una en un único paciente de 117 en total, por lo que no les atribuimos un papel importante en el cáncer de ovario. Estas mutaciones a día de hoy siguen siendo de significado desconocido.

Gen	Mutación	Localización
BRCA1	2781C>T/H888Y	Exón 11
BRCA1	2640C>T/p.Arg841	Exón 11
BRCA1	c. 2662 C>T/ p.His888His (HGVS)	Exón 11
BRCA1	5236G>C/p.Gly1706Ala	Exón 18
BRCA2	2999A>T/N924I	Exón 11
BRCA2	c. 1046 A>G / p. I3412V (HGVS).	Exón 13
BRCA2	7625C>T/A2466V	Exón 14

Tabla 7: Mutaciones de significado clínico desconocido encontradas en nuestras pacientes

5.2. Estudio de los SNPs de BRCA1

En la tabla 8 se observa una diferencia significativa entre pacientes y controles en las frecuencias del genotipo homocigoto mutado, en los tres SNPs. Los controles sanos presentan ese genotipo con más frecuencia que los enfermos. Además como el p-valor en los tres casos es menor de 0.05 podemos afirmar que los resultados son significativos.

SNP	Genotipo	Pacientes		Controles		P-valor
		N	%	N	%	
BRCA1 (rs799917)	CC	63	53.8	111	44.8	0,016
	CT	48	41	99	39.9	
	TT	6	5.1	38	15.3	
BRCA1 (rs16941)	AA	63	53.8	124	50	0.011
	AG	50	42.7	92	37.1	
	GG	4	3.4	32	12.9	
BRCA1 (rs16942)	AA	59	53.6	122	49.2	0.008
	AG	48	43.6	95	38.3	
	GG	3	2.7	31	12.5	

Tabla 8: Estudio de los SNPs de BRCA1.

Ante esto realizamos un análisis de riesgo, que sirve para extraer el valor de Odd ratio, que nos indica si, tanto los genotipos de los diferentes SNPs como los alelos por separado (el dominante y el recesivo), ejercen un efecto de protección o un aumento del riesgo de padecer la enfermedad. En la tabla 9 se presentan los resultados significativos:

En el SNPs rs799917 el genotipo TT (homocigoto mutado, el menos frecuente en la población)→Odd ratio menor que 1→ ejerce un efecto protector de la enfermedad. A su vez al analizar los alelos por separado vemos un p-valor menor de 0.05 y un Odd-ratio mayor de 1, que nos sugiere que el alelo C o salvaje aumenta el riesgo de padecer la enfermedad.

En el SNPs rs16941 el genotipo GG (homocigoto mutado), con un Odd ratio menor que 1 y un p-valor menor de 0.05, ejerce un efecto protector de la enfermedad. En cuanto a los alelos también el alelo salvaje (A) eleva el riesgo de padecer el cáncer de ovario.

En el SNPs rs16942 el genotipo GG (homocigoto mutado), con un Odd ratio menor que 1 y un p-valor menor de 0.05, ejerce un efecto protector de la enfermedad. En cuanto a los alelos también el alelo salvaje (A) eleva el riesgo de padecer el cáncer de ovario.

SNP	Genotipo	Pacientes		Controles		Odd ratio (CI=95%)	P-valor
		N	%	N	%		
BRCA1 (rs799917)	CC	63	53.8	111	44.8		
	CT	48	41	99	39.9		
	TT	6	5.1	38	15.3	0.278 (0.111-0.694)	0.006
Recesivo	CT+CC	111	94.9	210	84.7	3.348 (1.373-8.162)	0.008
	TT	6	5.1	38	15.3		
Dominante	CC	63	53.8	111	44.8		
	TT+CT	54	46.2	137	55.2		
BRCA1 (rs16941)	AA	63	53.8	124	50		
	AG	50	42.7	92	37.1		
	GG	4	3.4	32	12.9	0.246 (0.083-0.726)	0.011
Recesivo	AG+AA	113	96.6	216	87.1	4.185 (1.444-12.129)	0.008
	GG	4	3.4	32	12.9		
Dominante	AA	63	53.8	124	50		
	AG+GG	54	46.2	124	50		
BRCA1 (rs16942)	AA	59	53.6	122	49.2		
	AG	48	43.6	95	38.3		
	GG	3	2.7	31	12.5	0.2 (0.056-0.681)	0.010
Recesivo	AG+AA	107	97.3	217	87.5	5.095 (1.523-17.044)	0.008
	GG	3	2.7	31	12.5		
Dominante	AA	59	53.6	122	49.2		
	AG+GG	51	46.4	126	50.8		

Tabla 9: Resultados significativos del análisis de riesgo de los SNPs de BRCA1

5.4. Estudio de los SNPs de genes de susceptibilidad a cáncer de mama.

En este caso observamos que no existe una diferencia significativa entre pacientes y controles ni en el polimorfismo de TP53, ni en el de la región de 8q24 ni en el de MIR164. Sin embargo, en el SNPs de FGFR2 (rs2981582) se aprecia una disminución del genotipo TT (homocigoto mutado) en los pacientes enfermos con respecto a los controles sanos. Como el p-valor es menor de 0.05 podríamos confirmar que estos resultados son significativos.

Por ello realizamos el análisis de riesgo del SNP de FGFR2.

SNP	Genotipo	Pacientes		Controles		P-valor
		N	%	N	%	
TP53 (rs1042522)	GG	70	60.9	137	55.2	0.611
	CG	41	35.7	102	41.1	
	CC	4	3.5	9	3.6	
FGFR2 (rs2981582)	CC	36	32.4	51	20.6	0.009
	CT	56	50.5	122	49.2	
	TT	19	17.1	75	30.2	
8q24 (rs13281615)	AA	41	35	79	31.9	0.343
	AG	61	52.1	122	49.2	
	GG	15	12.8	47	19	
MIR164 (rs2910164)	GG	66	56.9	127	51.2	0.598
	GC	42	36.2	102	41.1	
	CC	8	6.9	19	7.7	

Tabla 10: estudio de los SNPs de genes de susceptibilidad al cáncer de mama

5.5. Análisis de riesgo del SNP de FGFR2

La tabla 11 nos sugiere, primero, que tanto el genotipo CC como el TT influyen sobre el riesgo de cáncer de ovario, al igual que al analizar las dominancias. Sin embargo, al estudiar los dos alelos por separado, comprobamos que es el alelo T (menos frecuente) el que ejerce un efecto de protección a padecer la enfermedad.

SNP	Genotipo	Pacientes		Controles		Odd ratio (CI=95%)	P-valor
		N	%	N	%		
FGFR2 (rs2981582)	CC	36	32.4	51	20.6		0.01
	CT	56	50.5	122	49.2		
	TT	19	17.1	75	30.2	0.359 (0.186-0.694)	0.002
Recesivo	CT+CC	92	82.9	173	69.8	0.476 (0.271-0.837)	0.01
	TT	19	17.1	75	30.2		
Dominante	CC	36	32.4	51	20.6		
	TT+CT	75	67.6	197	79.4	0.539 (0.326-0.892)	0.016
Alelos	C	128	57.7	214	44		
	T	94	42.3	272	56	0.578 (0.419-0.796)	0.001

Tabla 11: análisis de riesgo del SNP del gen FGFR2

6.- Discusión

Con la excepción de rs13281615 en el cromosoma 8q24, los otros SNPs no han sido estudiados previamente en relación con el cáncer de ovario.

Los resultados obtenidos en los tres SNPs de BRCA1 son llamativos debido a que aparece un efecto protector a padecer cáncer de ovario en los genotipos menos frecuentes de la población, así como un aumento del riesgo por la presencia del alelo salvaje, mientras que en estudios similares en cáncer de mama no ocurre lo mismo. Según la tesis de Daniel Fernández García⁶, de los tres SNPs de BRCA1 estudiados sólo rs799917 presenta diferencias significativas entre genotipos de controles y pacientes. Al hacer el análisis de riesgo de este SNP, se obtuvo que el genotipo TT, menos frecuente en la población, aumenta el riesgo a padecer cáncer de mama, lo contrario que aparece en nuestro estudio con el cáncer de ovario. Por tanto, todo parece indicar que los polimorfismos en los genes BRCA se comportan de manera diferente en cáncer de mama que en cáncer de ovario.

Aunque los polimorfismos en FGFR2 no habían sido examinados previamente en relación con el riesgo de cáncer de ovario, Huijts et al. obtuvieron unos resultados al límite de significación ($p=0.05$) al estudiar el SNP rs2981582 de FGFR2 en mujeres con historia de cáncer de mama u ovario de primer y segundo grado¹⁶. Además, Steele y colaboradores encontraron que la isoforma IIIb de FGFR2 se expresaba en cáncer de ovario epitelial pero no en la superficie epitelial del ovario normal y que ligandos de FGFR2-IIIb promueven la

proliferación e impiden la apoptosis de las células cancerígenas del ovario³⁴. Por otra parte, otro estudio no encuentra asociación entre los polimorfismos de FGFR2 y el riesgo de cáncer de ovario, pero no descartan la posibilidad de que otros polimorfismos en este gen puedan tener influencia en ese riesgo, o que FGFR2 pueda de otra manera estar envuelto en la carcinogénesis del ovario⁷.

Estos resultados en otros estudios contrastan con el nuestro, ya que en este aparece una relación significativa entre el SNP de FGFR2 y el riesgo de cáncer de ovario. Esto se puede deber a que en nuestro estudio tenemos un tamaño poblacional mucho más pequeño (100 pacientes frente a los 1000 con el que cuentan otros estudios), y además, el origen de esa población también es diferente; los de los otros estudios son americanos, frente al nuestro que es únicamente de España.

En cuanto al SNP de la región 8q24 (rs13281615) ha sido muy estudiado en relación con el cáncer de ovario. Diferentes estudios^{7, 9, 18, 32, 43, 44} muestran iguales resultados: rs13281615 muestra una relación con el cáncer de mama, pero no con el cáncer de ovario. Sin embargo otros SNPs en esta región (rs10505477, rs10808556, y rs6983267), presentaron una influencia en el tumor de ovario pero no en el de mama. Estos resultados sugieren que diferentes alelos dentro del mismo gen o región cromosómica podrían estar asociados con diferentes cánceres y que, otros SNPs podrían asociarse con el riesgo de cáncer de ovario. En este caso nuestro estudio sí coincide con el resto.

7.- Conclusiones

-Los tres polimorfismos estudiados en el gen BRCA1 modifican el riesgo de padecer cáncer de ovario de manera que el alelo salvaje podría aumentar el riesgo.

-Por otra parte, según nuestro estudio, los genes TP53, MIR146 y la región 8q24 no influyen en la susceptibilidad a desarrollar tumores ováricos.

-Finalmente, el alelo menos frecuente del SNP de FGFR2 disminuye el riesgo de padecer cáncer de ovario.

-Three polymorphisms studied in BRCA1 gene modify the risk of ovarian cancer so that the wild-type allele could increase the risk.

-Moreover, according to our study, TP53 gene, MIR146 gene and 8q24 region don't influence susceptibility to develop ovarian tumors.

-Finally, less frequent allele of FGFR2's SNP decreases the risk of ovarian cancer.

8.- Referencias

1. Antoniou A, Spurdle A, Sinilnikova O, Healey S, Pooley K, Schmutzler R, Vermold B, Engel C, Meindl A, RNAold N, Hofmann W, Sutter C, Niederacher D, Deissler H, Caldes T, Kämpjärvi K, 2008. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *American journal of human genetics*. 82(4):937-48.
2. Aylon Y, Oren M, 2007. Living with p53, dying of p53. *Cell*. 130(4):597-600.
3. Bochar D. A., Wang L., Beniya H., Kinev A., Xue Y., Lane W. S., Wang W., Kashanchi F. and Shiekhattar R., 2000. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102, 257-265.
4. Butt S, Harlid S¹, Ivarsson MI, Grzybowska E, Eyfjörd JE, Lenner P, Försti A, Hemminki K, Manjer J, Dillner J, Carlson J, 2012. Combined effect of low-penetrant SNPs on breast cancer risk. *British journal of cancer*. 106(2):389-96
5. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struewing JP, Morrison J, Field H, et al. 2007. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 447(7148):1087-93.
6. Fernández D, 2013. Nuevas aportaciones a la búsqueda de genes de predisposición al cáncer de mama hereditario. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, España.
7. Gates M, Tworoger S, Terry K, De Vivo I, Hunter D, Hankinson S, Cramer D, 2010. Breast cancer susceptibility alleles and ovarian cancer risk in two study populations. *Internacional Journal of Cancer*. 124(3): 729–733.
8. Glover-Collins K, Thompson M, 2008. Nuclear export of BRCA1 occurs during early S phase and is calcium-dependent. *Cellular signalling*. 20(5): 958-68.
9. Ghossaini M, Song H, Koessler T, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Driver KE, et al., 2008. Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. *Journal of the National Cancer Institute*; 100(13):962–966.
10. Gonzalez A., Minguéz J.A., Martín L., García R., Alonso N., Martín F.J., 2006. Los genes BRCA1 y BRCA2. Estudio molecular. *Revista Electrón Biomed*, 3:16-23.
11. Gudas J, Li T, Jensen D, Rauscher F, Cowan K, 1996. Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association of Cancer Research*. 7(6):717-23.
12. Guo H, Wang K, Xiong G, Hu H, Wang D, Xu X, Guan X, Yang K, Bai Y, 2010. A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Familial cancer*. 9(4):599-603.
13. He L, Thomson J, Hemann M, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon G, Hammond S, 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435 (7043): 828-33.
14. Hennesy B, Gonzalez A, Stemke-Hale K, Gilcrease M, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB, 2009. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Research*. 69(10): 4116–4124

15. Huen M, Sy S, Chen J, 2010. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 138-148.
16. Huijts PE, Vreeswijk MP, Kroeze-Jansema KH, Jacobi CE, Seynaeve C, Krol-Warmerdam EM, Wijers-Koster PM, Blom JC, Pooley KA, Klijn JG, Tollenaar RA, Devilee P, et al., 2007. Clinical correlates of low risk variants in FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 and 8q24 in a Dutch cohort of incident breast cancer cases. *Breast Cancer Research*; 9:R78.
17. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A, 2008. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State*. 105(20): 7269-74.
18. Kjaer SK, Song H, Ramus SJ, DiCioccio RA, Chenevix-Trench G, Pearce CL, et al., 2009. Association between invasive ovarian cancer susceptibility and 11 best candidate SNPs from breast cancer genome-wide association study. *Human Molecular Genetics*. 18(12):2297–2304.
19. Kleiman F, Wu-Baer F, Fonseca D, Kaneko S, Baer R, Manley J, 2005. BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes & Development*. 19(10): 1227-1237.
20. Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild C, Meyers B, Green P, 2005. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*. 309(5740): 1567-9.
21. Malkin D, Li F, Strong L, Fraumeni J, Nelson C, Kim D, Kassel J, Gryka M, Bischoff F, Tainsky M, 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250 (4985):1233-8.
22. Manrique G, 2009. Herencia y genética del cáncer ginecológico. Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.
23. Misra S, Sharma S, Agarwal A, Khedkar SV, Tripathi MK, Mittal MK, Chaudhuri G, 2010. Cell cycle-dependent regulation of the bi-directional overlapping promoter of human BRCA2/ZAR2 genes in breast cancer cells. *Molecular cancer*. 10.1186/1476-4598-9-50.
24. Okubo M, Tahara T, Shibata T, Yamashita H, Nakamura M, Yonemura J, Ishizuka T, Arisawa T, Hirata I, 2010. Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population. *Helicobacter*. 15(6):524-31.
25. Pastrello C, Polesel J, Della L, Viel A, Maestro R, 2010. Association between has-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis*. 31(12):2124-6.
26. Pluquet O, Hainaut P, 2001. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer letters*. 10;174(1):1-15.
27. Roy R, Chun J, Powell S, 2012. BRCA1 and BRCA2: important differences with common interests. *Nature Reviews Cancer*, 12, 372.
28. Rubio M, 2008, Nuevas aportaciones a la caracterización de genes de susceptibilidad en cáncer de mama. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, España.
29. Ruiz de Garibay G, 2014. Síndromes hereditarios de cáncer de mama familiar: variantes de significado clínico incierto y consejo genético. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.
30. Saunus J, Edwards S, French J, Smart C, Brown M, 2007. Regulation of BRCA1 messenger RNA stability in human epithelial cell lines and during cell cycle progression. *FEBS letters*. 581(18):3435-42.
31. Schmeler K, M.D., Lynch H, Chen L, Munsell M., Soliman P, Clark M, Daniels M, White K, Boyd-Rogers S, Conrad P, Yang K, Rubin M, Sun C, Slomovitz B, Gershenson D, Lu K, 2006. Prophylactic Surgery to Reduce the Risk of Gynecologic Cancers in the Lynch Syndrome, *The New England Journal Of Medicine* 354;3.
32. Song H, Ramus SJ, Kjaer SK, DiCioccio RA, Chenevix-Trench G, Pearce CL, et al., 2009 Association between invasive ovarian cancer susceptibility and 11 best candidate SNPs from breast cancer genome-wide association study. *Human Molecular Genetics*. 18(12):2297–2304.

33. Soto D, 2008, Estudio de los polimorfismos de genes reparadores en población fumadora con y sin cáncer de pulmón, Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, España.
34. Steele IA, Edmondson RJ, Bulmer JN, Bolger BS, Leung HY, Davies BR, 2001. Induction of FGF receptor 2-IIIb expression and response to its ligands in epithelial ovarian cancer. *Oncogene*.20:5878–87.
35. Suen T y Goss P, 2001. Identification of a novel transcriptional repressor element located in the first intron of the human BRCA1 gene. *Oncogene*. 20, 440-450.
36. Teraoka SN, Bernstein JL, Reiner AS, Haile RW, Bernstein L, Lynch CF, Malone KE, Stovall M, Capanu M, Liang X, Smith SA, Mychaleckyj J, Hou X, Mellemejkjaer L, Boice JD Jr, Siniard A, Duggan D, Thomas DC; WECARE Study Collaborative Group, Concannon P. Single nucleotide polymorphisms associated with risk for contralateral breast cancer in the Women's Environment, Cancer, and Radiation Epidemiology (WECARE) Study. *Breast cancer research*. 13(6):R114
37. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, Penegar S, Chandler I, Gorman M, Wood W, Barclay E, Lubbe S, Martin L, Sellick G, Jaeger E, Hubner R, Wild R, Rowan A, et al., 2007. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *39(8):984-8*.
38. Torrades S, 2003. El origen genético del cáncer de mama. *Offarm, Vol 22 Núm 6*.
39. Tranchemontagne J, Boothroyd L, Blancquaert I, 2006. Contribution of BRCA1/2 Mutation Testing to Risk Assessment for Susceptibility to Breast and Ovarian Cancer. *Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS)06-02a*.
40. Valladares M, Corsini G, Romero C, 2014. Asociación entre obesidad y cáncer de ovario. *Revista médica de Chile. Vol. 142 n°5*.
41. Wang Q, Zhang H, Kajino K, Greene MI, 1998. BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene*. Volume 17, Pages 1939-1948.
42. Wite JS, 2007. Multiple prostate cancer risk variants on 8q24. *Nature genetics*. 39(5):579-80.
43. Wokolorczyk D, Gliniewicz B, Sikorski A, Zlowocka E, Masojc B, Debniak T, et al., 2008. A range of cancers is associated with the rs6983267 marker on chromosome 8. *Cancer Reserch*; 68(23):9982–9986
44. Wokolorczyk D, Lubinski J, Narod SA, Cybulski C. 2009 Genetic heterogeneity of 8q24 region in susceptibility to cancer. *Journal of the National Cancer Institute*; 101(4):278–279.
45. Xu B, Feng N, Li P, Tao J, Wu D, Zhang Z, Tong N, Wang J, Song N, Zhang W, Hua L, Wu H., 2010. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate*. 70(5):467-72
46. Yarden R, Brody L, 1999. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State*. 96(9): 4983–4988

<http://salud.ccm.net/faq/15772-polimorfismo-genetica-definicion>

Página Web de la Asociación Española contra el Cáncer→ www.aecc.es

Página Web de la Sociedad Española de Oncología Médica→ www.seom.org

<http://www.cancer.org/espanol/cancer/ovario/guiadetallada/cancer-de-ovario-causes-risk-factors>.