



## Asociación del cáncer de mama con los polimorfismos T-66G y G-156GG del gen SPP1 y las concentraciones séricas de osteopontina\*

Antonio Sifuentes Álvarez,<sup>\*,\*\*\*</sup> Jorge Talamás Márquez,<sup>\*\*,\*\*\*</sup> Francianella Reyes Vargas,<sup>\*\*</sup> Miguel Reyes Romero<sup>\*\*\*</sup>

### RESUMEN

**Antecedentes:** recientemente se asoció a la osteopontina con el cáncer de mama; sin embargo, no se ha estudiado el riesgo que confieren las variantes polimórficas de su gen codificante SPP1.

**Objetivo:** determinar la asociación entre cáncer de mama, los polimorfismos T-66G y G-156GG del gen SPP1, los haplotipos conformados por ellos, y las concentraciones séricas de osteopontina en mujeres del Norte de México.

**Método:** estudio de casos y controles efectuado con 150 casos y 225 controles de pacientes atendidas en el Centro Estatal de Oncología de Durango. Todas las participantes otorgaron su consentimiento informado. La determinación de los polimorfismos se realizó por fundido de ADN de alta resolución y la de osteopontina por ELISA. El análisis estadístico se realizó con el programa Episheet y Haploview.

**Resultados:** para el polimorfismo G-156GG, el modelo por alelos mostró razón de momios (RM) de 2.25, y el modelo dominante RM de 2.74. El valor de desequilibrio de ligamiento estandarizado de 0.15. Los haplotipos -66T/-158GG y -66G/-158 GG mostraron RM de 1.84 y 4.70, respectivamente. La concentración de osteopontina fue mayor en los casos ( $p < 0.001$ ). No se encontró asociación de alelos y genotipos con la concentración de osteopontina.

**Conclusiones:** los resultados sugieren que el alelo -156GG de SPSS1 aumenta el riesgo de cáncer. La osteopontina se encuentra elevada en pacientes con cáncer de mama, pero sin asociación con los alelos o genotipos estudiados. Este es el primer estudio realizado en población mexicana de polimorfismos de la región promotora de SPP1 que contribuye a caracterizar la estructura genética de nuestra población.

**Palabras clave:** cáncer de mama, gen SPP1, osteopontina, polimorfismo genético.

### ABSTRACT

**Background:** Recently osteopontin was associated with breast cancer, but has not studied the risk conferred by polymorphic variants of the gene encoding SPP1.

**Objective:** To determine the association between breast cancer, polymorphisms T-66G and G-156GG SPP1 gene, haplotypes formed by them, and serum osteopontin in women in northern Mexico.

**Method:** A case-control study with 150 cases and 225 controls of patients treated at the Cancer Center of Durango State. All participants gave their informed consent. The determination of the polymorphisms was performed by DNA fused high resolution and osteopontin by ELISA. Statistical analysis was performed using Haploview and Episheet.

**Results:** for G-156GG polymorphism, the model showed allele odds ratio (OR) of 2.25, and the dominant model of 2.74 RM. The value of standardized linkage disequilibrium of 0.15. The GG haplotype -66G/-158 -66T/-158GG and MRI showed 1.84 and 4.70, respectively. The concentration of osteopontin was higher in cases ( $p < 0.001$ ). No association of alleles and genotypes with concentration of osteopontin.

**Conclusions:** These results suggest that allele-156GG SPSS1 increases the risk of cancer. Osteopontin is elevated in patients with breast cancer, but no association with the alleles or genotypes studied. This is the first study in Mexican population of polymorphisms in the promoter region of SPP1 contributes to characterize the genetic structure of our population.

**Key words:** breast cancer, gene SPP1, osteopontin, genetic polymorphism.

### RÉSUMÉ

**Antécédents:** Récemment ostéopontine a été associée à un cancer du sein, mais elle n'a pas étudié le risque conféré par des variantes polymorphes du gène codant SPP1.

**Objectif:** déterminer l'association entre le cancer du sein, les polymorphismes de T-66G et G-156GG SPP1 gène, haplotypes formé par eux, et l'ostéopontine sérique chez les femmes dans le nord du Mexique.

**Méthode:** Une étude cas-témoins avec 150 cas et 225 contrôles de patients traités au Centre du cancer de l'Etat de Durango. Tous les participants ont donné leur consentement éclairé. La détermination des polymorphismes a été réalisée par l'ADN fusionné à haute résolution et l'ostéopontine par ELISA. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide Episheet et HaploView.

**Résultats:** pour G-156GG polymorphisme, le modèle a montré allèle odds ratio (OR) de 2,25, et le modèle dominant de 2,74 RM. La valeur du déséquilibre de liaison standardisée de 0,15. L'haplotype GG-66G/-158-66T/-158GG et IRM a montré 1,84 et 4,70, respectivement. La concentration de l'ostéopontine a été plus élevée dans les cas ( $p < 0,001$ ). Aucune association d'allèles et de génotypes avec une concentration d'ostéopontine.

**Conclusions:** Ces résultats suggèrent que les allèles 156GG SPSS1 augmentent le risque de cancer. L'ostéopontine est élevée chez les patients atteints de cancer du sein, mais aucune association avec les allèles ou des génotypes étudiés. Cette étude est la première dans la population mexicaine de polymorphismes dans la région promotrice de SPP1 contribue à caractériser la structure génétique de notre population.

**Mots-clés:** cancer du sein, le gène SPP1, l'ostéopontine, le polymorphisme génétique.

## RESUMO

**Antecedentes:** Recentemente osteopontina foi associado com câncer de mama, mas ainda não estudou o risco conferido por variantes polimórficas do gene que codifica SPP1.

**Objetivo:** determinar a associação entre o câncer de mama, polimorfismos T-66G e G-156GG gene SPP1, haplótipos formados por eles, e osteopontina soro em mulheres no norte do México.

**Método:** Um estudo de caso-controle com 150 casos e 225 controles de pacientes atendidos no Centro de Câncer do Estado de Durango. Todos os participantes deram seu consentimento informado. A determinação dos polimorfismos foi realizada por DNA fundido de alta resolução e osteopontina por ELISA. Análise estatística foi realizada utilizando Episheet e Haploview.

**Resultados:** para G-156GG polimorfismo, o modelo mostrou relação alelo odds (OR) de 2,25, eo modelo dominante de 2,74 RM. O valor do desequilíbrio de ligação padronizada de 0,15. O haplótipo GG-66G/-158-66T/-158GG e ressonância magnética mostrou 1,84 e 4,70, respectivamente. A concentração de osteopontina foi maior nos casos ( $p < 0,001$ ). Nenhuma associação de alelos e genótipos com concentração de osteopontina.

**Conclusões:** Estes resultados sugerem que o alelo-156GG SPSS1 aumenta o risco de câncer. Osteopontina é elevada em pacientes com câncer de mama, mas nenhuma associação com os alelos ou genótipos estudados. Este é o primeiro estudo na população mexicana de polimorfismos na região promotora do SPP1 contribui para caracterizar a estrutura genética da nossa população.

**Palavras-chave:** câncer de mama, o gene SPP1, osteopontina, polimorfismo genético.

Las neoplasias malignas de la mama son la primera causa de muerte por cáncer en mujeres que viven en países industrializados. En México, a partir del año 2006, el cáncer de mama ocupa el primer lugar como causa de mortalidad por cáncer en mujeres y es, a la vez, la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años de edad. La incidencia del cáncer de mama es de 38.4 por 100,000 mujeres y la mortalidad estandarizada se ha duplicado en los últimos 20 años. Uno de los principales

problemas de este tipo de neoplasia maligna es la detección tardía, pues entre 70 y 80% de las pacientes acude a solicitar atención en etapas avanzadas de la enfermedad. Así, debido a la estructura de la pirámide poblacional, el cáncer de mama representa un desafío en materia de salud pública en el mundo y en nuestro país, donde se espera un incremento sustancial debido a que cada año muchas mujeres llegan a la edad de riesgo. Por esto es imprescindible conocer más acerca de los mecanismos moleculares responsables que permitan conocer mejor las alternativas de prevención, detección y tratamiento más oportunos. La comprensión actual de la biología del cáncer de mama no es aún suficiente para mejorar la prevención y tratamiento de esta enfermedad.<sup>1</sup>

Se estima que en el año 2020 habrá alrededor de 29 millones de mujeres en edad de riesgo; por ello es imprescindible acelerar más la investigación acerca de la etiopatogenia de este padecimiento, sobre todo de los factores genéticos de riesgo y los mecanismos moleculares subyacentes, con la finalidad de ofrecer mejor atención preventiva, detección oportuna y expectativas más halagüeñas de tratamiento.

La osteopontina es una glucoproteína fosforilada de, aproximadamente, 300 residuos de aminoácido, con alto grado de homología entre especies. Está codificada por el gen SPP1, que se localiza en el cromosoma 4, del que existen tres isoformas (a, b y c) generadas por empalme

La FEMECOG otorgó a este trabajo el primer lugar del Premio Luis Castelazo Ayala en la categoría de investigación clínica del concurso celebrado durante el 62 Congreso Mexicano de Ginecología que tuvo lugar en el puerto de Veracruz el pasado octubre de 2011.

\* Hospital General de la Secretaría de Salud de Durango.

\*\* Centro Estatal de Cancerología, Secretaría de Salud de Durango.

\*\*\* Facultad de Medicina y Nutrición de la UJED.

Correspondencia: Dr. Antonio Sifuentes Álvarez. Constitución 230 Norte, Zona Centro, Durango 34000 Durango, México. Correo electrónico: sifual55@hotmail.com  
Recibido: octubre 2011. Aceptado: noviembre 2011.

Este artículo debe citarse como: Sifuentes-Álvarez A, Talamás-Márquez J, Reyes-Vargas F, Reyes-Romero M. Asociación del cáncer de mama con los polimorfismos T-66G/G Y G-156GG del gen SPPI y las concentraciones séricas de osteopontina. Ginecol Obstet Mex 2012;80(1):22-29.

alterno; sin embargo, hasta ahora, su significado funcional se desconoce. La molécula sufre modificaciones postraduccionales (glucosilación y fosforilación).<sup>2</sup>

La osteopontina es una proteína multifuncional expresada en gran variedad de tejidos (hueso, cerebro, riñón, pulmón e hígado) y en varios tipos celulares (células T, dendríticas, naturales asesinas, endoteliales, de músculo liso, epiteliales y macrófagos). En la inflamación y función inmunitaria de tejidos mineralizados y vasculares se han atribuido varios papeles fisiológicos a la osteopontina. También se ha encontrado asociación en padecimientos como el lupus eritematoso sistémico<sup>3</sup> y enfermedad de Parkinson.<sup>4</sup>

La osteopontina interactúa con una gran variedad de receptores de superficie celular, incluidas las integrinas. La unión de la osteopontina a este tipo de receptores estimula la adhesión, migración y señalización. Se ha encontrado expresión de osteopontina en varios tipos de cáncer, incluido el de mama, donde sus concentraciones están elevadas en el plasma de pacientes con cáncer metastásico.

De acuerdo con investigaciones recientes, la osteopontina es una de las moléculas que con más frecuencia se asocia con metástasis de tumores humanos;<sup>5,6</sup> sus concentraciones se han encontrado elevadas en el plasma de pacientes con cáncer metastásico. En la actualidad se acepta que la osteopontina expresada por las células tumorales afecta su habilidad para crecer, invadir y dar metástasis; de ahí que la osteopontina puede ser un punto de intervención en cáncer. La evidencia actual demuestra que la osteopontina está elevada en pacientes con diversos tipos de tumores, incluido el cáncer de mama. En diversas series, la evidencia señala la correlación de las concentraciones de esta proteína con la evolución del cáncer.<sup>6,7</sup>

Hace poco se publicaron los resultados de estudios de metanálisis de osteopontina en cáncer en donde en varios tipos de éste se describe la asociación significativa con la supervivencia, la etapa, el grado y progreso de los tumores; por ello se sugiere su uso como biomarcador de evolución del tumor.<sup>6,7</sup>

De acuerdo con estas evidencias, la osteopontina parece representar, e incluso ya se reconoce, como un biomarcador para diagnóstico temprano y de riesgo de metástasis en cáncer de mama.

Se han descrito variaciones en el gen SPP1 asociadas con algunos padecimientos, como: lupus eritematoso y

esclerosis múltiple. Hace poco, en el sitio promotor de este gen, se describieron polimorfismos que afectan su actividad transcripcional, particularmente dos: T-66G (rs28357094) y G-156GG (rs11439060) en esta región promotora de SPP1, que parecen afectar la unión de factores de transcripción como SP1 (*specific protein 1*).<sup>8</sup> La combinación de estos polimorfismos en distintos haplotipos pudiera explicar la expresión diferencial de la osteopontina encontrada en algunos padecimientos. Igualmente, el estudio de estos polimorfismos pudiera ser de gran utilidad para dilucidar la modificación del riesgo de cáncer de mama atribuible a distintas concentraciones de osteopontina. A la fecha no existen en la bibliografía estudios de los polimorfismos en la región promotora del gen SPP1 y su asociación con cáncer de mama; sin embargo, su producto de expresión, la osteopontina, se reconoce como importante en el desarrollo de neoplasias y mecanismos de invasión tumoral y metástasis.

El objetivo de esta investigación es determinar si existe asociación entre cáncer de mama, los polimorfismos T-66G y G-156GG del gen SPP1, los haplotipos conformados por ellos, y las concentraciones séricas de osteopontina en mujeres del Norte de México

## MÉTODO

Estudio de casos y controles efectuado con pacientes-casos incidentes de patología mamaria maligna atendidos en el Centro Estatal de Cancerología de la Secretaría de Salud de Durango. Los controles fueron mujeres sin patología mamaria pareadas grupalmente por edad. Se integró una muestra de estudio de 150 casos y 225 controles, calculada con el programa Quanto, que consideró un riesgo poblacional de 0.05, una frecuencia promedio de los alelos mutados de 0.08, un modelo genético aditivo, una potencia de 0.8, un nivel de significancia de 0.05, para detectar una diferencia en el riesgo entre 1.8 y 2. La población de estudio fueron las mujeres que acudieron al Centro Estatal de Cancerología de Durango entre agosto de 2007 y diciembre de 2010. El grupo de casos se integró con mujeres mayores de 18 años, con diagnóstico histopatológico de cáncer de mama; los controles fueron mujeres sin diagnóstico de cáncer de mama que acudieron por otros motivos al Centro Estatal de Cancerología de Durango. Se solicitó el consentimiento informado de las participantes, guardando la

confidencialidad y el anonimato de las mismas. El proyecto fue autorizado por el Comité de Ética e Investigación del Centro Estatal de Cancerología de Durango.

### Determinación de los polimorfismos T-66G y G-156GG del gen SPP1

La genotipificación se realizó a partir de una muestra de sangre venosa o capilar, sometida a lisis alcalina con NaOH, seguida de amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y análisis de fundido por HRM (*high resolution melting*) de los productos. Se utilizó el reactivo GoTaq Master Mix (Promega, Inc., Madison, WI) en una mezcla de reacción de 15 microlitros con la siguiente composición: GoTaq Master Mix, 7.5 microlitros; agua, 5.7 microlitros; iniciador sentido, 0.3 microlitros; iniciador antisentido, 0.3 microlitros; lisado alcalino sanguíneo, 1.2 microlitros.

El programa de amplificación fue: 50 ciclos de desnaturalización a 95°C por 45 segundos, alineamiento a 55°C (G-156GG) o 62°C (T-66G) por 45 segundos, extensión a 72 °C durante 45 segundos. Enseguida se realizó otra amplificación con PCR en tiempo real, con un termociclador con canal para HRM. Se utilizó el reactivo Type It HRM (Qiagen, Inc.). La mezcla de reacción de 15 microlitros de volumen fue: Type It HRM, 7.5 microlitros; agua, 5.9 microlitros; iniciador sentido, 0.3 microlitros; iniciador antisentido, 0.3 microlitros; producto de la primera PCR, 1 microlitro, seguido de un programa de amplificado semejante al anterior pero sólo 20 ciclos y tiempos de 15 segundos de desnaturalización, alineamiento y extensión. Por último, se realizó el análisis de curvas de fundido de ADN en límites de temperatura de 55 a 90°C. Los iniciadores utilizados fueron: T-66G, F'CTGGGCAGTG-GCAGAAAAC y R'ACAACCAAGCCCTCCCAGA; G-156GG, F'CCCATCCC-GTAAATGAAAAA y 5R,ACTTCCCCCTCTGGTTTTGT.

### Determinación de osteopontina circulante

Se realizó por inmunoensayo enzimático con equipos del fabricante *Research & Diagnostics Systems, Inc.* (Minneapolis, MN). Para este efecto se colectó plasma de las participantes y se conservó en congelación a -40°C hasta el momento de las determinaciones. Se utilizó un lector de placas marca Bio-Rad, modelo iMark, y el programa Microplate Manager 6 Software. Para la elaboración de la curva estándar y lectura de las muestras se utilizó una

curva de cuatro parámetros, que generó una curva con coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.98.

### Análisis estadístico

Para calcular el riesgo con distintos modelos genéticos se determinó la razón de momios con intervalo de confianza del 95% y la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con el programa en línea del Instituto de Genética Humana de la Universidad Tecnológica de Munich (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html>). Se consideró significativa una  $p < 0.05$ . Otro programa utilizado para análisis estadístico fue el Sigma Plot v.11 (Systat Software Inc., San José, CA). El análisis de haplotipos se realizó con el programa Haploview v.4.2 (Barret et al, 2005), basado en estimaciones de frecuencias de máxima probabilidad.

## RESULTADOS

### Edad de las participantes y tipos histológicos de cáncer

La mediana de edad en el grupo de casos fue 54 años, con límites de 31 y 85 años y rango intercuartil de 45 a 63 años. La mediana de edad en el grupo control fue 53 años, con límites de 29 y 83 años y rango intercuartil de 45 a 61 años.

De acuerdo con el estudio histopatológico, 32 (21.33%) casos fueron carcinoma ductal *in situ*, 87 (58.00%) carcinoma ductal infiltrante, 5 (3.33%) carcinoma lobulillar *in situ*, 23 (15.33%) carcinoma lobulillar infiltrante, y 3 (2%) correspondientes a otros tipos.

### Análisis genético

#### Polimorfismo T-66G de SPP1

#### Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg

En el grupo de casos y en el de controles se observó equilibrio de Hardy-Weinberg. En el grupo de casos y de controles no se encontraron muestras homocigotas para el genotipo mutado GG.

#### Análisis de asociación en distintos modelos genéticos

El análisis de modelos genéticos mostró restricción a dos modelos (por alelos y heterocigoto) en virtud de la ausencia de homocigotos GG en la muestra. En el modelo genético por alelos (frecuencia del alelo silvestre (T) con la del alelo mutado (G) entre casos y controles) se encontró una razón de momios de 1.56, sin significación estadística. En el modelo heterocigoto se comparó la frecuencia del

genotipo homocigoto silvestre (TT) con la del genotipo heterocigoto (TG) entre casos y controles; la razón de momios fue de 1.63, sin significado estadístico.

### Polimorfismo G-156GG de SPP1

#### Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg

En el grupo de casos y en el de controles se observó equilibrio de Hardy-Weinberg,

#### Análisis de asociación en distintos modelos genéticos.

##### Modelo genético por alelos

En el modelo genético por alelos (G vs GG) se encontró una razón de momios de 2.25, estadísticamente significativa (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Modelo genético por alelos del polimorfismo G-156GG de SPP1

	Casos n (%)	Controles n (%)	Razón de momios (I.C. 95%)	p
G	233(77.66)	399(88.66)	1	
GG	67(22.34)	51 (11.34)	2.25(1.51-3.35)	0.0001

##### Modelo genético dominante

En el modelo genético dominante (GG) vs G GG + GG GG entre casos y controles se encontró una razón de momios de 2.74, estadísticamente significativa (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Modelo genético dominante del polimorfismo G-156GG de SPP1

	Casos n (%)	Controles n (%)	Razón de momios (I.C. 95%)	p
G	87(58.00)	178(79.11)	1	
G GG- + GG GG	63 (42.00)	47 (20.89)	2.74 (1.73-4.32)	0.00001

En el modelo recesivo (GG + G GG vs GG GG entre casos y controles) se encontró una razón de momios de 1.51, sin significación estadística.

##### Modelo genético codominante

En el modelo codominante (G vs G GG vs GG GG entre casos y controles) se encontró una razón de momios de 2.8 para el genotipo heterocigoto, con significación estadística, y de 1.32 para el homocigoto mutado no significativo estadísticamente (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Modelo genético codominante del polimorfismo G-156GG de SPP1

	Casos n (%)	Controles n (%)	Razón de momios (I.C. 95%)	P
GG	87 (58.00)	178(79.11)	1	
GGG	59 (39.33)	43(19.11)	2.8(1.75-4.48)	0.00001
GGGG	4 (2.66)	4(1.77)	2.04 (0.49-8.37)	0.31

## ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

El análisis haplotípico de los polimorfismos en estudio reveló escaso desequilibrio de ligamiento, con valores de desequilibrio estandarizado de 0.151, logaritmo de desequilibrio de O (LOD) de 0.77 y un valor de  $r^2$  igual a 0.01.

#### Frecuencias haplotípicas y riesgo

En el análisis de los haplotipos configurados por los polimorfismos se observó el mismo efecto de aumento en el riesgo conferido por el alelo GG del polimorfismo -156 cuando se estudió este polimorfismo aisladamente. La existencia de este alelo -156GG aumenta la razón de momios en los dos haplotipos que lo contienen, mientras que su ausencia disminuye el riesgo en presencia del alelo -66T y no lo modifica ante el alelo -66G. Así, el haplotipo silvestre -66T / -158G es el de menor riesgo y el más frecuente en nuestra población.

#### Osteopontina circulante y su asociación con cáncer de mama

Para conocer si entre casos y controles existen diferencias globales de concentraciones circulantes de osteopontina se determinaron los valores por un método inmunoenzimático. Se encontraron valores más altos en el grupo de casos, con diferencia estadísticamente significativa. (Cuadro 4)

#### Asociación del cáncer de mama con las concentraciones circulantes de osteopontina

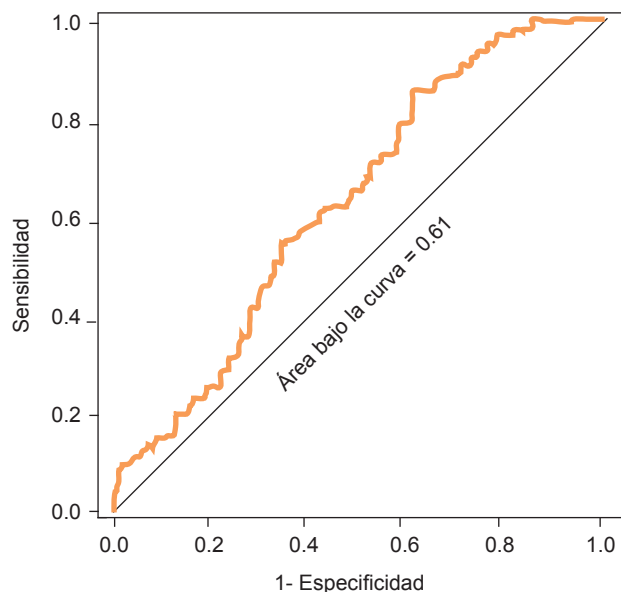
Para estimar el valor de la osteopontina como biomarcador de cáncer de mama, se realizó un análisis de regresión logística, y se encontró un coeficiente de 0.0168, lo que resulta en una razón de momios de 1.017 (I.C. 95% 1.006-1.028).

**Cuadro 4.** Concentraciones de osteopontina circulante en casos y controles

	Casos n=150	Controles n=225	
Mediana (ng/mL)	14.5	10.79	
Rango intercuartil (ng/mL)	9.35-23.63	6.47-18.5	p<0.001*

**Curva de características operativas del receptor (curva ROC)**

Para analizar la sensibilidad y especificidad de la osteopontina como biomarcador se analizó la curva ROC generada por los datos en casos y controles. El resultado indica que, como biomarcador único, la osteopontina ofrece baja sensibilidad y especificidad con un área bajo la curva de sólo 0.61 (Figura 1).

**Figura 1.** Sensibilidad y especificidad de la osteopontina como biomarcador. Curva ROC**Polimorfismos T-66G y G-156GG de SPP1 y su asociación con las concentraciones circulantes de osteopontina**

Se analizó la asociación de genotipos de los polimorfismos en estudio con las concentraciones circulantes de osteopontina, sin encontrar algún tipo de asociación en el análisis global que incluyó a los casos y controles (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Genotipos de los polimorfismos T-66G y G-156GG de SPP1 y su asociación con las concentraciones circulantes de osteopontina (n=375)

	Mediana (ng/mL)	Rango 25-75%	P
-66 TT	12.35	8.21-21.02	
-66 TG	11.16	6.95-18.93	0.39*
-66 GG			
-156 GG	11.85	7.25-18.80	
-156 GGG	12.58	8.72-23.89	0.21**
-156GGGG	13.86	10.29-35.80	

\* Prueba de suma de rangos de Mann-Whitney.

\*\* Análisis de varianza de una vía.

Tampoco se encontró asociación cuando se analizó por separado el grupo de casos. Para el polimorfismo T-66G el valor de p en los casos fue igual a 0.48; para el polimorfismo G-156GG, p tuvo un valor igual a 0.89.

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

El cáncer de mama es una enfermedad compleja con interacciones aún poco comprendidas de factores genéticos y ambientales relacionadas con el desarrollo del tumor y con la respuesta al tratamiento. Existen reportes recientes que indican o sugieren un papel importante de la osteopontina en la evolución del cáncer de mama y de otros tipos de cáncer y en padecimientos crónico-degenerativos no oncológicos, como el lupus eritematoso. Sin embargo, no existen estudios en población mexicana a este respecto ni se ha estudiado la variabilidad del gen SPP1, codificante de osteopontina. El objetivo de este trabajo fue analizar globalmente, en una población con cáncer, las concentraciones de osteopontina y su asociación con genotipos y haplotipos de dos polimorfismos de la región promotora (reguladora) del gen SPP1, mismos que se localizan en sitios de reconocimiento de factores de transcripción por lo que potencialmente están vinculados con distintos niveles de expresión del gen.

Para la genotipificación se introdujo un método nuevo en nuestra región, el análisis por fundido de ADN de alta resolución, que fue posible con apoyo del CONACYT, con la adquisición de un termociclador de tiempo real con capacidad para HRM. Los resultados de la genotipificación mostraron que en nuestra población el polimorfismo de los alelos mutados es relativamente frecuente (10% para el alelo -66G y 11% para el alelo-156GG en el grupo control). En poblaciones mexicanas, en la base del Instituto Mexicano de Medicina Genómica, se carece de

datos de frecuencia de estos polimorfismos. Tampoco los hay en la base del National Center for Biotechnology Information. En esta última la frecuencia global obtenida de 627 individuos de todas partes del mundo es de 11.8% para el alelo -66G, sin datos del polimorfismo -156GG; sin embargo, en poblaciones europeas este último se ha reportado en frecuencias que van de 20 a 35%.<sup>8</sup> Ninguno de estos polimorfismos figura como marcador en la base del proyecto HapMap.

El grupo de casos y el de controles mostraron equilibrio genético (equilibrio de Hardy-Weinberg) para ambos polimorfismos. El análisis del polimorfismo T-66G, en los modelos genéticos analizados, no mostró diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el polimorfismo G-156GG sí mostró diferencias en los modelos por alelo, dominante y codominante, lo que sugiere que el alelo GG de SPP1 aumenta el riesgo de cáncer de mama. Este alelo se ha encontrado asociado con pseudoxantoma elasticum, confirmando una razón de momios de 2.41 (Hendig et al, 2007), así como a lupus eritematoso sistémico, con una razón de momios de 2.58,<sup>9</sup> lo que se atribuye a cambios de afinidad por factores de transcripción en el sitio del polimorfismo, mecanismo que pudiera también operar en cáncer de mama.

El análisis por haplotipos reveló como más frecuente al haplotipo T-66/G-158 pero se encontró un desequilibrio de ligamiento débil; sin embargo, se encontraron dos haplotipos con valores de razón de momios de 1.84 y 4.70, con significación estadística. Estos haplotipos de riesgo contienen el alelo -158GG; sin embargo, considerando el poco desequilibrio de ligamiento, la explicación más probable de este aumento en el riesgo es de independencia o no asociación de alelos.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de osteopontina circulante entre casos y controles a favor de los primeros. Esto es concordante con la bibliografía publicada sobre el tema, lo que apoya la idea actual de que la osteopontina plasmática juega algún papel en el cáncer de mama. Sin embargo, el riesgo conferido es bajo (razón de momios de 1.016) lo que indica que la osteopontina es sólo una de muchas variables que intervienen en la aparición del padecimiento. Además, como biomarcador único ofrece alta sensibilidad sólo a valores de corte muy grandes, por lo que se hace necesario estudiar a fondo en qué tipo de pacientes pudiera ofrecer alta sensibilidad, especificidad y poder de predicción en diagnóstico temprano, evolución y supervivencia.

En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de osteopontina y los distintos alelos y genotipos, lo que sugiere que otros mecanismos y vías de señalización pudieran ser los responsables de los valores de osteopontina aumentados en mujeres con cáncer de mama.

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que los polimorfismos en la región reguladora del gen SPP1 confieren riesgo de cáncer de mama en mujeres de nuestra región, particularmente el polimorfismo -156GG, aunque se requiere de más estudios al respecto del mismo y otros polimorfismos en el mismo gen. Por la alta frecuencia de este polimorfismo encontrada en nuestra población, es meritorio de estudios para definir su utilidad como diagnóstico temprano y la evolución del padecimiento.

La principal limitación de este estudio es que al ser un análisis global de osteopontina y polimorfismos en cáncer, la falta de estratificación por edad, tipo de cáncer, estadio del tumor, tipo molecular, etc., limita el valor del riesgo conferido por la concentración circulante de osteopontina y los polimorfismos de SPP1 estudiados.

Por lo anterior, de acuerdo con los resultados de este estudio, en nuestra población la osteopontina tiene alta frecuencia de los polimorfismos T-66G y G-156GG de SPP1. Hacen falta más estudios que incluyan otros polimorfismos que conformen haplotipos más grandes, y estudiar más a fondo variables clínicas histológicas y bioquímicas. Los resultados de esta investigación sientan las bases para ello. Este es el primer estudio en población mexicana de polimorfismos de la región promotora de SPP1 y, por lo tanto, contribuye a caracterizar la estructura genética de nuestra población.

## REFERENCIAS

1. Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Sánchez G. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Publica Mex* 2009;51 Suppl 2:s197-207.
2. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, et al. Osteopontin-a molecule for all seasons. *Q J Med* 2002;95:3-13.
3. Kariuki SN, Moore JG, Kirou KA, Crow MK, et al. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009;10:487-494.
4. Ribner A, Altarescu G, Zimran A, Elstein D. Osteopontin polymorphic susceptibility factor for Parkinson's disease among patients with Gaucher disease. *Mov Disord* 2011;26:1341-3.

5. Suzuki M, Mose E, Galloy C, Tarin D. Osteopontin gene expression determines spontaneous metastatic performance of orthotopic human breast cancer xenografts. *Am J Pathol* 2007; 171(2):682-692.
6. Weber GF, Lett GS, Haubein NC. Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Br J Cancer* 2010;103:861-869.
7. Weber GF, Lett GS, Haubein NC. Categorical meta-analysis of Osteopontin as a clinical cancer marker. *Oncol Rep* 2011;25:433-441.
8. Giacomelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, et al. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics* 2004;20:87-96.
9. D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, et al. Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:539-547.

## AGRADECIMIENTO

Para la realización de este proyecto se contó con apoyo financiero de Fondos Sectoriales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, convenio 71016.