



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Genes de la vía catecol involucrados en el metabolismo del estradiol y su relación con el cáncer de mama

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

Biol. Ollin Celeste Martínez Ramírez

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. MARZO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Julieta Rubio Lightbourn y la asesoría técnica de la M. en IIB Clementina Castro Hernández, la Dra. María Eugenia Gonsebatt y el Dr. Pavel Petrosyan. Agradezco el apoyo de la beca doctoral CONACYT No. 210363 y al proyecto de PAPIIT No. IN219807-3.

Dedicatoria

A mis padres, por su apoyo incondicional, sus consejos y su inmenso amor. No tengo palabras para agradecerles la vida maravillosa y llena de bendiciones que me han dado.

A mi hermana, por consentirme y cuidarme siempre. Te quiero mucho y estoy muy orgullosa y agradecida de que me sigas tratando como tu hermanita menor.

A mi cuñado Rey, por su paciencia, tolerancia y amistad.

A la luz de mi vida, mi sobrinito Luis, gracias por hacerme reír con tus ocurrencias y esos besitos que te robo son de lo mejor de la vida. Espero siempre ser tu “tu tía”.

A mis tres angelitos que están en el cielo, mis abuelitos, Pedro, Agustín y mi “mamita” Raquel, los extraño y los quiero mucho.

Agradecimientos

A mi casa de estudios, la maravillosa UNAM, por todas las oportunidades que me ha dado.

A mis padres por todo su amor y apoyo incondicional.

A mí querida hermana por sus cuidados y cariño, a mí cuñado por su paciencia, y a los dos por darme el regalo de ser la tía más feliz y consentidora de todas.

A mis tíos, Silvia, Jorge, Lupita, Magda y Humberto gracias por sus consejos y su cariño.

A mis primos, gracias por hacerme reír tanto, los quiero.

A la Dra. Julieta Rubio por la dirección de esta tesis, gracias por las enseñanzas de vida, el cariño y la paciencia. Un placer y un honor ser su hija académica.

A la M. IIB. Clementina Castro por sus valiosos consejos académicos, gracias por siempre tener tiempo para ayudarme.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt, por todos los comentarios que fueron muy importantes en el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del Comité tutorial, la Dra. Norma Hernández, la Dra. Leticia Rocha y el Dr. Roberto Arreguín, gracias por sus consejos para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Pavel Petrosyan por su ayuda técnica y sus comentarios críticos durante la realización de esta tesis.

A las instituciones que nos apoyaron en la obtención de diversos recursos, UNAM, CONACYT, IIB, INCAN e INNSZ.

A las donadoras de sangre, pacientes y controles, ya que sin ellas no habría sido posible este trabajo.

A los estudiantes que participaron en la obtención y procesamiento de las muestras de población mexicana abierta.

A los compañeros del laboratorio, Alan, Cesar, Danny, Nydia, Lucio, Carla, Maritza, Gerardo y Karla, porque hacen más agradable cada día de trabajo en el laboratorio, gracias por sus aportaciones en los seminarios y por su amistad.

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	4
Figuras.....	6
Tablas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	11
Capítulo I. Antecedentes	
Cáncer de mama (CaMa).....	13
CaMa: Incidencia y mortalidad	13
Estructura de la glándula mamaria femenina.....	17
Tipos histológicos de CaMa.....	19
Factores de riesgo para el desarrollar de CaMa.....	19
Sexo.....	20
Edad.....	20
Etnia.....	21
Factores reproductivos.....	21
Estilo de vida.....	23
Factores genéticos.....	26
Susceptibilidad genética individual.....	27
Enfermedades benignas de la mama.....	30
Estrógenos.....	30
Biosíntesis y metabolismo de los estrógenos.....	30
Metabolitos carcinogénicos del 17β -E ₂	31
Enzimas del metabolismo de estrógenos y polimorfismos genéticos.....	34
Citocromo P-450 (CYP450).....	36
Citocromo 1A1 (CYP1A1).....	37
Citocromo 1B1 (CYP1B1).....	38
Catecol-O-metiltransferasa (COMT).....	39

ÍNDICE

Glutación S-transferasa's (GST's).....	40
Glutación S-transferasa Pi-1 (GSTP1).....	41
Glutación S-transferasa Mu-1 (GSTM1).....	41
Glutación S-transferasa Theta-1 (GSTT1).....	42
Receptores de estrógenos y factores de transcripción involucrados con el CaMa.....	44
Justificación	47
Hipótesis	47
Objetivo general	48
Objetivos particulares	48
Capítulo II Estudio de casos y controles	
Materiales y métodos.....	50
Sujetos.....	50
Diseño del estudio de casos y controles.....	51
Determinación de las variantes alélicas.....	52
Análisis estadísticos.....	57
Resultados.....	58
Discusión.....	66
Conclusiones del estudio de casos y controles.....	69
Capítulo III Estudio <i>in vitro</i>	
Estudio <i>in vitro</i>	70
Materiales y métodos.....	71
Cultivos celulares.....	71
Línea celular MCF-7.....	71
Leucocitos.....	72
Extracción de RNA total y RT-PCR.....	72
Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).....	74
Espectrometría de masas.....	75
Western Blot.....	75

ÍNDICE

Aislamiento del DNA y análisis de aductos por marcaje con ^{32}P	76
Resultados.....	77
Discusión.....	85
Conclusiones del estudio <i>in vitro</i>	90
Referencias	91

Abreviaturas

17 β -E₂: 17 beta-estradiol

CaCu: Cáncer cervicouterino

CaMa: Cáncer de mama

CE: Catecol estrógenos

2-CE₂: 2-catecolestradiol (2-OHE₂)

4-CE₂: 4-catecolestradiol (4-OHE₂)

CE-Q: Catecol estrógeno quinona

E₂-2-3-Q: 2-3 Quinona estradiol

E₂-3-4-Q: 3-4 Quinona estradiol

COMT: Catecol-O-metiltransferasa

CYP450: Citocromo P-450

CYP1A1: Citocromo P-450 1A1

CYP1B1: Citocromo P-450 1B1

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERE: Elemento de respuesta a estrógenos

FSH: Hormona folículo estimulante

GST's: Glutación S-transferasas

GSTM1: Glutación S-transferasa Mu1

GSTP1: Glutación S-transferasa Pi1

GSTT1: Glutación S-transferasa Teta1

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta presión

MS: Espectrometría de masas

IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer

IMC: Índice de masa corporal

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

MDR: Reducción de Dimensionalidad Multifactorial

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Abreviaturas

PNBC: Clorhidrato de *p*-nitrobencilo

Re α : Receptor de estrógeno alfa

Re β : Receptor de estrógeno beta

RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

RLM: Regresión Logística Multivariada

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SHBG: Globulina fijadora de hormonas sexuales

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

FIGURAS

Fig 1. Incidencia de CaMa y Mortalidad por CaMa estandarizada por edad de mujeres mexicanas. Tomado de International Agency for Research on Cancer. 2008.

Fig 2. Mortalidad por CaMa y CaCu, tasa por 100,000 mujeres ajustada por edad. México, 1955-2007. Tomado de Knual y cols., 2009.

Fig 3. Mapa regional de riesgo relativo de mortalidad por CaMa en México. Tomado de Vara-Salazar y cols., 2011.

Fig 4. Número de nuevos casos y defunciones por CaMa y por CaCu registradas en el INEGI 2010. México

Fig 5. Defunciones en México por CaMa en mujeres de 25 años en adelante del año 1980 al año 2009. Tomado del boletín de práctica médica efectiva. Secretaría Nacional de Salud Pública. México.

Fig 6. Estructura de la glándula mamaria femenina.

Fig 7. Localización de las lesiones de la glándula mamaria.

Fig 8. Porcentaje del tipo histológico del CaMa. Tomado del boletín de práctica médica efectiva. Secretaría Nacional de Salud Pública, 2010. México

Fig 9. Penetrancia de los genes y su relación con la exposición

Fig 10. Vía catecol del metabolismo de los estrógenos.

Fig 11. Organización estructural del gen CYP1A1 y sitio del polimorfismo CYP1A1 Ile462Val.

Fig 12 Organización estructural del gen CYP1B1 y sitio del polimorfismo CYP1B1 Leu432Val.

Fig 13. Organización del receptor de estrógenos.

Fig 14. Mecanismo clásico de acción de los receptores de estrógenos.

Fig 15. Western blot que muestra la presencia de la proteína del RE α en los leucocitos con “Combinación de polimorfismos de no riesgo” y en leucocitos con “Combinación de polimorfismos de riesgo”.

FIGURAS

Fig 16 Niveles detectados de mRNA del “*Combinación de polimorfismos de no riesgo*” y del “*Combinación de polimorfismos de riesgo*”.

Fig 17 Densitometría de la fosforilación de la proteína del RE α con 17 β -E₂, del cotratamiento 17 β -E₂ y ICI 182780 y el control con DMSO

Fig 18 Determinación de los niveles de 17 β -E₂ y 4-CE₂ mediante la técnica de HPLC.

Fig 19. Comparación de la fragmentación iónica del estándar 17 β -E₂ y la muestra obtenida de leucocitos por HPLC

Fig 19. Comparación de la fragmentación iónica del estándar 4-CE₂ y la muestra obtenida de leucocitos por HPLC

Fig 20 Figuras representativas de los aductos detectados mediante la técnica de post-marcaje con ³²P

TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo asociados con el CaMa.

Tabla 2. Daño al DNA, mutaciones y transformación celular asociadas con los estrógenos y sus metabolitos.

Tabla 3. Diferencias en la concentración de metabolitos carcinogénicos en tejidos con CaMa vs tejidos sin CaMa.

Tabla 4. Polimorfismos de enzimas relacionadas en la vía catecol.

Tabla 5. Polimorfismos asociados con CaMa reportados en otras poblaciones.

Tabla 6. Primers y condiciones de PCR-RFLP's.

Tabla 7. Frecuencia de los polimorfismos en una muestra de población mexicana.

Tabla 8. Evaluación de factores de riesgo asociados con CaMa.

Tabla 9. Asociación de polimorfismos genéticos con el CaMa.

Tabla 10. Asociación de los polimorfismos genéticos con el riesgo de padecer CaMa de acuerdo al estatus menopáusico.

Tabla 11. Razón de momios de las asociaciones del riesgo de padecer CaMa con el número de polimorfismos.

Tabla 12. Razón de momios de las asociaciones del riesgo de padecer CaMa con el número de polimorfismos de acuerdo al estatus menopáusico.

Tabla 13. RM-multivariado de las interacciones de polimorfismos homócigos mutantes y el riesgo de padecer CaMa.

Tabla 14. Estudios que muestran asociación de los polimorfismos del metabolismo de los catecol estrógenos en diferentes poblaciones.

Tabla 15. Similitudes entre leucocitos y glándula mamaria de algunos genes involucrados en el metabolismo de los estrógenos.

Resumen

El cáncer de mama (CaMa) es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad para las mujeres del mundo, incluyendo las de nuestro país. Existen diversos factores de riesgo asociados con este cáncer, el principal es la exposición a estrógenos endógenos y/o exógenos, esta relación está dada por tres acciones principales de los estrógenos; (i) estimulación de la proliferación celular, aumentando la posibilidad de introducir un error en la división celular y así iniciar un crecimiento descontrolado de las células de la glándula mamaria, (ii) daño por especies reactivas de oxígeno, al producirse oxidaciones y reducciones de los metabolitos derivados de los estrógenos y (iii) daño directo en el DNA por formación de aductos con el DNA, y su posterior formación de sitiosapurínicos, esto puede insertar mutaciones, las cuales pueden iniciar el CaMa. Es importante mencionar que en nuestro país las mujeres desarrollan CaMa una década más jóvenes que las mujeres del resto del mundo, por lo cual, es prioritario investigar si existe algún factor genético que sea determinante para esta diferencia.

En este estudio investigamos el papel de los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTP1 rs1695, GSTT1*0 y GSTM1*0, los cuales se presentan en genes involucrados en el metabolismo de los estrógenos, específicamente en la vía catecol, la cual está mediada por los receptores nucleares de estrógenos. Incluimos genes de enzimas de fase I y de fase II, para tener una visión más completa de la importancia de estos polimorfismos en la asociación con el CaMa. Por un lado realizamos un estudio epidemiológico de casos y controles con 300 mujeres, 150 con diagnóstico de CaMa y 150 sin diagnóstico de esta neoplasia. Encontramos una asociación entre los polimorfismos CYP1A1 rs1048943 (RM 1.95; I.C. 1.13-3.36) y GSTP1 rs1695 (RM 2.39; 1.24-4.24) con el riesgo de padecer cáncer de mama, esta asociación se mantiene al separar nuestro grupo de estudio por estatus menopáusico, también encontramos que cuando las mujeres tienen de 3 a 6 polimorfismos aumenta el riesgo de padecer CaMa significativamente (RM 3.75; I.C. 1.44-9.74) y este efecto es más importante para las mujeres jóvenes, poniendo en evidencia la importancia de estos polimorfismos en el desarrollo del CaMa en mujeres premenopáusicas.

Resumen

Para corroborar la importancia de los polimorfismos elegidos diseñamos un modelo *in vitro*, con leucocitos humanos tratados con 17β -E₂, el papel de los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTP1 rs1695, y GSTM1*0. Determinamos los niveles del mRNA por RT-PCR, la producción del metabolito mutagénico y carcinogénico 4-CE₂ mediante la técnica de HPLC y MS; los aductos formados en este modelo los determinamos por la técnica de post-marcaje con ³²P. Obtuvimos una mayor expresión del mRNA de los genes CYP1A1 y CYP1B1 así como menores niveles en la expresión de COMT en los leucocitos con el “Combinación de polimorfismos de riesgo” (CYP1A1^{Val/Val}, CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTT1*0) que en los leucocitos con el “Combinación de polimorfismos de no riesgo” (CYP1A1^{Ile/Ile}, CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu}, GSTT1*1 y GSTM1*1), esto puede estar asociado a la presencia de los polimorfismos, también obtuvimos mayores niveles del metabolito 4-CE₂ en el “Combinación de polimorfismos de riesgo”, comparado con el “Combinación de polimorfismos de no riesgo”. Los niveles de aductos estables encontrados fueron significativamente más altos en el Leucocitos de no riesgo. Los resultados obtenidos en esta investigación, tanto en el estudio epidemiológico, como en el estudio *in vitro*, deben ser confirmados con un mayor número de muestra, así como incluir otros genes involucrados en la vía catecol del metabolismo de los estrógenos y cuantificar una mayor cantidad de metabolitos del 17β -estradiol, con el fin de determinar si las asociaciones encontradas se mantienen y los polimorfismos incluidos en este trabajo puedan ser utilizados como biomarcadores para el cáncer de mama.

Abstract

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women worldwide, including Mexico, and is the leading cause of death associated with neoplasias in women. BC is closely related to exposure to both endogenous and exogenous estrogens. This relationship is considered to be due to three main actions of estrogens; (i) stimulation of cell proliferation, which increases the possibility of introduce errors in cell division and initiate an uncontrolled growth of cells of the mammary gland; (ii) mutagenic action of estrogens caused by the damage of DNA by reactive oxygen species produced upon oxidative-reductive reactions of estrogen metabolites; and (iii) direct damage to DNA by depurination, due to adducts formed by the binding of DNA with the quinones resulting from estrogen metabolism, which generates mutations that initiate BC. It is important to note that in Mexico women develop BC in the age a decade younger than women in other parts of the world, that is why the studies on the genetics factors that are responsible for this difference are of priority importance.

In this study we investigated the role of polymorphisms CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTP1 rs1695, GSTT1 null and GSTM1 null , which occur in genes involved in estrogen metabolism, specifically in the catechol estrogen pathway which is mediated by the nuclear estrogen receptor. We included in the study the genes for enzymes of phase I and phase II, to have a more complete idea of the importance of these polymorphisms in BC. We performed an epidemiological study of cases and controls with 300 women, 150 cases diagnosed with BC and 150 controls negative for this neoplasm. We found an association between polymorphisms CYP1A1 rs1048943 (OR 1.95, CI 1.13-3.36) and GSTP1 rs1695 (OR 2.39, 1.24-4.24) with the risk of breast cancer and this association was maintained when our study group was stratified by menopausal status. We also found that when a women carries 3-6 polymorphisms, increases the risk of developing BC (OR 3.75; C.I. 1.44-9.74) and this effect was more statistically significant in premenopausal women, highlighting the importance of these polymorphisms in the development of BC in young women.

Abstract

To corroborate the effect of the studied polymorphisms we designed a model *in vitro* with human leukocytes treated with 17 β - estradiol, and RT-PCR, HPLC and ³²P-labelling techniques were used to investigate the role of polymorphisms CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTP1 rs1695 and GSTM1 null in the modulation of mRNA levels, production of mutagenic and carcinogenic estrogen metabolite 4-CE₂, and DNA-adduct formation. A higher expression of CYP1A1 and CYP1B1 mRNA was detected in leukocytes with the "Combination of risk polymorphisms" (CYP1A1^{Val / Val}, CYP1B1^{Val / Val}, COMT^{Met / Met}, GSTP1^{Val / Val}, and GSTM1*0), as compared to leukocytes with "Combination of non-risk polymorphisms" (CYP1A1^{Ile / Ile}, CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val / Val}, GSTP1^{Leu/Leu} and GSTM1*1). The levels 4-CE₂ were also elevated in leukocytes with the "Combination of risk polymorphisms" as compared with leukocytes with the "Combination of non-risk polymorphisms". The levels of stable DNA adducts found were significantly higher in leukocytes with the combination CYP1A1^{Ile / Ile}, CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val / Val}, GSTP1^{Leu/Leu} and GSTM1*1. Both epidemiological and *in vitro* data on the association of BC and polymorphism obtained in this investigation must be confirmed with a greater sample to confirm the associations found, and also include other genes involved in estrogens metabolism.

Capítulo I Antecedentes

Cáncer de mama

El cáncer de mama (CaMa) es un desorden del crecimiento celular caracterizado por una proliferación excesiva alterada e incontrolada de las células de la glándula mamaria, esta proliferación puede estar dada por diversas causas entre ellas una acumulación de mutaciones que puedan activar la acción de oncogenes ó suprimir la acción de genes de reparación, estas mutaciones pueden iniciarse por la formación de sitios apurínicos provocados por los aductos formados entre el DNA y los metabolitos de los estrógenos exógenos y endógenos, dando como resultado una masa anormal (tumor) procedente de los tejidos originales (Escrich y cols., 2006). La neoplasia puede ser benigna o maligna, siendo esta última la que se conoce como cáncer, el cual pasa por un proceso que consta de varias fases: iniciación, promoción, y progresión (Forman y cols., 2004). Y se caracteriza por un rápido crecimiento, invasión, destrucción de los tejidos adyacentes y una diseminación hacia órganos lejanos (metástasis), que es la responsable, en la mayoría, de los casos de la muerte del individuo afectado.

CaMa: Incidencia y mortalidad

El CaMa es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres de todo el mundo (Fig 1), en el año 2008 el GLOBOCAN reporta más de un millón de casos en el mundo, y representa aproximadamente el 20% de todos los cánceres femeninos (Ferlay y cols., 2010). Para nuestro país en el año 2001 se estimó una tasa de mortalidad de 14.7 por 100 000 mujeres mayores de 25 años de acuerdo a esto, se ha estimado que diariamente mueren entre 8 y 11 mujeres mexicanas a causa de este cáncer (López-Carrillo y cols., 2001). En el año 2006 se reporta por primera vez que el CaMa superó al cáncer cervicouterino siendo este último el más frecuente en incidencia y mortalidad en años anteriores (Knaul y cols., 2009). (Fig 2)

Capítulo I Antecedentes

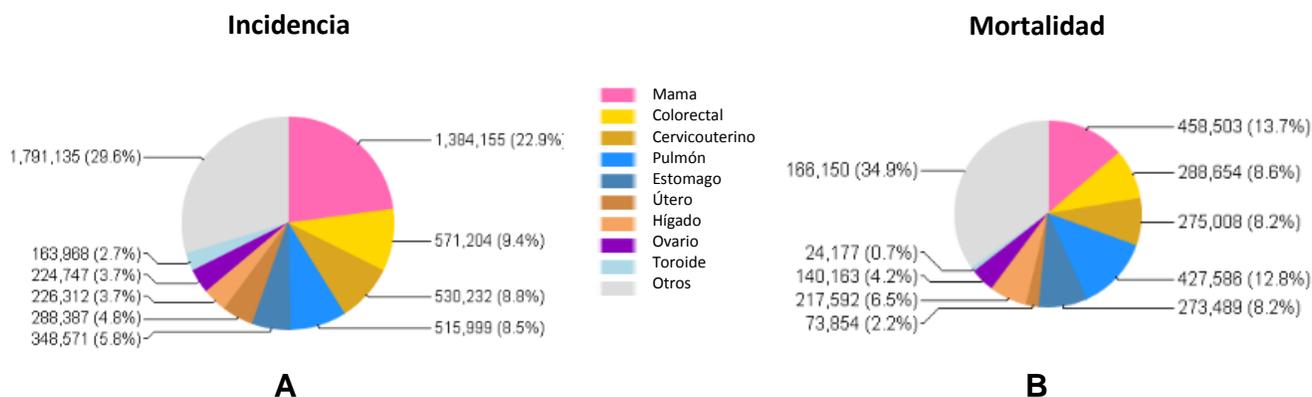


Fig 1.A) Incidencia de CaMa y B) Mortalidad por CaMa estandarizadas por edad de mujeres mexicanas. Tomado de International Agency for Research on Cancer. 2008.

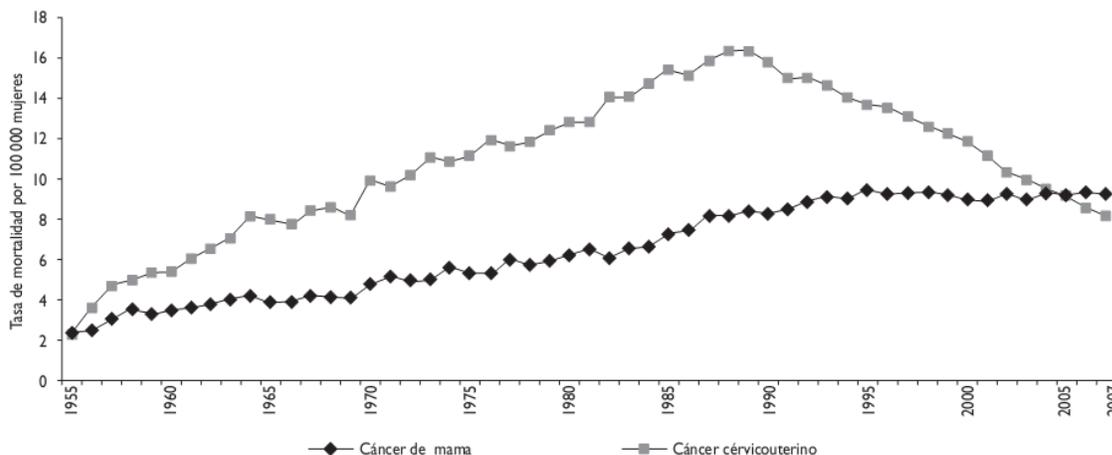


Fig 2. Mortalidad por CaMa y CaCu, tasa por 100,000 mujeres ajustada por edad. México, 1955-2007. Tomado de Knual, y cols., 2009.

Los países y regiones más desarrolladas tienen las más altas incidencias de CaMa, sin embargo no se encuentra restringido a países plenamente desarrollados ya que de los 520,000 fallecimientos anuales asociados a esta neoplasia en 2010, el 70% fueron registrados en países en vías de desarrollo, como México.

Capítulo I Antecedentes

En nuestro país se ha observado que también existen diferencias regionales en cuanto a la frecuencia del CaMa, la mayor incidencia se encuentra en los estados del norte y centro del país, los cuales, en general, son de un nivel socioeconómico más elevado, en contraste a los estados donde predomina la población indígena y el nivel socioeconómico es menor, como Chiapas y Oaxaca, la frecuencia en la incidencia del CaMa es mucho más baja. Esto se representa en la Figura 3, donde se muestra cómo los estados del norte y centro son los que presentan una tasa de riesgo relativo a morir por CaMa más elevada a comparación de los estados del sur de México (Vara-Salazar y cols., 2011).

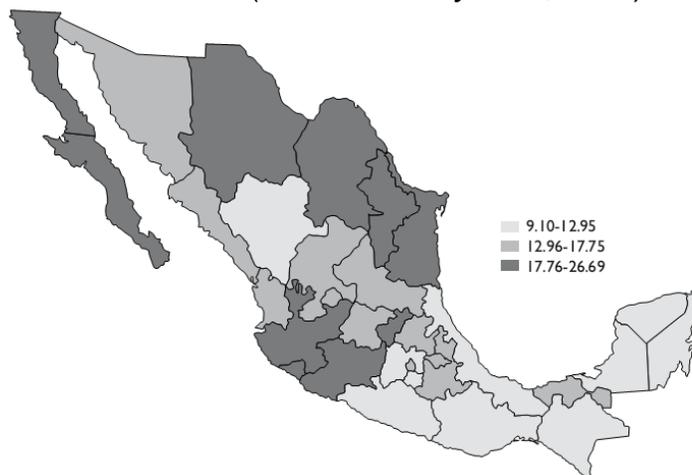


Fig 3. Mapa regional de riesgo relativo de mortalidad por CaMa en México. Tomado de Vara-Salazar y cols., 2011.

La frecuencia de las enfermedades oncológicas en México se ha incrementado en los últimos veinte años. Con base a datos de Registro Histopatológico de Neoplasias, cada año se diagnostican en nuestro país más de 11,000 pacientes con esta enfermedad, lo que representa un incremento del 18% en los tres últimos años, sin embargo vale la pena recalcar que en nuestro país el registro de la incidencia del CaMa no ha sido del todo confiable sino hasta hace aproximadamente 3 años, por lo que el aumento en la incidencia de esta neoplasia puede estar sobre-estimada debido a la actual base de datos.

Capítulo I Antecedentes

El INEGI reporta que en el año 2010 se detectaron 4,684 nuevos casos de CaMa, a diferencia del cáncer cervicouterino (CaCu) del cual se reportaron 1609 nuevos casos. (Fig. 4)

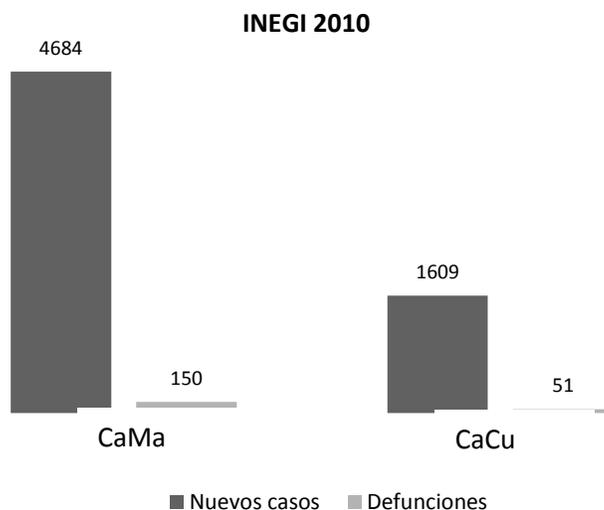


Fig 4. Número de nuevos casos y defunciones por CaMa y por CaCu registradas en el INEGI 2010. México

Según estudios realizados por el Consejo Nacional de Población, Se estima que en el año 2020 habrá alrededor de 29 millones de mujeres en edad de riesgo (Hidalgo-Miranda y cols., 2009).

En México el grupo de edad más afectado se encuentra en la quinta y sexta década de la vida y lamentablemente sólo de un 5 a un 10% de los casos se diagnostican en etapas clínicas tempranas (estadios 0 y I), Mohar y cols., en el 2009 reportan que en ese año sólo 10% de todos los casos se identificaron en etapa I (Mohar y cols., 2009), este panorama involucra un grave problema económico, ya que entre más avanzada sea la etapa del cáncer mayor es el costo de su tratamiento y peor su pronóstico.

La incidencia y mortalidad del CaMa en nuestro país, al igual que en el resto del mundo, ha tenido un ascenso con el paso de los años, y para nuestro país el número de defunciones ha aumentado considerablemente en mujeres mayores de 25 años (Vara-Salazar, 2011). (Fig. 5)

Capítulo I Antecedentes

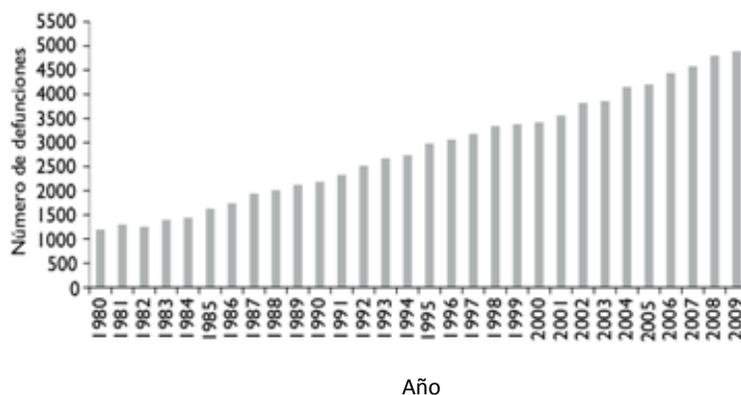


Fig 5. Defunciones en México por CaMa en mujeres de 25 años en adelante del año 1980 al año 2009. Tomado del boletín de práctica médica efectiva. Secretaría Nacional de Salud Pública. México.

Estructura de la glándula mamaria femenina

Las glándulas mamarias se localizan en la fascia superficial de la pared torácica anterior. Las mamas están fijadas en la fascia del músculo pectoral mayor subyacente y por encima de la dermis, por los llamados ligamentos suspensorios de Cooper. Las mamas están irrigadas principalmente por las arterias mamarias internas y externas. La linfa desemboca sobre todo en los ganglios linfáticos pectoral, axilar y subclavicular, aunque a veces porciones internas también están drenadas por los ganglios mamaros internos. Después de la pubertad, la mama femenina está formada por unos elementos glandulares y ductales dentro de un armazón compuesto por cantidades variables de tejidos fibroso y adiposo (Sugano & Ikawa, 1971). (Fig. 6)

Capítulo I Antecedentes



Fig 6. Estructura de la glándula mamaria femenina

A su vez, los elementos glandulares o lóbulos están formados por pequeños conductos secretores y ácinos, que constituyen las unidades terminales de un sistema ductal que se ramifica en forma de subdivisiones a partir de los conductos galactóforos principales. Antes de su entrada en el pezón cada conducto galactóforo, a menudo junto con glándulas sebáceas, forman los tubérculos de Montgomery que funcionan durante la lactancia como estructuras secretoras.

Las lesiones de la mama se localizan en los elementos glandulares, en los ductales o en soporte adiposo o fibroso. El riesgo de CaMa subsecuente a una lesión benigna está asociado a la categoría histológica en la que se clasifica la misma (Gail y cols., 1989). (Fig. 7)

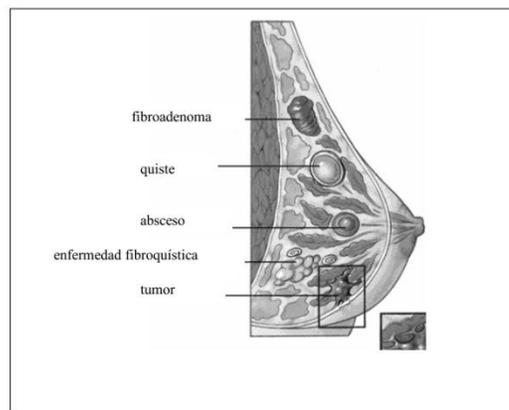


Fig 7. Localización de las lesiones de la glándula mamaria

Capítulo I Antecedentes

Tipos histológicos de CaMa

Aproximadamente el 90% de todos los tumores en la mama se originan en los conductos o los lóbulos.

La distribución de tipos histológicos del CaMa de mujeres mexicanas se representa en la siguiente Figura 8.

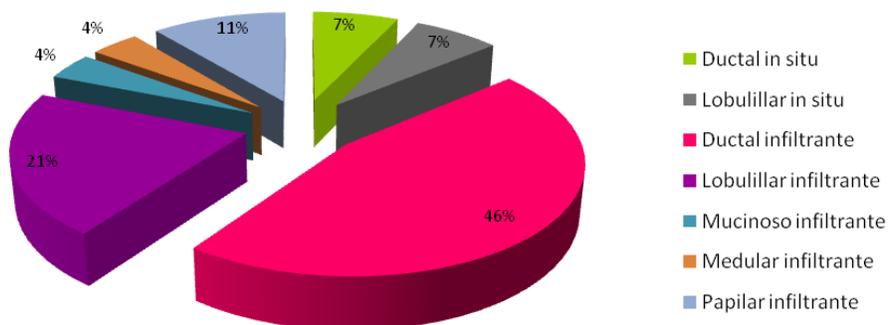


Fig 8. Porcentaje del tipo histológico del CaMa. Tomado del Boletín de Práctica Médica Efectiva. Secretaría Nacional de Salud Pública, 2010. México

Factores de riesgo para desarrollar CaMa

Actualmente el CaMa es considerado una enfermedad sistémica multifactorial, entre los factores de riesgo bien establecidos y no modificables encontramos la edad, el sexo, antecedentes familiares y etnia (Key y cols., 2001). Sin embargo, hay otros factores que son modificables que están relacionados con el ambiente y el estilo de vida. En México, el CaMa es un problema de salud pública, como consecuencia del aumento importante de la esperanza de vida y cambios en el estilo de vida. En la Tabla I se mencionan los principales agentes asociados a CaMa identificados mediante investigación epidemiológica durante los últimos años.

Capítulo I Antecedentes

Tabla 1. Factores de riesgo asociados con el CaMa.

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON EL CÁNCER DE MAMA		
	Alto riesgo	Bajo riesgo
Edad del término del primer embarazo (años)	≥ 30	<20
Edad de menarca (años)	<12	>12
Edad de menopausia (años)	≥55	<45
IMC	≥25	<24.9
Paridad	Nuliparidad	Multiparidad
Anticonceptivos hormonales (edad < 45 años)	Sí	No
Terapia hormonal de reemplazo	Sí	No
Historia familiar de cáncer	Sí	No

Sexo

Las diferencias biológicas, así como el grado de exposición a factores de riesgo hacen que algunos tipos de cáncer se desarrollen de forma diferenciada entre mujeres y hombres, en este sentido, el factor de riesgo más importante para sufrir CaMa es ser mujer, la relación de CaMa entre mujeres y hombres es aproximadamente de 100 a 1 (Hulka & Moorman y cols., 2001).

Edad

Los efectos acumulativos de la exposición a distintos factores ambientales hacen que el avance de la edad sea un factor de riesgo importante para presentar cualquier tipo de cáncer. Sin embargo, el CaMa muestra algunos rasgos distintivos en términos de las tasas de incidencia específicas por edad, a diferencia de la mayoría de los cánceres cuyas tasas de incidencia comienzan a aumentar al final de los 40 años, las tasas de incidencia del CaMa empiezan a aumentar desde los 20 años (Hulka & Moorman y cols., 2001), duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta que empieza la menopausia (McPherson y

Capítulo I Antecedentes

cols., 1994). Esto se ha atribuido a la capacidad de respuesta de los tejidos de la mama a las hormonas ováricas, que se encuentran activas desde la pubertad hasta la menopausia (Hulka & Moorman *y cols.*, 2001).

Etnia

La etnia modifica el riesgo de padecer CaMa ya que las diferencias raciales pueden modificar incidencia y mortalidad, siendo en algunas poblaciones, como la caucásica, más frecuente que en otras poblaciones, como la asiática, estas diferencias no pueden ser explicadas ni atribuibles a las diferencias socioeconómicas ni al acceso en los recursos de diagnóstico (Meng *y cols.*, 1997), por lo que hace más evidente la importancia de estudiar otros factores, como los polimorfismos genéticos.

Factores reproductivos

La observación de la asociación de CaMa con factores reproductivos fue una de las primeras evidencias en la descripción de factores de riesgo. Actualmente, muchos autores han confirmado dicha asociación bajo la hipótesis de que estas mujeres tienen una mayor exposición hormonal acumulada por los estrógenos.

Existen diversos estudios en los cuales se relacionan los niveles hormonales endógenos y el riesgo de desarrollar CaMa (Dorgan *y cols.*, 1997, Key *y cols.*, 1999). El tiempo de vida de exposición a hormonas sexuales endógenas es determinado por diversas variables como: edad de la menarca, edad del término del primer embarazo, número de embarazos y edad de la menopausia (Kabuto *y cols.*, 2000, Berkey *y cols.*, 1999, Apter *y cols.*, 1989, Bernstein *y cols.*, 1994).

La menarca a edad temprana, definida como la que ocurre antes de los 12 años, se ha vinculado con un incremento de 10 a 20% del riesgo de CaMa en comparación con el riesgo que tienen las mujeres cuya menarca ocurre después de los 14 años. Este riesgo se atribuye a que la edad temprana de la menarca implica un inicio más temprano de los ciclos ovulatorios, (Bernstein *y cols.*, 2002) y por consiguiente un aumento de la duración de la

Capítulo I Antecedentes

exposición a hormonas y un nivel más alto de estrógenos séricos durante la vida de la mujer (MacMahon & Trichopoulos y *cols.*, 1982). Asimismo, se ha observado que la edad de la menarca temprana se relaciona con niveles circulantes bajos de la hormona que se encarga de transportar a las hormonas sexuales SHBG (sex-hormone-binding -globulin), lo que implica una mayor biodisponibilidad de hormonas en el tejido glandular mamario (Dumitrescu & Cotarla y *cols.*, 2005, Bernstein y *cols.*, 2002).

Se han reportado riesgos relativos de 1.1 a 2 en mujeres cuya menarca ocurrió antes de los 12 años en comparación con aquéllas en las cuales sucedió a los 15 años o después (Kelsey & Horn-Ross y *cols.*, 1993).

De manera similar al aumentar la edad de la menopausia se aumenta el número de ciclos ovulatorios por lo que el riesgo se incrementa. Se ha reportado que por cada año que se retrasa la menopausia el riesgo de sufrir CaMa se incrementa aproximadamente un 3% (Henderson y *cols.*, 1985). También se ha observado que las mujeres posmenopáusicas con elevados niveles de estrógenos en plasma y suero incrementan considerablemente su riesgo de padecer CaMa (Blair y *cols.*, 2010).

Por otro lado, la edad temprana de la madre en el término del primer embarazo y la paridad han mostrado una relación con una disminución del riesgo de CaMa (Pathak y *cols.*, 2000). Las mujeres que conciben un producto antes de los 18 años tienen un tercio del riesgo respecto de aquéllas que lo hacen después de los 35 años (MacMahon y *cols.*, 1970). Con el primer embarazo se vincula la disminución de la división celular mamaria seguida por la diferenciación terminal del tejido glandular (Anderson y *cols.*, 1982). López-Carrillo y colaboradores señalaron que cuando las mujeres tuvieron el primer embarazo de término después de los 29 años, la posibilidad de presentar CaMa fue casi del doble en comparación con las personas que lo tuvieron antes de los 20 años (RM= 1.91; IC 95%: 1.12-3.24) (López-Carrillo y *cols.*, 1997).

El tiempo de lactancia también está relacionado con el riesgo de padecer CaMa, se ha sugerido que el mayor número de meses de lactancia materna se vincula con una disminución del riesgo de CaMa de la madre. El retraso en el restablecimiento de la ovulación y, por

Capítulo I Antecedentes

ende una disminución de los niveles de estrógenos y progesterona, se ha propuesto como un posible mecanismo de protección contra esta neoplasia a través de la lactancia materna (Honda y cols., 1998). Por otro lado, concentraciones séricas bajas de prolactina se han acompañado de un riesgo menor de CaMa y se ha observado que los niveles de prolactina son mayores en mujeres con fallas en la producción de leche en comparación con aquellas que refieren una producción suficiente ($p \leq 0.01$) (Pathak y cols., 2000).

En América Latina, la lactancia materna es mayor que en países con un mayor desarrollo económico, como Estados Unidos y algunos países de Europa occidental; pese a ello, esta práctica ha mostrado un descenso, en casi todo el mundo, lo cual ha reducido la protección que podría conferir contra la incidencia del CaMa.

Estilo de vida

Obesidad

La obesidad ha sido relacionada con altos niveles de estrógenos endógenos en mujeres posmenopáusicas debido a la cantidad de estrógenos circulantes derivados de la conversión de andrógeno a estrógeno en tejido adiposo por acción de la aromatasa (CYP19) (Lipworth y cols., 2000).

Los estudios clínicos han mostrado una asociación muy consistente entre el sobrepeso, en especial la distribución de la grasa, y un aumento en el riesgo de padecer CaMa, el cual es de un 40% en mujeres postmenopáusicas.

Blair, en el 2010, reporta que las mujeres con sobrepeso tienen un incremento del riesgo de padecer CaMa de 1.5 a 3.5 veces más que las mujeres sin sobrepeso, en el mismo año Khan y colaboradores, reportan que existe un riesgo incrementado de morir por CaMa en mujeres con un IMC ≥ 30 comparado con el que tienen mujeres con IMC ≤ 25 (Blair, 2010, Khan y cols., 2010).

Capítulo I Antecedentes

Tabaquismo

Los estudios que asocian el hábito de fumar con el riesgo de padecer CaMa suelen ser controversiales, ya que mientras que algunos reportan un efecto estadísticamente significativo con haber comenzado a fumar a temprana edad, consumir un alto número de cigarros e incluso ser fumador pasivo, otros estudios muestran que el tabaco tiene efectos antiestrogénicos, aunado a que las mujeres fumadoras comienzan la menopausia más jóvenes (Egan y cols., 2004, Ambrosone y cols., 1999, Wartenberg y cols., 2000) y por lo tanto estaría disminuyendo el riesgo de padecer CaMa.

Etilismo

En relación con el consumo de alcohol también existe controversia en que actúe como un factor de riesgo. Se han sugerido ciertos mecanismos biológicos para una asociación entre consumo de bebidas alcohólicas y CaMa, como es la interferencia con la permeabilidad de la membrana celular en tejido mamario (Freund y cols., 1979), exposición a productos citotóxicos circulantes de etanol (Wickramasinghe y cols., 1986) y función hepática alterada (Swann y cols., 1984).

En un análisis de seis estudios, el alcohol tuvo una asociación positiva del aumento del 15% en el riesgo cuando se consumía de una a cinco copas al día (Baron y cols., 1990, Smith y cols., 1994), y por otro lado, un estudio realizado por Khan en el 2010 reporta un 55% de aumento de riesgo para desarrollar CaMa cuando ingerían de 4 a 5 tragos por día (Khan y cols., 2010).

El mecanismo por el cual se asocia el consumo de alcohol con el riesgo de desarrollar CaMa aún no está totalmente comprendido, sin embargo las mujeres que consumen alcohol suelen tener altos niveles de estrógenos circulantes (Kuper y cols., 2000).

Cabe mencionar que este factor de riesgo no está muy asociado a población mexicana ya que menos del 5% de las mujeres mexicanas refiere tomar alcohol (Romieu & Lajous y cols., 2009).

Capítulo I Antecedentes

Dieta

La variabilidad geográfica en la incidencia del CaMa en el mundo fue una de las primeras observaciones para sugerir que las diferencias en los hábitos dietéticos podían relacionarse con el desarrollo de dicha neoplasia. El efecto de la migración en el riesgo de CaMa añadió más información en este sentido, ya que las mujeres japonesas residentes en Japón con un bajo riesgo de CaMa lo incrementaron al emigrar a Hawai, y aún más al nacer y permanecer en Estados Unidos de América (Nelson y cols, 2006), lo cual sugiere que, entre otros factores ambientales, el cambio de la dieta oriental a la occidental es un determinante de dicho riesgo. Los alimentos contienen diferentes nutrimentos y compuestos que pueden iniciar, acelerar o disminuir el desarrollo de un tumor maligno, por ejemplo se ha reportado que las frutas y vegetales por ser una fuente natural de antioxidantes son capaces de reducir el riesgo de alguna neoplasia, por otro lado se ha reportado un aumento de riesgo con el consumo frecuente de carne (Reichman y cols., 1993, Lee y cols, 1999, McKeown y cols, 1999). Khan en el 2010 reporta que el consumo de grasas saturadas se asocia directamente con un aumento del riesgo de padecer CaMa (Khan y cols., 2010).

Estrógenos exógenos

El uso de los estrógenos exógenos es muy común entre las mujeres tanto premenopáusicas, para control natal, como posmenopáusicas para evitar las consecuencias negativas de la menopausia. Para el caso del riesgo que confieren los anticonceptivos orales, en un meta-análisis con datos de 54 estudios se reporta que el uso de anticonceptivos orales aumenta un 24% el riesgo de padecer CaMa y este riesgo desaparece después de 10 años de haber terminado el tratamiento (Henderson y cols., 1985).

En el caso de la terapia hormonal de reemplazo los datos de 51 estudios indican que el riesgo aumenta un 35% por 5 años o más de tratamiento y este riesgo se elimina después de 5 años de haber suspendido su uso (Feigelson & Henderson y cols, 1996).

Capítulo I Antecedentes

Factores genéticos

Las mutaciones en los genes supresores BCRA1 y BCRA2 tienen una estrecha relación con la historia familiar del CaMa, estos genes son denominados como de alta penetrancia ya que se ha observado que las mutaciones de estos genes aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar una neoplasia de la glándula mamaria, Hidalgo-Miranda en el 2009 reporta que las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 confieren alrededor de 15 a 20% del riesgo relativo para desarrollar CaMa en la población caucásica.

Existen otros genes importantes en la etiología del CaMa como los genes TP53, ATM y PTEN.

Las mutaciones en TP53, dentro del marco del síndrome de Li-Fraumeni, también puede considerarse como de alta penetrancia, ya que las pacientes con este síndrome presentan un riesgo significativamente elevado de padecer CaMa.

También en los síndromes de Cowden (mutaciones en PTEN), Peutz-Jeghers (STK11) y el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario (mutaciones en CDH1) se ha identificado una mayor susceptibilidad a desarrollar CaMa. Sin embargo, las mutaciones en TP53, PTEN, STK11 y CDH1 son muy raras en los tumores esporádicos de la glándula mamaria (Maza-Fernández *y cols.*, 2009).

Por otro lado, existen diversos genes de baja penetrancia que han sido estrechamente relacionados con el aumento del riesgo de padecer CaMa, algunas de las enzimas que se han asociado con mayor frecuencia son las de los genes involucrados en el metabolismo de los estrógenos (Paracchini *y cols.*, 2007, Mohr *y cols.*, 2003, Mitrunen *y cols.*, 2001, Simpson *y cols.*, 1994, Yue *y cols.*, 2003, Long *y cols.*, 2007), ya que como hemos visto, la exposición a estrógenos es el principal factor de riesgo para padecer CaMa.

Estos genes relacionados con el metabolismo de estrógenos tienen diversas variantes polimórficas que pueden conferir diferentes niveles de actividad enzimática, pudiendo afectar el número de metabolitos carcinogénicos resultantes y posiblemente el riesgo individual a desarrollar un cáncer de la glándula mamaria.

Capítulo I Antecedentes

Susceptibilidad genética individual

Actualmente se ha reconocido la importancia de los factores genéticos de susceptibilidad que aumentan el riesgo de padecer cáncer. Se ha observado un incremento en la frecuencia de enfermedades genéticas raras y en la predisposición a padecerlas si se pertenece a la misma familia y más aún si se es portador de la mutación responsable de la enfermedad. Por ejemplo, se ha determinado que la presencia de una enfermedad genética rara puede aumentar el riesgo de desarrollar cierto tipo de cánceres, que en la población general tienen una frecuencia muy baja, como es el caso de la ataxia telangiectasia cuyos individuos afectados presentan un 60% de probabilidad de desarrollar linfoma y 27% de probabilidad de sufrir leucemia (Pecorino *y cols.*, 2008).

Por otro lado, se ha estimado que los familiares de un paciente con cáncer tienen una mayor probabilidad de desarrollar el mismo tipo de cáncer, o algún otro, debido a la carga genética. Además, se han documentado casos familiares de cánceres de colon y de mama, principalmente, en los que la presencia de mutaciones específicas son determinantes en el desarrollo del cáncer (Yue *y cols.*, 2003). Todas estas evidencias confirman la existencia de la susceptibilidad genética al cáncer, sin embargo, no todos los tipos de cáncer tienen una relación directa con mutaciones específicas, por lo que definir la contribución exacta de los factores genéticos en la susceptibilidad al cáncer ha sido muy difícil. Gracias a los estudios acerca del papel que desempeñan los genes de alta penetrancia y los de baja penetrancia se han logrado avances significativos en el entendimiento de la genética del cáncer.

Los genes de alta penetrancia tienen una frecuencia relativa baja, se encuentran relacionados en el 5-10% de los casos de cáncer (Houlston y Peto *y cols.*, 2004). Estos genes fueron identificados en enfermedades autosómicas dominantes mediante análisis de ligamiento y de clonación posicional realizados en familias completas (Suh *y cols.*, 2005). Estos genes presentaban alelos mutados que al ser heredados aumentaban considerablemente la susceptibilidad al cáncer, estos hallazgos han sido muy importantes para establecer numerosos aspectos de su biología. Algunos ejemplos de genes de alta penetrancia en

Capítulo I Antecedentes

cáncer son; *BRCA1* y *BRCA2* en cáncer de mama y ovario, *RB* en retinoblastoma, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2* en cáncer de colon hereditario no polipósico (Balmain y cols., 2003).

Como se mencionó anteriormente, los genes de alta penetrancia tienen una baja frecuencia en la población general y no explican todos los casos de cáncer presentes actualmente, es por ello que se ha puesto gran énfasis en la identificación y el estudio de genes de baja penetrancia implicados en el desarrollo del cáncer. Los genes de baja penetrancia corresponden a genes que codifican proteínas que juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, por ello se les ha denominado *genes candidatos*, estos genes pueden presentar mutaciones que alteran la función de la proteína codificada, ya sea disminuyendo, aumentando o suprimiendo su actividad y/o función. Por lo tanto, existen otras variantes además de las silvestres, a las cuales se les conoce como variantes polimórficas y a las mutaciones que las originan polimorfismos. Los genes de baja penetrancia tienen una frecuencia más alta en la población general, desde 0 hasta 100% en algunas poblaciones, sin embargo el número de genotipos de riesgo presentes en un individuo son los que determinarían su susceptibilidad al cáncer (Fletcher & Houlston y cols., 2010).

En este contexto, se ha planteado el modelo aditivo (*log additive model*) el cual considera que cada genotipo de riesgo tiene un efecto pequeño y la presencia de más alelos de riesgo, hasta cientos o miles de ellos que van teniendo un efecto aditivo, son los que determinan la susceptibilidad genética al cáncer (Pharoah y cols., 2004), principalmente en los casos de cáncer esporádico.

Como se mencionó anteriormente el cáncer es de origen multifactorial por lo que tanto la exposición ambiental, como los factores genéticos son de suma importancia en su desarrollo, para explicar lo anterior se han postulado cuatro modelos básicos para definir la interacción entre los factores genéticos y los factores ambientales (Giarelli & Jacobs y cols., 2005). (Fig 9).

Capítulo I Antecedentes

Susceptibilidad genética

- ✚ Genes importantes en el desarrollo de la enfermedad
- ✚ Polimorfismos en genes de baja penetrancia
- ✚ Efecto aditivo

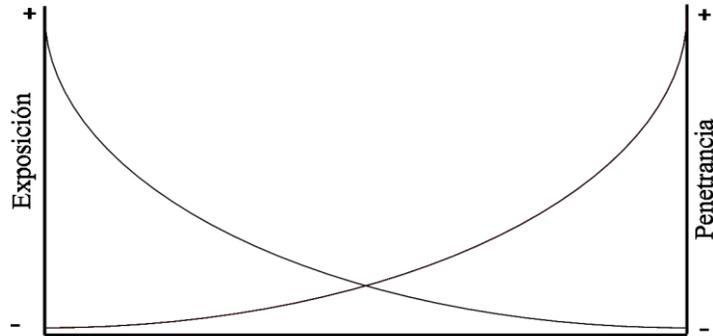


Fig 9 Penetrancia de los genes y su relación con la exposición

1. Ninguno de los factores que actúan de forma independiente determina el riesgo de cáncer, es necesaria la combinación de ambos: factores genéticos y ambientales.
2. La presencia de factores genéticos aumenta el efecto de un factor ambiental de riesgo ya presente.
3. El factor ambiental incrementa el efecto de un factor genético ya presente.
4. Ambos factores influyen en el riesgo de forma independiente, pero el riesgo es mayor si existen ambos simultáneamente.

Actualmente se ha reconocido que ambos factores (genéticos y ambientales) son muy importantes en el desarrollo de cánceres esporádicos, razón por la cual es indispensable considerar ambos en el diseño y análisis de los estudios referentes al cáncer.

Capítulo I Antecedentes

Enfermedades benignas de la glándula mamaria

Muchos estudios reportan que mujeres con enfermedad benigna de mama incrementan el riesgo de CaMa de dos a tres veces. Se sugiere que dicho incremento se presenta en mujeres con lesiones proliferativas, hiperplasia atípica, hiperplasia papilar y adenosis esclerosa (Dupont & Page, 1985) . La historia de cáncer primario de mama incrementa de tres a cuatro veces el riesgo para CaMa contralateral (Anderson & Badzioch, 1985) .

Estrógenos

Biosíntesis y metabolismo de los estrógenos

El estrógeno natural más potente en seres humanos es el 17 beta-estradiol ($17\beta\text{-E}_2$), seguido por la estrona y el estriol, cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos (Duax y cols., 1988).

Los estrógenos son biosintetizados a partir de precursores androgénicos, testosterona y androstenediona. Las enzimas que intervienen en su conversión a estrógenos constituyen un grupo de aromatasas: el grupo enzimático de los citocromos CYP450. Estas enzimas se encuentran en la granulosa del ovario, el tejido adiposo, los fibroblastos de la piel, la placenta, el cerebro, entre otros. El ovario es el sitio de mayor concentración de estrógenos y su síntesis se estimula por la hormona folículo estimulante (FSH) (Simpson y cols., 1994). En la posmenopausia, los sitios de metabolización extra-ováricos cobran importancia, fundamentalmente el tejido adiposo y la piel, por lo que la aromatización de los andrógenos está directamente relacionada con el volumen de tejido adiposo presente en cada mujer (Dunn & Bradbury, y cols 1967). Existe una tercera fuente de producción estrogénica que es en la propia glándula mamaria, la mayoría de los estrógenos presentes en los tumores mamarios derivan principalmente de las síntesis de novo en dicha glándula (Delgado y cols., 2008).

Capítulo I Antecedentes

De hecho, las concentraciones de $17\beta\text{-E}_2$ presentes en los tejidos cancerígenos de mama no se diferencian entre mujeres pre y postmenopáusicas, mientras que los niveles circulantes son 90% más bajos en la postmenopausia, confirmando la teoría de la producción local de estrógenos.

Este fenómeno se explica por el proceso de esteroidogénesis mamaria, en el cual intervienen complejos enzimáticos principales: la aromatasa, que convierte principalmente androstendiona a estrona, siendo éste el sistema enzimático más importante en la producción estrogénica de *novo* en la mama y está ubicado en el estroma. La sulfatasa de estrógenos, que hidroliza el sulfato de estrona a estradiol. El 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa ($17\beta\text{HSD}$), que aunque es una enzima bidireccional, convierte estrona a estradiol (Blair y *cols.*, 2010).

El estradiol está presente en el plasma y el suero en forma libre y puede unirse a proteínas de unión a esteroides, el estradiol viaja unido a estas proteínas y actúa en los tejidos blanco para ejercer su acción metabólica (Blair y *cols.*, 2010).

Una vez en el tejido blanco, el estradiol es metabolizado principalmente por enzimas denominadas citocromos p450.

Existen diversos compuestos esteroideos y como se mencionó anteriormente el estrógeno natural más potente que se ha reportado es el $17\beta\text{-E}_2$, por lo que nos enfocaremos a este estrógeno debido a su importancia fisiológica y carcinogénica.

Metabolitos carcinogénicos del $17\beta\text{-E}_2$

La mayoría de los estrógenos tienen un anillo aromático (anillo A), un grupo hidroxilo en el C-3 y un grupo metilo en la posición C-13. El estradiol puede ser hidroxilado en dos posiciones del anillo A, ya sea en el carbono 2 ó en el carbono 4 formando catecolestrógenos (CE), o puede ser hidroxilado en el anillo D, formando 16-hidroxiestradiol. Se sabe que el metabolismo predominante es hacia la formación de los CE en el anillo A, mientras que en el anillo D es sólo del 10%, por lo que nuestro trabajo se enfoca principalmente a los CE y a

Capítulo I Antecedentes

la ruta por la que son metabolizados, la cual se denomina vía catecol (Liehr y *cols.*, 1986, Mitrunen & Hirvonen, 2003).

El metabolismo de los estrógenos está mediado por la acción de varios citocromos P450. En el hígado participan CYP1A2 y CYP3A4, y en tejidos extra hepáticos CYP1A1 y CYP1B1. El CYP1A1 convierte 17β -E₂ en 2-catecol estradiol (2-CE₂), y debido a la falta de especificidad de la enzima, también se forma entre 15-20% de 4-CE₂. Por el contrario, el CYP1B1 es más específico y convierte 17β -E₂ exclusivamente en 4-catecol estradiol (4-CE₂); en una biopsia de tejido de CaMa la concentración del 4-CE₂ comparada con la de 2-CE₂ es 4:1 (Liehr y *cols.*, 2000), lo que sugiere que el 4-CE₂ tiene un papel más importante en la carcinogénesis en comparación con el 2-CE₂.

Los CE se metilan por acción de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) formando metoxide-derivados, los cuales son menos reactivos; si los CE no son metilados, sufren dos oxidaciones mediadas por los citocromos P450 y forman catecol estrogénos quinonas (CE-Q), estas quinonas pueden conjugarse con glutatión por acción de las glutatión S-transferasas (GSTT1, GSTM1 y GSTP1), o ser reducidas a CE por quinonas reductasas (Mitrunen & Hirvonen y *cols.*, 2003). Las quinonas formadas por el estradiol juegan un papel muy importante en relación con el CaMa, debido a su capacidad de unirse al DNA y formar aductos.

Se ha demostrado que los estrógenos inducen aneuploidia y cambios estructurales en cromosomas (Zheng y *cols.*, 1998). Los estudios biológicos en animales identifican claramente al estradiol como un carcinogénico (Liehr y *cols.*, 1986, Zhu & Conney, 1998) y de acuerdo a la IARC, ésta es evidencia suficiente para considerarlo carcinogénico en humanos (Nandi y *cols.*, 1995).

Dentro de los efectos carcinogénicos documentados de los estrógenos se encuentran (i) estimulación de la proliferación celular, aumentando la posibilidad de introducir un error en la división celular y así iniciar un crecimiento descontrolado de las células de la glándula mamaria , (ii) daño por especies reactivas de oxígeno, al producirse oxidaciones y reducciones de los metabolitos derivados de los estrógenos y (iii) daño directo en el DNA por formación de sitiosapurínicos debido a la inestabilidad de los aductos formados con el

Capítulo I Antecedentes

DNA, aumentando así el riesgo de introducir una mutación en el material genético (Kabuto y cols., 2000, Zhu & Conney y cols., 1998, Nandi y cols., 1995, Jefcoate y cols., 2000).

Existen diversas evidencias experimentales que comprueban que los metabolitos del estradiol pertenecientes a la vía catecol pueden ser iniciadores del proceso canceroso; como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 Daño al DNA, mutaciones y transformación celular asociadas con los estrógenos y sus metabolitos

Metabolito carcinogénico	Efecto	Modelo	Referencia
4-CE ₂	Pérdida de heterocigocidad en Genes BCRA1 y BCRA2	Línea celular MCF-10	(Fernández y cols., 2006)
	Amplificación genética de c-myc	Hámster	(Liehr y cols., 2000)
	Transformación neoplásica desarrollo de tumores	Células embrionarias de hámster	(Yager & Davidson y cols., 2006)
E ₂ -3,4-Q	Tumores de animales	Ratas y ratones	(Cavalieri & Rogan y cols., 2004)
	Delección gen TP53	Células de epitelio de mama	(Cavalieri y cols., 2006)
	Mutación en el gen H-Ras	Glándulas mamarias de ratones y ratas	(Cavalieri y cols., 2006)

También existen trabajos que reportan las diferencias en los niveles de metabolitos carcinogénicos encontrados en tejido de biopsias de CaMa y en tejido sano. (Tabla 3)

Capítulo I Antecedentes

Tabla 3. Diferencias en la concentración de metabolitos carcinogénicos en tejidos con CaMa vs tejido sin CaMa.

Metabolito	Tejido Ca.Ma. vs Tejido sin CaMa.		Referencia
4-CE ₂	+++++	++	(Cavalieri y cols., 2006)
2-CE ₂	++	+++++	(Yue y cols., 2003)

Enzimas del metabolismo de estrógenos y polimorfismos genéticos

Los estrógenos son principalmente metabolizados, vía los RE α y Re β y pueden producir ROS y metabolitos carcinogénicos, como los CE.

En la vía que metabolizan los CE participan enzimas de activación como el CYP1A1 y el CYP1B1, así como enzimas de desactivación como la COMT, esta homeostasis entre la activación de los CE y la desactivación puede verse afectada por variantes polimórficas en los genes que codifican para las enzimas relacionadas en este metabolismo, y como consecuencia pueden aumentar los niveles de los metabolitos carcinogénicos como el 4-OHE₂ y por lo tanto la formación de aductos con el DNA.

Algunas de las variantes alélicas que pueden modificar los niveles en la formación de los CE, quinonas y aductos, producto del metabolismo del 17 β -estradiol se muestran en la Figura 10.

Capítulo I Antecedentes

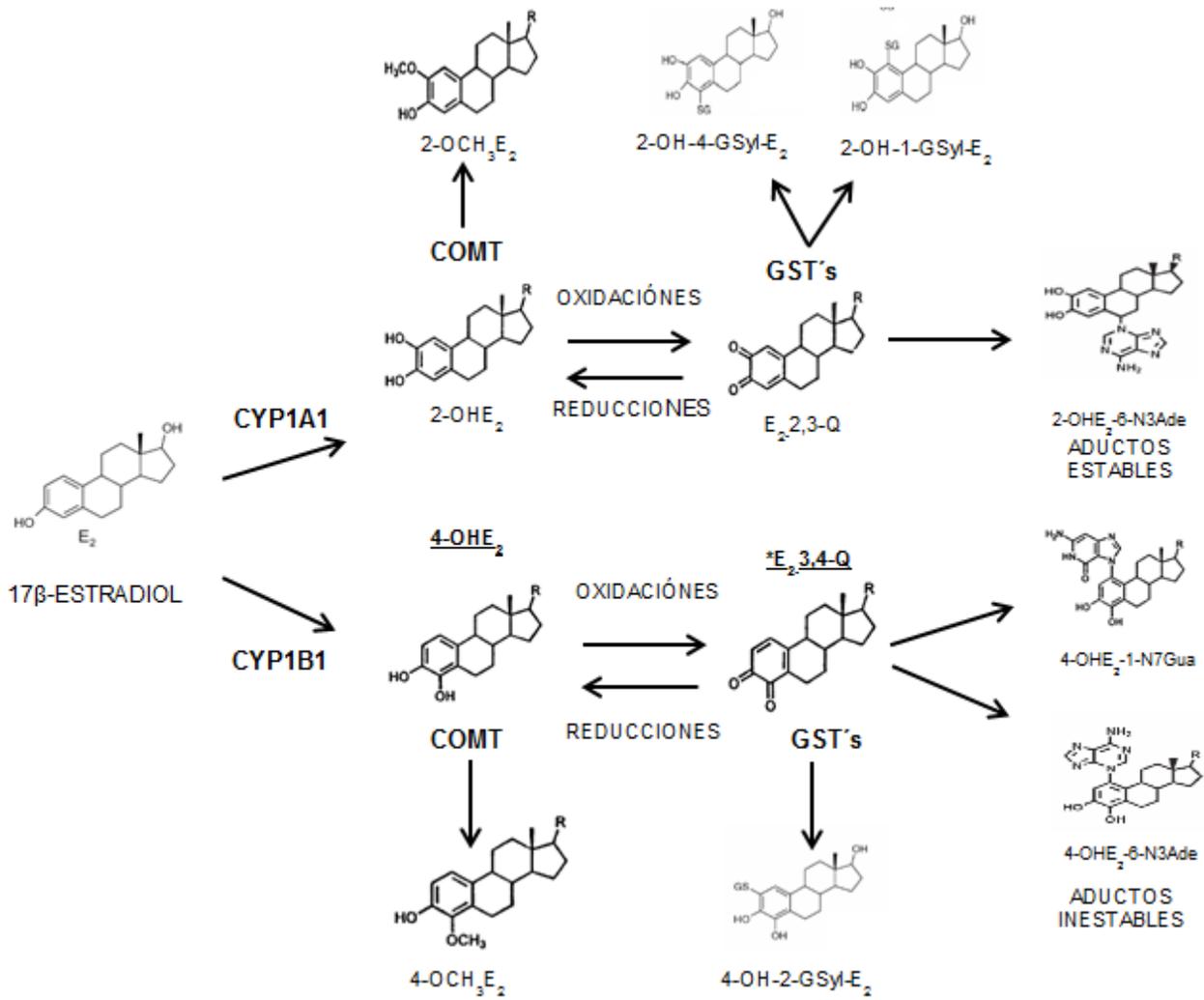


Fig 10. Vía catecol del metabolismo de los estrógenos

Capítulo I Antecedentes

Citocromo P-450 (CYP-450)

Los citocromos P-450 son un grupo de proteínas que participan en el metabolismo oxidante de las células. La denominación P-450 es debida a que absorben la luz ultravioleta en presencia de monóxido de carbono a una longitud de onda de 450 nm.

Estas enzimas metabolizan sustancias biológicas exógenas y se localizan en el retículo endoplásmico liso (Schiaffino *y cols.*, 2002).

Los citocromos son distribuidos en diversos tejidos y se encuentran predominantemente en el hígado, sin embargo también se han encontrado en otros tejidos como intestino, pulmón, riñón, cerebro, leucocitos y placenta. Los sustratos fisiológicos de los CYP's incluyen esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas y diversos xenobióticos

Las enzimas citocromo P450 son las principales responsables del metabolismo de xenobióticos y estrógenos, estas enzimas catalizan reacciones de fase I generalmente introduciendo un grupo funcional hidrofílico.

Las enzimas P450 son polimórficas debido a variaciones genéticas que pueden ser ocasionadas por sustitución, inserción o delección de bases, estas variantes alélicas producen abolición, disminución, incremento o alteración de la actividad enzimática (Tenhunen *y cols.*, 1999).

En el metabolismo de las hormonas esteroideas en tejidos extrahepáticos son el CYP1A1 y el CYP1B1 los principales encargados de hidroxilar a los estrógenos y así producir los metabolitos con potencial carcinogénico.

Otros genes de baja penetrancia muy relacionados con el riesgo de padecer CaMa son las enzimas de fase II, tales como: COMT, GSTM1, GSTT1 y GSTP1, las cuales van a metilar ó conjugar con glutatión los diversos metabolitos, con el fin de hacerlos menos activos y evitar algún daño al material genético.

Capítulo I Antecedentes

Citocromo 1A1 (CYP1A1)

El gen CYP1A1 se encuentra en el cromosoma 15 (15q22-q24), está formado por 7 exones y participa en el metabolismo del 17β -E₂ transformándolo en 2-CE₂, que junto con la participación de enzimas de fase II permiten la excreción de estos esteroides y de otros xenobióticos. En este proceso algunos metabolitos que se producen son altamente carcinogénicos y pueden causar daño al DNA participando en el desarrollo de cáncer (Simpson y cols., 1994, Yue y cols., 2003).

Existen más de once alelos del CYP1A1, identificados como CYP1A1*2B,*2C,*3,*4,*5,*6,*7,*8,*9 y*11,(Bozina y cols., 2009) los cuales muestran un cambio en un aminoácido, y algunos de ellos se han asociado con el riesgo de padecer CaMa: una sustitución de C por A que determina el cambio de aminoácido en el codón 461 de asparagina por treonina (Asn461Thr), una transición de A por G en el nucleótido 4889 del exón 7 que produce un cambio de aminoácido de isoleucina a valina (Ile462Val) y una transición de T por C en el extremo 3' de la región no-codificante en el nucleótido 6235, el cual genera un sitio de restricción para la enzima MspI (Fig. 11). Estos polimorfismos han sido llamados CYP1A1*2A, CYP1A1*2B/2C y CYP1A1*4 respectivamente, de estos polimorfismos el que más se ha relacionado con el CaMa en diversos estudios es el CYP1A1*2C (De Vivo y cols., 2002, Weber & Nathanson, 2000), este gen se expresa en tejidos como mama, pulmón, leucocitos, intestino, entre otros (Zhang y cols., 1996) .

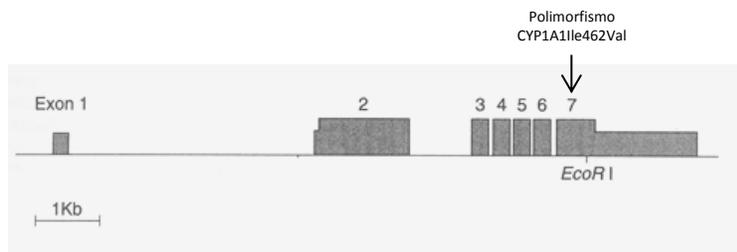


Fig 11. Organización estructural del gen CYP1A1 y ubicación del polimorfismo CYP1A1 Ile462Val

Capítulo I Antecedentes

Citocromo 1B1 (CYP1B1)

El gen CYP1B1 está localizado en el cromosoma 2 (2p21-p22), tiene 3 exones y codifica para una enzima con acción estrógeno hidroxilasa que cataliza la formación de 4-CE₂, el cual es un metabolito estrogénico con actividad carcinogénica.

El CYP1B1 es expresado en retículo endoplásmico de órganos extra hepáticos, predominantemente en tejidos esteroideogénicos como útero, ovario, mama, próstata y glándula adrenal, sin embargo también se expresa en otros tejidos como riñón, cerebro, corazón, colon, intestino y leucocitos (Bozina y cols., 2009).

Hasta la fecha se han identificado en humanos 26 polimorfismos de este gen, 19 de éstos tienen un cambio de aminoácido y una variante nula que se relaciona con glaucoma hereditario (Bozina y cols., 2009).

Dentro de estos polimorfismos el que se relaciona fuertemente con el CaMa es el polimorfismo m1 (CYP1B1*3). El m1 es una transversión de G por C produciendo un cambio de aminoácido valina por leucina en el codón 432 (Val432Leu) del exón 3 creando el sitio de restricción para la enzima Eco57I. (Oldenburg y cols., 2007, Miyoshi & Noguchi y cols., 2003). (Fig. 12)



Fig 12. Organización estructural del gen CYP1B1 y ubicación del polimorfismo CYP1B1 Leu432Val

Capítulo I Antecedentes

Catecol-O-metiltransferasa (COMT)

El gen COMT se localiza en la región 11.2 del brazo largo (q) del cromosoma 22. Se compone de seis exones, de los que sólo son codificantes los 4 últimos. En humanos COMT codifica 2 transcritos a partir de dos promotores, uno de 1.5 Kb y otro 1.3 Kb.

Varios elementos reguladores en el gen COMT parecen explicar diferentes expresiones de ambos transcritos en diversos tejidos. Uno de ellos es la existencia de varios elementos de respuesta a estrógenos a lo largo del gen, de modo que los estrógenos tienden a reducir la expresión de COMT (Xie y cols., 1999).

El gen COMT presenta una serie de variantes polimórficas de base única, definidas por cambios en un codón de su secuencia de DNA. Algunas de estas variantes, debido a cambios significativos en los aminoácidos codificados, conducen a variantes de la proteína con una distinta capacidad funcional. Aunque es posible encontrar varios cientos de variantes polimórficas de este gen, un número limitado de ellas son actualmente conocidas por producir cambios sustanciales en la capacidad funcional del enzima COMT.

El polimorfismo rs4680 (anteriormente rs165688) fue descrito en los años 90 y consiste en una sustitución de guanina por adenina que se traduce en una sustitución de valina a metionina en la posición 158 de MB-COMT o en la 108 de S-COMT, razón por la cual es comúnmente conocido como COMT Val158Met. El cambio de este aminoácido supone una diferencia substancial en la función enzimática debido a que metionina es un aminoácido hidrófilo, mientras que valina es hidrófobo. Esta variación conduce a un cambio conformacional de la proteína COMT, haciendo que las formas Met158 sean menos termoestables. Esta menor estabilidad implica que la enzima sea menos activa a temperaturas fisiológicas y de hecho, en muestras de tejido cerebral se ha demostrado que los sujetos homocigos con la variante Met158 tienen una actividad de COMT un tercio menor que aquellos sujetos homocigos para la forma Val158. Estos alelos son codominantes (en sujetos heterocigos, la mitad de las moléculas enzimáticas serán Val158 y la otra mitad Met158) de modo que los sujetos heterocigos presentan una actividad enzimática intermedia, lo cual explica la distribución trimodal de los niveles de actividad del enzima COMT. Debido a esta diferente capacidad funcional, el alelo Val158 también se denomina alelo H (del inglés, High activity =

Capítulo I Antecedentes

actividad elevada) y el Met158, L (del inglés, Low activity = baja actividad) (Floderus y cols., 1981).

Glutación S-transferasas (GST's)

Estas enzimas catalizan la conjugación del glutatión con diferentes especies de compuestos electrofílicos por lo que su función principal es proteger a las células de la acción de especies reactivas del oxígeno. Estas proteínas han sido encontradas en sistemas eucariotes y procariontes en citoplasma, microsomas y mitocondrias (Rebbeck y cols., 1994, Landi y cols., 2000).

Existen seis clases diferentes: la Alpha (α) codificadas por el gen GSTA1-2 localizado en el cromosoma 6; la Mu (μ) codificadas por el gen GSTM1-5 localizado en el cromosoma 1; la Omega (ω) codificadas por el gen GSTO1 localizado en el cromosoma 10; Pi (π) codificadas por el gen GSTP1 localizado en el cromosoma 11; Theta (θ) codificadas por el gen GSTT1-2 localizado en el cromosoma 22 y las Zeta (ζ) codificadas por el gen GSTZ1 localizado en el cromosoma 14. Las clases μ y π predominan en el tejido de la glándula mamaria (Tavtigian y cols., 1996).

Los polimorfismos asociados a cáncer de mama de las glutatión S-transferasas de los tipos μ y θ tienen fenotipos nulos (GSTM1*0 GSTT1*0) causados por una delección en el gen conduciendo a una pérdida de su función (Landi y cols., 2000). Los polimorfismos de GSTM y GSTT se denominan GSTM1*1 y GSTT1*1 para la versión silvestre y GSTM1*0 y GSTT1*0 para la variante nula. En la clase π (Pi) se ha descrito un cambio de A por G en el nucleótido 313 produciendo un cambio de aminoácido de isoleucina a valina en el codón 105 (Ile105Val) (Townsend y cols., 2003).

Estas enzimas se han visto expresadas en leucocitos, pulmón, riñón, cerebro, músculo, corazón, intestino delgado, glándula mamaria y colon (Landi y cols., 2000).

Capítulo I Antecedentes

Glutación-S- transferasa Pi-1 (GSTP1)

El gen GSTP1 se localiza en la posición 11q13.2 siendo el único miembro de la familia Pi, como las otras GST's, esta enzima juega un papel central en la inactivación de compuestos electrofílicos tóxicos y carcinógenos, presenta afinidad por diversos sustratos, entre ellos algunos derivados del benceno y de estrógenos (Zimniak y cols., 1994).

Se han reportado pocos polimorfismos en este gen y el más estudiado es el GSTP1 Ile105Val, el cual fue caracterizado bioquímicamente por Zimniak y cols., 1994 quienes reportaron que las variantes Ile105 y Val105 presentan características físico-químicas muy similares, incluso en la afinidad por el glutati6n. Sin embargo, la variante Val105 presenta un valor de Km de 3 M usando como sustrato el 1-cloro-3,4- dinitrobenceno, mientras que la Km de la variante Ile105 es de 0.82 M, as4 mismo los valores de K_{cat} son de 58.8 y de 52.5 para Ile105 y para Val105, respectivamente; esto sugiere que la variante Val105 es menos eficiente para desintoxicar al organismo de compuestos electrofílicos reactivos.

Por otro lado, se ha reportado que el gen GSTP1 es inactivado por hipermetilaci6n en estadios tempranos del desarrollo carcinog6nico y se encuentra sobre-expresado en c6lulas tumorales, lo cual contribuye a la resistencia del tumor hacia los f6rmacos antic6ncer (Harries y cols., 1997). Adem6s, algunos estudios epidemiol6gicos han asociado el genotipo GSTP1 105 Val/Val con la susceptibilidad a padecer CaMa (Sreeja y cols., 2008).

Glutati6n-S- transferasa Mu-1 (GSTM1)

La familia μ (Mu) se encuentra organizada en tand6m dentro del cromosoma 1p13 y la enzima GSTM1 es uno de los cinco miembros que la conforman. La GSTM1 conjuga compuestos derivados del metabolismo primario de HAP's, como ep6xidos y ROS generadas durante el estr6s oxidante; la falta de esta enzima favorece que los compuestos bioactivados por el metabolismo de Fase I generen aductos en el DNA (Hayes y cols., 2005).

Capítulo I Antecedentes

Los genes de esta familia pueden tener deleciones (GSTM1 y GSTM3) y polimorfismos (GSTM1, GSTM3 y GSTM4) (Vineis y cols., 1999). *GSTM1*0* es una deleción en el gen que impide la expresión de la proteína funcional. Seidergard y cols en 1988 reportaron la falta de actividad del óxido de *trans*-estilbeno que es un compuesto metabolizado por la GSTM1 en individuos portadores de genotipos nulos en condición homóciga. Por otro lado, Lodovici y cols en el 2004 reportan la asociación de *GSTM1*0* con un incremento en los niveles de aductos de BPDE-DNA, y Mohr y cols., (2003) reportan la asociación del polimorfismo *GSTM1*0* con distintos tipos de cáncer.

Glutación-S-transferasa Theta-1 (GSTT1)

El gen de la GSTT1 se encuentra localizado en el cromosoma 22q11.2, en este loci se han identificado 2 genes: GSTT1, GSTT2 y un pseudogen. Los sustratos más conocidos de GSTT son el diclorometano, los compuestos halogenados como el clorhidrato de *p*-nitrobencilo (PNBC), el dibromuro de etileno, el bromuro de *p*-nitrofenilo, el cloruro de metilo, el yoduro de metilo, además de varios metanos y etanos halogenados. La GSTT1 transforma estas moléculas en mutágenos electrofílicos, potencialmente dañinos para las células (Landi y cols., 2000), por lo que en estos compuestos funciona como bioactivador, mientras que para algunos metabolitos de HAP's funciona como enzima de desintoxicación, no obstante presenta menor afinidad por estos sustratos (Mannervik y cols., 2005).

Existen reportes acerca de los polimorfismos en la clase Theta, Pemble y cols., (1994) reportan un polimorfismo nulo (*GSTT1*0*) similar al de *GSTM1*0*, en el que una deleción también impide la expresión funcional de la enzima. Se han realizado distintos estudios donde se relaciona este genotipo con el incremento de formación de aductos en el DNA (Ketelslegers y cols., 2006) y con el riesgo de padecer algún tipo de cáncer (Landi y cols., 2000).

Los polimorfismos más fuertemente relacionados con el CaMa por su importancia en el desequilibrio de la homeostasis en la activación y desactivación de metabolitos de la vía catecol se resumen en la Tabla 4.

Capítulo I Antecedentes

Tabla 4. Polimorfismos de enzimas relacionadas en la vía catecol

ENZIMA	POLIMORFISMO	FUNCIÓN	ACTIVIDAD	REFERENCIA
CYP 1A1	Ile462Val	Metabolismo de estrógenos	Aumentada	(Hayashi y cols., 1991)
CYP 1B1	Val432Leu		Aumentada	(Paracchini y cols., 2007)
GSTT1	nulo	Desintoxicación	Nula	(Mohr y cols., 2003)
GSTM1	nulo		Nula	
GSTP1	Ile105Val		Disminuida	
COMT	Met158Val		Disminuida	

Existen artículos en los cuales se reportan polimorfismos en diversas poblaciones y su asociación con el CaMa, algunos de estos artículos se mencionan en la Tabla 5.

Tabla 5. Polimorfismos asociados con CaMa reportados en otras poblaciones

ENZIMA	POLIMORFISMO	POBLACIÓN	RM (95% IC)	REFERENCIA
GSTT1	Nulo	Finlandesa	1.23(0.95-1.65)	(Mitrunen, y cols., 2001)
GSTM1	Nulo	Caucásica	0.57(0.31-1.04)	(Yue y cols., 2003)
GSTP1	Ile105Val	China	1.18(0.80-1.76)	(Yager & Davidson, 2006)
COMT	Met158Val	Japonesa	2.2 (0.9-5.1)	(Long y cols., 2007)
CYP 1A1	Ile105Val	Caucásica	1.6 (1.2-2.2)	
CYP 1B1	Val432Leu	Caucásica	2.3 (0.7-6-0)	

RM: Razón de momios IC: Intervalo de confianza

Capítulo I Antecedentes

La suma de los genes de baja penetrancia pueden contribuir de manera importante en la comprensión de la etiología del padecer CaMa. En primer lugar, estos genes pueden ayudar a entender la biología subyacente del CaMa, implicando nuevas vías que no han sido consideradas para ser asociadas con el riesgo de CaMa. En segundo lugar, mientras que cada polimorfismo por sí solo no constituye un factor de riesgo, varios polimorfismos juntos pueden dar información del riesgo de manera más precisa (*Wacholder y cols.*, 2010).

Receptores de estrógenos y factores de transcripción involucrados con el CaMa

Existen diversos factores y receptores que regulan la transcripción y acción de los estrógenos dentro de las células, como los receptores de estrógenos y los factores de crecimiento. Las hormonas pueden actuar directamente sobre la célula tumoral por medio de la interacción con receptores específicos. La presencia de sitios de unión de alta afinidad es un requisito imprescindible para que las células respondan a la estimulación hormonal, la mayoría de los cánceres de mama dependen de la acción estrogénica para su crecimiento y, como se ha mencionado, se postula que los estrógenos funcionan como carcinógenos, promotores tumorales y como reguladores del crecimiento tumoral (*Clarke y cols.*, 1992).

Dada la importancia de este factor hormonal, se ha investigado ampliamente acerca del papel del RE α en el control de la expresión génica y del proceso de mitosis (*Dickson & Lippman y cols.*, 1987).

Los receptores esteroideos pertenecen a una superfamilia de proteínas reguladoras de la transcripción génica. Los miembros de esta familia comparten tres propiedades importantes: se fijan a un ligando hormonal, se unen a secuencias específicas de DNA y actúan modificando la actividad transcripcional de genes específicos (trans-activación) (*Beato y cols.*, 1989, *Evans y cols.*, 1988).

El receptor hormonal está formado por tres regiones principales. El extremo aminoterminal de la proteína, la región de unión al DNA, situada en la zona media, está formado por aproximadamente unos 70 aminoácidos y el extremo carboxilo, formado por unos 250 aminoácidos, es el más complejo estructural y funcionalmente. Está implicado en la unión a

Capítulo I Antecedentes

la hormona y la translocación nuclear, así como en los procesos de dimerización y transactivación (Beato y cols., 1989). También existen dominios de transactivación adicionales localizados en la región amino-terminal y en la de unión al DNA. (Fig 13)

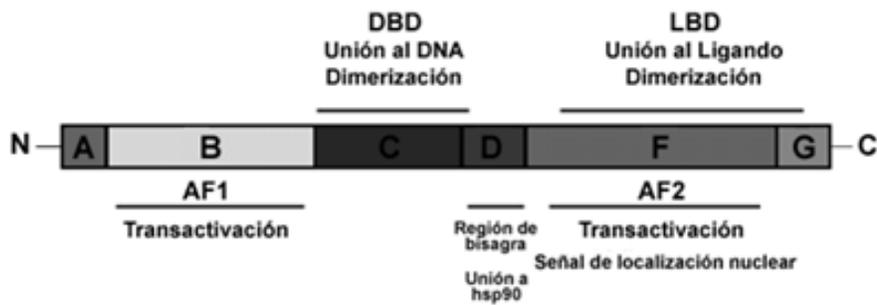


Fig. 13 Organización del receptor de estrógenos

Esta región de unión al DNA es la más conservada, invariablemente contiene cisteína e histidina con “dedos” de zinc, cada región de unión al DNA de cada receptor tiene dos de estos dedos y se ha postulado que son los que permiten que la proteína se coloque en los surcos principales del DNA (Forman & Samuels y cols., 1990), cabe mencionar que los fragmentos del DNA pertenecientes a los genes que responden a la acción de los estrógenos se denominan EREs.

Los receptores hormonales no ocupados se localizan a nivel intracelular en forma de complejos heteroligoméricos que incluyen una proteína de choque térmico, esta forma “inactiva” no es capaz de interactuar con el DNA porque el dominio de unión al DNA está bloqueado por otros dominios de la proteína o por otros componentes del complejo oligomérico, impidiendo así la translocación nuclear (Forman & Samuels y cols., 1990).

Tras la unión de la hormona, el complejo se disocia, dejando accesible el sitio por el que el receptor se une al DNA. Después de la unión del ligando, la forma activa del receptor parece ser un homodímero que contiene dos moléculas de ligando (Truss & Beato y cols.,

Capítulo I Antecedentes

1993), ya que parece que la hormona induce un cambio conformacional en el dominio de unión al ligando necesario para la actividad transcripcional (Beekman y *cols.*, 1993). (Fig 14) Existen tres receptores de estrógenos conocidos hasta la fecha, dos de los mejor estudiados son los RE α y RE β , el RE GPR30, el cual fue recientemente descubierto y no existe mucha información sobre su acción y estructura.

Los receptores de estrógenos RE α y RE β son productos de distintos genes de diferentes cromosomas. RE α se localiza en el cromosoma 6 (6q25.1) y el RE β se encuentra en el cromosoma 14 (14q22-24).

Del tercer receptor denominado GPR30, sólo se sabe que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, que se une con alta especificidad al estrógeno y a antagonistas como el Tamoxifen y al Fulvestran. Su localización sub-celular se encuentra todavía en controversia (retículo endoplásmico o membrana plasmática) (Matthews & Gustafsson y *cols.*, 2003).

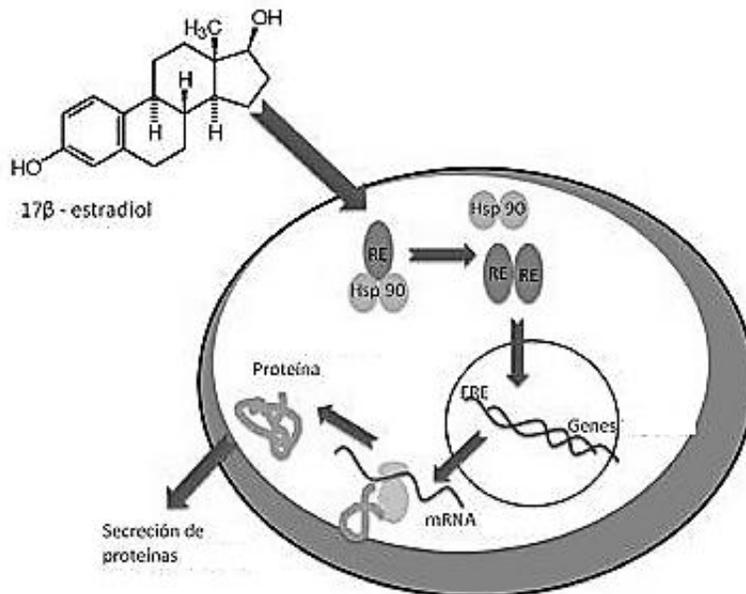


Fig 14. Mecanismo de acción de los receptores de estrógeno

Justificación

A pesar de que existen diversos estudios en los cuales se demuestra el potencial mutagénico y carcinogénico de los metabolitos del estrógeno $17\beta\text{-E}_2$ y también se ha reportado en diversas poblaciones que los polimorfismos de los genes involucrados en este metabolismo tienen una relación con la susceptibilidad a padecer CaMa, no existe ningún trabajo en el cual se evalúe de manera conjunta el papel de los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTT1*0, GSTM1*0 y GSTP1 rs1695 en un estudio epidemiológico de casos y controles, y al mismo tiempo se determine el papel de estos polimorfismos en relación a la expresión genética, cantidad del metabolito carcinogénico 4-CE₂ y aductos que pueden iniciar el cáncer de mama en un modelo *in vitro* de leucocitos tratados con $17\beta\text{-E}_2$.

Hipótesis

Las pacientes con diagnóstico de CaMa tendrán mayor frecuencia de los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTT1*0, GSTM1*0 y GSTP1 rs1695 que las mujeres sin diagnóstico de CaMa y la administración de $17\beta\text{-E}_2$ en cultivos de leucocitos con estos polimorfismos producirá niveles diferenciales de cantidad de expresión genética, metabolitos carcinogénicos y aductos que pueden iniciar el cáncer de mama, comparado con los leucocitos sin estos polimorfismos.

Objetivo general

Determinar si los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTT1*0, GSTM1*0 y GSTP1 rs1695 tienen alguna relación con el CaMa y si en un modelo *in vitro* de leucocitos tratados con 17 β -E₂ son capaces de generar una mayor cantidad del metabolito carcinogénico 4-CE₂ y aductos.

Objetivos particulares

Determinar la frecuencia de los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTT1*0, GSTM1*0 y GSTP1 rs1695 en una muestra de población mexicana.

Determinar la asociación entre los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTT1*0, GSTM1*0 y GSTP1 rs1695 y el riesgo de padecer cáncer de mama en un estudio de casos y controles.

Inducir y determinar el cambio de expresión de los genes, CYP1A1, CYP1B1 y COMT, en leucocitos tratados con 17 β -E₂ con una combinación de polimorfismos de riesgo (CYP1A1 Val/Val; CYP1B1 Val/Val, COMT Met/Met, GSTP1 Val/Val y GSTT1*0) y en otros leucocitos con una combinación de polimorfismos de no riesgo (CYP1A1 Ile/Ile; CYP1B1 Leu/Leu, COMT Val/Val, GSTP1 Leu/Leu, GSTT1 y GSTM1 presentes).

Determinar y cuantificar el metabolito 4-CE₂, en leucocitos tratados con 17 β -E₂ con una combinación de polimorfismos de riesgo (CYP1A1 Val/Val; CYP1B1 Val/Val, COMT Met/Met, GSTP1 Val/Val y GSTT1*0) y en otros leucocitos con una combinación de polimorfismos de no riesgo (CYP1A1 Ile/Ile; CYP1B1 Leu/Leu, COMT Val/Val, GSTP1 Leu/Leu, GSTT1*1 y GSTM1*1).

Determinar y cuantificar los aductos, en leucocitos tratados con 17β -E₂ con un Combinación de polimorfismos de riesgo (CYP1A1^{Val/Val}; CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTT1*0) y en otros leucocitos con un Combinación de polimorfismos de no riesgo (CYP1A1^{Ile/Ile}; CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu}, GSTT1*1 y GSTM1*1).

Capítulo II Estudio de casos y controles

Materiales y métodos

Sujetos

Incluimos 382 individuos para determinar las frecuencias de los polimorfismos CYP1A1 (rs1048943), COMT (rs4680), GSTPI (rs1695) GSTM1*0 y GSTT1*0 y 420 para el polimorfismo CYP1B1 (rs1056836) en una muestra de población mexicana, los cuales fueron donadores de sangre en el Hospital “20 de Noviembre” ISSSTE de la ciudad de México, de Octubre del 2001 a Noviembre del 2004. Los sujetos muestreados fueron mestizos mexicanos (nacidos en México con padres y abuelos nacidos en México), no relacionados entre sí. Todos los participantes respondieron un cuestionario de covariables epidemiológicas y firmaron una carta de consentimiento informado.

Las pacientes con CaMa incluidas en el estudio fueron pacientes de nuevo ingreso del Instituto Nacional de Cancerología, y diagnosticadas con CaMa primario (estadio IIA-IV). El análisis histopatológico demostró la presencia de carcinoma ductal *in situ* ó invasivo en 105 casos y en 45 casos, carcinoma lobulillar *in situ* ó invasivo. Las muestras de sangre fueron colectadas del 2006 al 2007. Todas la pacientes fueron mayores de 30 años (media de edad 48.09 ± 9.6 años) sin antecedentes del síndrome de CaMa hereditario. Seleccionamos 150 mujeres sin CaMa, pareadas por edad con las pacientes de CaMa, estas mujeres, no tenían diagnóstico de CaMa hasta el momento de la toma de muestra, y contestaron de manera directa un cuestionario para recolectar datos epidemiológicos y factores de riesgo para CaMa y firmaron una carta de consentimiento informado.

En el caso de las pacientes, también recolectamos información acerca del tipo histológico del cáncer mamario, así como datos de relevancia médica y epidemiológica para nuestro estudio.

Capítulo II Estudio de casos y controles

El protocolo de investigación fue aprobado por los Comités de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Instituto Nacional de Cancerología. El Banco de sangre del Hospital “20 de Noviembre” del ISSSTE dio su autorización para utilizar los “buffy coat” de algunas muestras para extraer el DNA y utilizarlo en este estudio.

Diseño del estudio de casos y controles

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos CYP1A1 rs1048943, GSTP1 rs1695, GSTM1*0 y GSTT1*0, fueron determinados previamente en nuestro laboratorio (Pérez-Morales y *cols.*) y las frecuencias de los polimorfismos de CYP1B1 rs1056836 y COMT rs4680 fueron determinadas para este trabajo, ya que para CYP1B1 no habían sido determinadas previamente estas frecuencias en población mexicana, y de acuerdo con Taioli, 2002 (Taioli & Bonassi y *cols.*, 2002) cuando se trabaja con frecuencias polimórficas desconocidas, es necesario determinar estas frecuencias en la población de estudio con el fin de minimizar los errores y tener un diseño apropiado para el estudio de casos y controles. Para COMT Vargas-Alarcón y *cols.*, en el 2007 reportan que en una muestra de 33 mujeres mexicanas sanas las frecuencias alélicas $p=0.37$ y $q=0.63$, sin embargo debido al pequeño tamaño de muestra quisimos realizar el cálculo en un tamaño de muestra mayor y comparar las frecuencias de ambos estudios.

Estas frecuencias alélicas fueron determinadas en población mexicana, en una muestra de individuos mexicanos no relacionados, sanos, sin diagnóstico de cáncer. Las frecuencias obtenidas en este estudio y las reportadas por Pérez-Morales y *cols.*, en el 2011, se muestran en la Tabla 7.

De acuerdo con las frecuencias obtenidas que se muestran en la Tabla 7, calculamos el número mínimo requerido de muestras para los diferentes polimorfismos en un estudio de casos y controles con la siguiente fórmula.

Capítulo II Estudio de casos y controles

$$n = \left[\frac{z\left(\frac{\alpha}{2}\right) \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right]^2$$

(Skaik y cols., 2010, Campbell y cols., 1995),

Donde $z_{\alpha/2} = 1.96$ para un nivel de confianza del 95%, $z_{1-\beta} = 0.80$ con un poder estadístico del 80%, p_2 es la frecuencia de exposición de los controles, p_1 es un estimado de la frecuencia de exposición de los casos derivados de reportes previos de RM's con los polimorfismos de interés (Sergentanis & Economopoulos, Ambrosone y cols., 1995, Charrier y cols., 1999, Helzlsouer y cols., 1998, Lavigne y cols., 1997, Thompson y cols., 1998) y $p = (p_1 + p_2)/2$.

De acuerdo con esta estimación, la muestra necesaria para un estudio de casos y controles con una potencia de 80% es de 143 casos y 143 controles para CYP1A1 (rs1048943), 150 casos y 150 controles para CYP1B1 (rs1056836), 133 casos y 133 controles para COMT (rs4680), 135 casos y 135 controles para GSTP1 (rs947894), 206 casos y 206 controles para GSTT1 (delección) y 133 casos y 133 controles para GSTM1 (delección) Tabla 7.

Determinación de las variantes alélicas

El DNA genómico lo obtuvimos a partir de muestras sanguíneas por el método de precipitación con fenol-cloroformo (Sambrook, 1987) y en algunos casos utilizamos el protocolo de precipitación con sales (Lahiri & Nurnberger, 1991).

Utilizamos la técnica de PCR-RFLP's para los polimorfismos de CYP1A1 (rs1048943) (Kawajiri, 1999), GSTP1 (rs1695) (Zimniak y cols., 1994), CYP1B1 (rs1056836) (Zheng y cols., 2000) y COMT (rs4680) (Ho y cols., 2005). Los polimorfismos de GSTT1*0 y GSTM1*0 los determinamos por PCR multiplex, utilizando el protocolo reportado por Abdel-Rahman y cols., 1996 (Abdel-Rahman y cols., 1996). Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas de Fermentas y New England Biolabs.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Los productos de PCR y los productos de la digestión con las endonucleasas de restricción fueron separados por electroforesis en geles de 2% de agarosa (4% para COMT), y visualizados después en un transiluminador (Bio-Rad Hecules, CA, USA). Los primers fueron comprados en Invitrogen. Los primers y condiciones de los RFLP's utilizados se muestran en la Tabla 6.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Tabla 6. Primers y condiciones de PCR-RFLP's

GEN (rs)	Primer Secuencia 5'-3'	Longitud de fragmento (bp)	Condiciones PCR	Ciclos	Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos digeridos (pb)
CYP1A1 (rs1048943)	Forward	204	30 s 94° C	35	BsrDI	WT (149, 55) H (204, 149, 55) M (204)
	CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC		30 s 63° C			
	Reverse		30 s 72° C			
CYP1B1 (rs1056836)	Forward	650	30 s 94° C	35	Eco57I	WT (650) H (650,340, 310) M (340,310)
	TCACTTGCTTTTCTCTCTCC		25 s 60° C			
	Reverse		40 s 72° C			
AATTTTCAGCTTGCCTCTTG						
COMT (rs4680)	Forward	165	30 s 94° C	40	NlaIII	WT (165) H (165,62, 40) M (62,40)
	GGCCTACTGTGGCTACTCA		30 s 60° C			
	Reverse		40 s 72° C			
GGCCCTTTTTCCAGGTCTGACA						
GSTP1 (rs1695)	Forward	176	20 s 94° C	30	BsmA1	WT (176) H (176, 91, 85) M (91, 85)
	ACCCAGGGCTCTATGGGAA		20 s 60° C			
	Reverse		20 s 72° C			
TGAGGGCACAAGAAGCCCT						
GSTM *0	Forward	215	60 s 94° C	35	NA	NA
	GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC		45 s 59° C			
	Reverse		45 s 72° C			
GTTGGGCTCAAATATACGGTGG						
GSTT1*0	Forward	480	45 s 72° C		NA	NA
	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC					
	Reverse					
TCACCGGATCATGGCCAGCA						

NA.- No Aplica. WT: Genotipo silvestre. H: Genotipo heterocigoto. M: Genotipo mutante

Capítulo II Estudio de casos y controles

Análisis estadísticos

El equilibrio de Hardy Weinberg lo determinamos en la muestra de casos y controles para cada polimorfismo, cuando fue posible detectarlo, con el programa estadístico GenePop versión 4.0.10 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

Los factores de riesgo epidemiológico y el riesgo de desarrollar CaMa fue examinado utilizando una prueba de X^2 , prueba exacta de Fisher's con el programa GraphPad Prism 5 y la prueba de Fisher's FreemanHalton la realizamos con la pagina (http://in-silico.net/statistics/fisher_exact_test/2x3).

Para determinar la asociación entre el CaMa y los polimorfismos, realizamos una regresión logística para calcular las RMs con un 95% de ICs. Los heterócigos y los homócigos mutantes fueron comparados con el genotipo homócigo silvestre, ya que los grupos que se han detectado con el menor riesgo de desarrollar CaMa fueron utilizados como valor de referencia, suponiendo una actividad biológica con el modelo codominante. También determinamos con el programa XLSTAT 2012 una prueba de tendencia "Cochran Armitage" para la asociación de los polimorfismos de interés, esta asociación la realizamos de manera no estratificada y estratificada por el estatus menopáusico.

Un modelo de regresión logística multivariada fue realizado con el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), para determinar el papel de las covariantes de riesgo y la asociación con el CaMa.

Bajo la hipótesis del aumento en el riesgo del cáncer de mama por el aumento en el número de polimorfismos, determinamos la interacción gene-gene de los 6 polimorfismos estudiados con el programa MDR (Multifactor-Dimensionality Reduction; MDR; Versión 1.1.0), el cual es capaz de reducir la dimensión de las interacciones, este programa calculó la RM de las diferentes interacciones. Las diferencias estadísticas fueron consideradas cuando $p < 0.5$. Todos los valores p reportados son de dos colas.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Resultados

Para calcular la muestra necesaria que debíamos incluir en el estudio de casos y controles, determinamos las frecuencias alélicas en población mexicana de los polimorfismos CYP1B1 (rs1056836) y COMT (rs4680), las cuales no habían sido reportadas y para los polimorfismos CYP1A1 (rs1048943), GTTP1 (rs947894), GSTT1*0 y GSTM1*0, nos basamos en lo reportado por Pérez-Morales, y *co/s.*, en el 2011 (Tabla 7)

Las mujeres incluidas en el estudio de casos y controles tenían entre 30-74 años. La evaluación de los factores de riesgo para CaMa se muestra en la Tabla 8 comparando casos y controles. No encontramos diferencias significativas entre la distribución de la edad, sólo encontramos diferencia significativa en la edad de inicio de la menopausia ($p=0.003$) entre los casos y controles.

Todos los genotipos incluidos en este estudio estuvieron bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, sin embargo para GSTT1 y GSTM1 no fue posible realizar este análisis, debido a la imposibilidad de identificar los genotipos heterocigotos mediante la técnica PCR multiplex.

En la Tabla 9 se muestra la asociación entre los polimorfismos y el riesgo de padecer CaMa. Encontramos una asociación significativa entre los genotipos CYP1A1^{Val/Val} ($p=0.01$), GSTP1^{Val/Val} ($p=0.009$). Los resultados obtenidos por la prueba exacta de Fisher's, fueron consistentes con algunos de los obtenidos con el Test Cochran-Armitage's. Es importante destacar que los genotipos CYP1B1^{Val/Val} y COMT^{Met/Met} mostraron una significancia marginal ($p=0.05$ y $p=0.08$ respectivamente) con esta última prueba estadística.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Tabla 7. Frecuencia de los polimorfismos en una muestra de población mexicana.

Gen (rs)	Frecuencia genotípica n(%)					Frecuencia alélica		Referencias	Muestra requerida para el estudio de casos y controles	
	Alelo mutante	n	Homócigo silvestre	Heterocigo	Homócigo mutantes	p ^b	q ^c		Casos	Controles
CYP1A1 (1048943)	Val	382	86 (22.5)	176 (46.1)	120 (31.4)	0.245	0.55	(Pérez-Morales y cols.2011)	143	143
CYP1B1 (1056836)	Val	420	60 (14.28)	230 (54.7)	130 (30.95)	0.41	0.59	Este estudio	150	150
COMT (4680)	Met	382	161 (42.1)	156 (40.8)	65 (17.1)	0.62	0.38	Este estudio	133	133
GSTP1 (947894)	Val	382	102 (27.7)	192 (50.3)	88 (23)	0.52	0.48	(Pérez-Morales y cols. 2011)	135	135
GSTM1 (delección)	Nulo	382	239 (62.6)	N.D. ^a	143(37.4)	N.D. ^a	N.D. ^a	(Pérez-Morales y cols.2011)	133	133
GSTT1 (delección)	Nulo	382	324 (84.8)	N.D. ^a	58 (15.2)	N.D. ^a	N.D. ^a	(Pérez-Morales y cols.2011)	206	206

^a No determinado. ^b Alelo p =silvestre , ^c Alelo q = mutante . Potencia de 80%. Tabla modificada con permiso de Pérez-Morales, y cols. 2011.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Tabla 8. Evaluación de factores de riesgo asociados con CaMa

Factores de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	Valor p
Edad (años)			
<40	36 (24.0)	38 (25.3)	0.51 ^a
40-50	50 (33.3)	45 (30.0)	
50-60	49 (32.6)	44 (29.3)	
>60	15 (10.0)	23 (15.3)	
Índice de masa corporal (IMC)			
Normal (de 18.5 a 25)	62 (41.4)	69 (46)	0.72 ^b
Sobrepeso y obesidad (>25)	88 (58.6)	81 (54)	
Edad de inicio de la menarca (años)			
<12	29 (19.3)	34 (22.6)	0.23 ^a
12-14	95 (63.3)	100 (66.6)	
>14	26 (17.3)	16 (10.6)	
Estatus menopáusico			
Pre	82 (58.0)	81 (54.0)	0.9 ^b
Post	68 (42.0)	69 (46)	
Edad de inicio de la menopáusica (años)			
<45	4 (4.70)	16 (23.1)	0.003 ^{c*}
45-55	60 (90.4)	52 (75.3)	
>55	4 (4.70)	1 (1.44)	
Número de hijos			
>5	13 (8.60)	19 (12.6)	0.48 ^a
1-5	110 (73.3)	108 (72.0)	
0	27 (18.0)	23 (15.3)	
Uso de anticonceptivos hormonales (años)			
Nunca	104 (69.3)	92 (61.3)	0.28 ^a
<5	34 (22.6)	46 (30.6)	
>5	12 (8.0)	12 (8.0)	
Uso de terapia normal de remplazo			
No	133 (88.6)	136 (90.7)	0.70 ^b
Yes	17 (11.3)	14 (9.3)	

^a Chi cuadrada. ^b Prueba exacta de Fisher's . ^c Prueba exacta de Freeman-Halton-Fisher's * Valores significativos

Capítulo II Estudio de casos y controles

Tabla 9. Asociación de polimorfismos genéticos con el CaMa

Genotipo	Casos n (%)	Controles n (%)	RM (95% IC)	Valor p	Test Cochran-Armitage's valor-p
CYP1A1	39 (27.3)	57 (37.3)	1.0 ^a		
Ile/Ile	37 (26.0)	43 (30.0)	1.18 (0.65-2.1)	0.65	
Ile/Val	74 (46.6)	50 (32.6)	1.95 (1.13-3.36)	0.01 ^{b*}	0.01*
Val/Val					
CYP1B1	27 (18)	33 (20.6)	1.0 ^a		
Leu/Leu	46 (30.6)	62 (42)	0.83 (0.44-1.59)	0.62	
Leu/Val	77 (51.3)	55 (37.3)	1.57 (0.84-2.93)	0.15 ^b	0.057
Val/Val					
COMT	52 (34.6)	68 (44.6)	1.0 ^a		
Val/Val	66 (44.0)	59 (38.6)	1.46(0.88-2.43)	0.15	
Val/Met	32 (21.3)	23 (16.6)	1.64 (0.87-3.11)	0.14 ^b	0.085
Met/Met					
GSTT1	103 (68.6)	108 (72)	1.0 ^a		
Silvestre	47 (31.3)	42 (28)	1.17 (0.71-1.92)	0.61	
Nulo					
GSTM1	85 (56.6)	89 (58.6)	1.0 ^a		
Silvestre	65 (43.3)	61 (41.3)	1.08 (0.68-1.71)	0.81	
Nulo					
GSTP1	40 (27.3)	43 (32)	1.0 ^a		
Ile/Ile	39 (34.6)	66 (48.6)	0.83 (0.48-1.44)	0.57	
Ile/Val	71 (38.0)	41 (19.3)	2.39 (1.24-4.24)	0.009*	0.008*
Val/Val					

^a Valor de referencia; RM, Razón de Momios ; IC, Intervalo de confianza. * Valores significativos

Capítulo II Estudio de casos y controles

Cuando estratificamos a las mujeres por estatus menopáusico y lo analizamos por la prueba de Fisher's la asociación entre los polimorfismos y el riesgo de padecer CaMa (Tabla 10), encontramos que los genotipos ($CYP1A1^{Val/Val}$ $p=0.009$, $GSTP1^{Val/Val}$ $p=0.005$) tuvieron una asociación significativa para las mujeres premenopáusicas y para las mujeres postmenopáusicas, ($CYP1A1^{Val/Val}$ $p=0.06$, $GSTP1^{Val/Val}$ $p=0.09$). La significancia observada para las mujeres premenopáusicas se conservó con el Test de Cochran-Armitage's, a diferencia de lo encontrado en mujeres postmenopáusicas, ya que la significancia se perdió al aplicar la segunda prueba estadística.

Al utilizar Regresión Logística Multivariada (RLM) para ajustar la única variable de riesgo que encontramos significativamente diferente entre casos y controles (edad de inicio de la menopausia) en mujeres postmenopáusicas, obtuvimos que la significancia del genotipo $CYP1A1^{Val/Val}$ se pierde ($p=0.28$) y, en contraste, al aplicar la RLM encontramos una asociación significativa entre los genotipos $CYP1B1^{Leu/Val}$ (0.05), $CYP1B1^{Val/Val}$ (0.02), $COMT^{Met/Met}$ (0.05) y el riesgo de padecer CaMa, por otro lado la asociación significativa se mantiene para $GSTPI^{Val/Val}$ con el ajuste y sin el ajuste.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Tabla 10. Asociación de los polimorfismos genéticos con el riesgo de padecer CaMa de acuerdo al estatus menopáusico

Genotipo	Mujeres premenopáusicas					Mujeres postmenopáusicas						
	Sin ajustar					Sin ajustar		Ajustado por edad de la menopausia				
	Casos n (%)	Controles n (%)	RM (95% IC)	Valor p	Test Cochran- Armitage's Valor-p	Casos n (%)	Controles n (%)	RM (95% IC)	Valor p	Test Cochran- Armitage's Valor-p	RM (95% CI)	Valor p
CYP1A1												
Ile/Ile	20 (24.3)	31 (38.2)	1.0 ^a			19 (27.9)	26 (37.6)	1.0 ^a				
Ile/Val	19 (23.1)	26 (32.0)	1.13 (0.50-2.56)	0.83		18 (26.4)	17 (24.6)	0.53(0.21-1.31)	0.25		1.02 (0.46-2.24)	0.96
Val/Val	43 (52.4)	24 (29.6)	2.77 (1.30-5.89)	0.009*	0.006*	31 (45.5)	26 (37.6)	2.33 (1.01-5.35)	0.06	0.229	1.46 (0.72-2.94)	0.28
CYP1B1												
Leu/Leu	16 (19.5)	20 (24.6)	1.0 ^a			11 (16.1)	13 (18.8)	1.0 ^a				
Leu/Val	25 (30.4)	28 (34.5)	1.11 (0.47-2.61)	0.83		21 (30.8)	34 (49.2)	0.72 (0.27-1.92)	0.62		0.49 (0.24-1.00)	0.05*
Val/Val	41 (50.0)	33 (40.7)	1.55 (0.69-3.46)	0.31	0.242	36 (52.9)	22 (31.8)	1.85 (0.70-4.82)	0.23	0.058*	2.22 (1.09-4.49)	0.02*
COMT												
Val/Val	30 (36.5)	39 (48.1)	1.0 ^a			22 (32.3)	29 (42.0)	1.0 ^a				
Val/Met	38 (46.3)	29 (35.8)	1.70 (0.86-3.35)	0.16		28 (41.1)	30 (43.4)	1.19 (0.56-2.53)	0.70		0.77 (0.38-1.57)	0.48
Met/Met	14 (17.0)	13 (16.0)	1.40 (0.57-3.41)	0.50	0.266	18 (26.4)	10 (14.4)	2.37 (0.91-6.14)	0.10	0.102	2.37 (0.98-5.70)	0.05*
GSTT1												
Wild type	57 (69.5)	60 (74.0)	1.0 ^a			46 (67.6)	48 (69.5)	1.0 ^a				
Null	25 (30.4)	21 (25.9)	1.25 (0.63-2.48)	0.60		22 (32.3)	21 (30.4)	1.04 (0.5-2.1)	1.0		0.99 (0.49-2.01)	0.98
GSTM1												
Wild type	44 (53.6)	46 (56.7)	1.0 ^a			41 (60.2)	43 (62.3)	1.0 ^a				
Null	38 (46.3)	35 (43.2)	1.13 (0.61-2.10)	0.75		27 (39.7)	26 (37.6)	1.11 (0.56-2.21)	0.86		1.11 (0.53-2.32)	0.77
GSTP1												
Ile/Ile	21 (25.6)	28 (34.5)	1.0 ^a			19 (27.9)	15 (21.7)	1.0 ^a				
Ile/Val	24 (29.2)	38 (46.9)	0.84 (0.39-1.81)	0.70		15 (22.0)	28 (40.5)	1.16 (0.50-2.64)	0.83		0.36 (0.16-0.79)	0.01*
Val/Val	37 (45.1)	15 (18.5)	3.28 (1.44-7.50)	0.005*	0.004*	34 (50.0)	26 (37.6)	2.40 (0.94-6.11)	0.09	0.657	1.87 (0.92-3.77)	0.07

^a Valor de referencia; RM, Razón de Momios; IC, Intervalo de confianza. * Valores significativos

Capítulo II Estudio de casos y controles

Por otro lado también examinamos cómo afecta el riesgo de padecer CaMa el aumento en el número de polimorfismos (homócigos mutantes) y observamos una tendencia a aumentar el riesgo de padecer CaMa cuando se aumenta el número de genotipos mutantes, esta asociación es clara cuando se tienen de 3 a 6 polimorfismos ($p=0.008$) (Tabla 11).

Tabla 11. Razón de momios de las asociaciones del riesgo de padecer CaMa con el número de polimorfismos.

No. polimorfismos	Casos n (%)	Controles n (%)	RM (95% IC)	Valor p
Cero	8 (5.3)	15 (10.4)	1.0 ^a	
Uno	33 (22.0)	51 (33.9)	1.21(0.46-3.10)	0.81
Dos	43 (28.6)	51 (33.3)	1.58 (0.61-4.08)	0.48
Tres-Seis	66 (40)	33 (55)	3.75 (1.44-9.74)	0.008*

^a Valor de referencia; RM, Razón de Momios; IC, Intervalo de confianza. * Valores significativos. El valor p se calculó utilizando la prueba exacta de Fisher's

Cuando realizamos el mismo análisis, pero separando a las mujeres por estatus menopáusico, la asociación fue clara en las mujeres más jóvenes (premenopáusicas) (Tabla 12).

Con el fin de determinar el riesgo relativo que existe entre las interacciones de los polimorfismos y el riesgo de padecer CaMa, realizamos un análisis multivariado para reducir las dimensiones de las interacciones, utilizamos el análisis denominado MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) y en la Tabla 13 se muestra el incremento significativo de la asociación entre el número genotipos homócigos mutantes y el riesgo de padecer cáncer de mama.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Tabla 12. Razón de Momios de las asociaciones del riesgo de padecer CaMa con el número de polimorfismos de acuerdo al estatus menopáusico

No. de polimorfismos	Mujeres premenopáusicas				Mujeres postmenopáusicas			
	Casos n (%)	Controles n (%)	RM (95% CI)	Valor p	Casos n (%)	Controles n (%)	RM (95% CI)	Valor p
Cero	2 (2.43)	11 (13.2)	1.0 ^a		5 (7.3)	5 (7.1)	1.0 ^a	
Uno	18 (21.9)	26 (31.3)	3.8 (0.75-19.2)	0.11	15 (22.0)	26 (37.14)	0.57(0.14-2.3)	0.48
Dos	27 (32.9)	28 (33.7)	5.3 (1.07-6.19)	0.03*	24 (27.9)	23 (32.85)	1.04(0.26-4.08)	1
Tres-seis	35 (42.6)	16 (19.75)	12.3 (2.38-60.7)	0.001*	24 (35.29)	15 (21.7)	1.60 (0.39-6.47)	0.71

^a Valor de referencia; RM, Razón de Momios; IC, Intervalo de confianza. * Valores significativos. El valor p se calculó utilizando el test exacto de Fisher's

Capítulo II Estudio de casos y controles

Tabla 13. RM-multivariado de las interacciones de polimorfismos homócigos mutantes y el riesgo de padecer CaMa

No. de polimorfismos homócigos mutantes	Modelos	Prueba de precisión	CVC	RM-MDR	95% IC	Valor p del test X ²
2	CYP1B1-GSTP1	0.667	7/10	2.88	(1.78-4.65)	<0.0001*
3	COMT-CYP1A1-GSTP1	0.634	8/10	3.91	(2.42-6.31)	<0.0001*
4	COMT-CYP1A1-GSTP1-GSTT1	0.662	8/10	6.43	(3.87-10.6)	<0.0001*
5	COMT-CYP1A1-GSTP1-GSTT1-CYP1B1	0.572	9/10	13.0	(7.24-23.3)	<0.0001*
6	COMT-CYP1A1-GSTP1-GSTT1-CYP1B1-GSTM1	0.591	10/10	37.6	(17.11-82.9)	<0.0001*

Abreviaturas: CVC, Validación de consistencia; Rm-MDR, Razón de Momios- Reducción de dimensionalidad multifactorial; 95% CI, Intervalo de confianza del 95%. *Valores significativos

Por último realizamos la comparación de nuestros resultados obtenidos de la asociación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo de padecer CaMa con estudios previos en otras poblaciones (Tabla 14).

Capítulo II Estudio de casos y controles

Table 14. Estudios que muestran asociación de los polimorfismos del metabolismo de los catecol estrógenos en diferentes poblaciones

Primer autor	Año	Gen	Genotipo	Población	Resultados RM (95% IC)	Número de participan- tes		Referencias
						Casos	Controles	
Miyushi	2002			Japonesa	0.66 (0.45-0.96)	195	272	(Miyoshi y cols., 2002)
Shin	2007	CYP1A1	Val/Val	Coreana	0.98 (0.56-1.71)	513	447	(Shin y cols., 2007)
Torresan	2008			Brasileña	1.46 (0.76-2.79)	102	102	(Torresan y cols., 2008)
Moreno-Galván	2010			Mexicana	0.86 (0.38-1.95)	91	94	(Moreno-Galván y cols.)
Este estudio	2012			Mexicana	1.94 (1.13-3.34)	150	150	
Kocabas	2002	CYP1B1	Val/Val	Turca	1.27 (0.47-3.43)	84	103	(Kocabas y cols., 2002)
Jiao	2010			Asiática	0.85 (0.67-1.08)	152	156	(Jiao y cols.)
Okobia	2009			Nigeriana	1.09 (0.61-1.95)	250	250	(Okobia y cols., 2009)
Este estudio	2012			Mexicana	1.17 (0.68-2.01)	150	150	
Wu	2003	COMT	Met/Met	Asiática	0.84 (0.54-1.30)	589	563	(Wu y cols., 2003)
Sazci	2004			Turca	1.0 (0.93-1.29)	130	233	(Sazci y cols., 2004)
Wen	2005			China	0.92 (0.67-1.26)	1135	1235	(Wen y cols., 2005)
Moreno-Galván	2010			Mexicana	0.89 (0.39-2.25)	91	94	(Moreno-Galván y cols.)
Este estudio	2012	GSTP1	Val/Val	Mexicana	1.74 (0.91-3.0)	150	150	
Mitrunen	2001			Finlandesa	0.57 (0.31-1.04)	483	482	(Mitrunen, Jourenkova, Kataja, Eskelinen, Kosma, Benhamou, Kang y cols., 2001)
Torresan	2008			Brasileña	1.81 (1.04-3.16)	102	102	(Torresan y cols., 2008)
Kaushal	2010			India	1.43 (0.96-2.11)	117	174	(Kaushal y cols.)
Este estudio	2012	GSTM1	Nulo	Mexicana	2.39 (1.30-4.40)	150	150	
Charrier	1999			Francesa	1.99 (1.19-3.32)	361	437	(Charrier y cols., 1999)
Helzlsouer	1998			Caucásica	2.10 (1.22-3.64)	110	113	(Helzlsouer y cols., 1998)
Mitrunen	2001			Finlandesa	1.49 (1.03-2.15)	483	482	(Mitrunen, Jourenkova, Kataja, Eskelinen, Kosma, Benhamou, Kang y cols., 2001)
Kaushal	2010	GSTT1	Nulo	India	0.57 (0.32-1.00)	117	174	(Kaushal y cols.)
Este estudio	2012			Mexicana	1.09 (0.69-1.84)	150	150	
Mitrunen	2001			Finlandesa	1.18 (0.80-1.76)	483	482	(Mitrunen, Jourenkova, Kataja, Eskelinen, Kosma, Benhamou, Kang y cols., 2001)
Torresan	2008			Brasileña	0.91 (0.51-1.65)	102	102	(Torresan y cols., 2008)
Kaushal	2010	Este estudio		India	0.59 (0.36-0.99)	117	174	(Kaushal y cols.)
Este estudio	2012			Mexicana	1.13 (0.69-1.84)	150	150	

RM, Razón de Momios, 95% IC : 95% de Intervalo de Confianza. Todos los estudios fueron casos y controles.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Discusión

Con el fin de determinar el número de mujeres necesario para el estudio de casos y controles, primero determinamos en población mexicana las frecuencias alélicas de los polimorfismos elegidos, estos cálculos se describen en la sección de Materiales y métodos. A pesar de que para GSTT1 se requiere una muestra más grande de casos y controles, decidimos incluirla en el estudio debido a su importancia en la eliminación de los metabolitos carcinogénicos de las hormonas esteroides como el $17\beta\text{-E}_2$.

Nuestra muestra de casos y controles incluye un alto porcentaje de mujeres pre-menopáusicas (58%). Esto es similar a lo reportado en estudios previos en mujeres mexicanas con CaMa, en los cuales observamos que el grupo más afectado por esta neoplasia la forman mujeres jóvenes de entre 40 y 49 años, estos datos difieren de lo reportado para el resto del mundo, ya que en otras poblaciones, como la caucásica, en la que el CaMa se presenta mayormente en mujeres de entre 60 y 64 años, es decir casi una década más tarde que en las mujeres mexicanas (Rodríguez-Cuevas y cols., 2000, Rodríguez-Cuevas y cols., 2001). Esta diferencia puede explicar el pequeño impacto que tienen los factores de riesgo convencionales asociados con la exposición de estrógenos endógenos y/o exógenos en el desarrollo de esta neoplasia, los cuales están más fuertemente relacionados con las mujeres mayores de 55 años (Mitrunen, Jourenkova, Kataja, Eskelinen, Kosma, Benhamou, Kang y cols., 2001, Surekha y cols., 2009, Huang y cols., 1999, Sangrajrang y cols., 2009, Linhares y cols., 2005, Egan y cols., 2004, Opdahl y cols., 2008). Sin embargo, es importante remarcar que este análisis es un estudio exploratorio y estos datos deben ser confirmados en una muestra más grande.

Dentro de los factores de riesgo incluídos en este estudio encontramos que la edad de inicio de la menopausia fue diferente significativamente entre los casos y los controles (Tabla 8) y esta asociación puede explicarse debido a que al iniciar más joven la menopausia, las mujeres están menos tiempo expuestas a los estrógenos endógenos y por lo tanto puede disminuir el riesgo de padecer CaMa (Mitrunen, Jourenkova, Kataja, Eskelinen, Kosma, Benhamou, Kang y cols., 2001, Opdahl y cols., 2008, Clemons & Goss, 2001).

Capítulo II Estudio de casos y controles

Por otro lado, existe evidencia que para los polimorfismos incluidos en el estudio, los homocigos silvestres tienen menos riesgo de padecer CaMa que los heterocigos y éstos a su vez, tienen menor riesgo de padecer esta neoplasia que los homocigos mutantes. Por ejemplo, para el polimorfismo CYP1B1 (rs1056836), recientemente se ha demostrado que esta variante alélica tiene un fuerte impacto en las propiedades catalíticas de la enzima, ya que el alelo Val432 tiene una actividad tres veces mayor para hidroxilar en posición 4 a los estrógenos, comparado con el alelo Leu432 (Li y cols., 2000). En el caso de CYP1A1, se ha reportado que el polimorfismo rs1048943 produce una alta actividad enzimática que coincide con altos niveles de mRNA y puede verse reflejado en un aumento en la activación de metabolitos carcinogénicos de los estrógenos como el 17β -E₂ (Landi y cols., 1994); Para COMT el homocigo mutante (Met/Met) del polimorfismo rs4680 se ha asociado con una reducción de aproximadamente 3 ó 4 veces en la actividad enzimática comparado con el homocigo silvestre (Val/Val) (Watson y cols., 1998), y para el polimorfismo GSTP1 (rs1695) también se ha reportado que el cambio de un aminoácido resulta en una disminución en la actividad enzimática (Watson y cols., 1998). En estos trabajos muestran que los heterocigos de los cuatro polimorfismos tienen un riesgo intermedio entre el homocigo silvestre y el homocigo mutante, basados en estas evidencias aplicamos un modelo codominante para las asociaciones entre las variantes alélicas y el riesgo de desarrollar CaMa.

La asociación encontrada entre el riesgo de padecer esta neoplasia y las variantes CYP1A1^{Val/Val} y GSTP1^{Val/Val} puede ser explicada por el incremento en la actividad enzimática de CYP1A1^{Val/Val} y la reducción de la actividad en GSTP1^{Val/Val}, ambas actividades han sido demostradas en modelos *in vitro* con los polimorfismos mencionados. Esta combinación de variantes puede aumentar los niveles de metabolitos mutagénicos del 17β -E₂ y por lo tanto aumentar el riesgo de padecer CaMa.

Cuando separamos por estatus menopáusico encontramos que las asociaciones significativas entre los polimorfismos CYP1A1 rs1048943 y GSTP1 rs1695 sólo están presentes en las mujeres premenopáusicas, esta asociación se confirma con la prueba de tendencia Cochran-Armitage's. Estas asociaciones encontradas sólo en las mujeres premenopáusicas, resaltan la importancia de estos polimorfismos en la etiología del CaMa en este grupo

Capítulo II Estudio de casos y controles

de edad, ya que a pesar de que las mujeres más jóvenes han estado expuestas a menor cantidad de ciclos ovulatorios y por lo tanto a menores niveles de estrógenos endógenos, estas mujeres jóvenes, fueron capaces de desarrollar la neoplasia.

Sin embargo, es interesante que cuando ajustamos nuestro modelo con la variable de edad de inicio de la menopausia en el único grupo que fue posible, es decir, mujeres postmenopáusicas, encontramos una asociación significativa con las variables CYP1B1^{Leu/Val}, CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Ile/Val}, GSTP1^{Val/Val}, con el riesgo de padecer CaMa. Esto demuestra cómo el riesgo de padecer esta neoplasia se vuelve significativo cuando se suma la exposición a estrógenos, resultado del número de ciclos ovulatorios, más los polimorfismos, obteniendo un significancia positiva. En estudios previos en mujeres mexicanas con CaMa, se asoció el polimorfismo CYP1A1^{Val/Val} con el riesgo de padecer esta neoplasia en mujeres premenopáusicas, y no encontraron asociación con la variante COMT^{Met/Met} en el mismo grupo de mujeres (Moreno-Galván y cols.).

Nuestros resultados de la asociación de CYP1A1^{Val/Val} y el riesgo de padecer CaMa son similares a los reportados para diferentes poblaciones (Miyoshi y cols., 2002, Surekha y cols., 2009, Torresan y cols., 2008, Shin y cols., 2007), así como la asociación de GSTP1^{Val/Val} con el riesgo de padecer CaMa también ha sido descrita en estudios previos (Egan y cols., 2004). Interesantemente, en mujeres Brasileñas se encontró que los genotipos mencionados fueron también relacionados con el riesgo de CaMa, mientras que con los polimorfismos CYP1B1^{Val/Val} y GSTM1*0, no encontraron asociación.

El efecto aditivo de los polimorfismos muestra una contribución más significativa en mujeres premenopáusicas que en mujeres postmenopáusicas (Tabla 12), remarcando la importancia de la suma de los polimorfismos en el desarrollo de este cáncer en mujeres jóvenes, las cuales están menos expuestas a factores de susceptibilidad.

Los resultados del modelo multivariado MDR (Tabla 13) muestra claramente que el riesgo de padecer CaMa aumenta con el número de alelos de riesgo.

Capítulo II Estudio de casos y controles

Sin embargo, nuestros resultados del estudio de casos y controles deben ser confirmados con una muestra mayor, para tener una evidencia más clara de la participación de estos polimorfismos en la etiología del CaMa en mujeres mexicanas.

Conclusiones del estudio de casos y controles

- En una muestra de mujeres mexicanas encontramos que los polimorfismos CYP1A1 rs1048943 y GSTP1 rs1695 están asociados con el riesgo de padecer CaMa.
- Observamos una asociación entre la edad del inicio de la menopausia y el riesgo de padecer cáncer de mama.
- Identificamos a las mujeres premenopáusicas como el grupo con mayor riesgo a padecer cáncer de mama asociado a los polimorfismos CYP1A1 (rs1048943), CYP1B1 (rs1056836), COMT (rs4680), GSTPI (rs1695) GSTM1*0 y GSTT1*0.
- Detectamos una asociación significativa entre el estatus menopáusico y el riesgo de padecer CaMa.
- Encontramos evidencia de que a mayor número de polimorfismos presentes en una mujer aumenta significativamente el riesgo de padecer CaMa.
- Es necesario realizar más estudios para confirmar las asociaciones encontradas en este trabajo.

Capítulo III Estudio *in vitro*

Estudio *in vitro*

Debido a la importancia de los polimorfismos CYP1A1 (rs1048943), CYP1B1 (rs1056836), COMT (4680), GSTM1*0 y GSTP1 (rs947894), evidenciada en nuestro estudio de casos y controles, así como en estudios epidemiológicos previos, quisimos investigar con mayor profundidad el papel de estos polimorfismos en el desequilibrio de la homeostasis entre la activación y desactivación de metabolitos carcinogénicos en un modelo celular, el cual exprese las enzimas involucradas en el metabolismo de los estrógenos, con el fin de comparar leucocitos que tengan una “Combinación de polimorfismos de riesgo” los cuales presentaban los genotipos CYP1A1^{Val/Val}; CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTM1*0, contra leucocitos que tengan una “Combinación de polimorfismos de no riesgo” los cuales tenían los siguientes genotipos, CYP1A1^{Ile/Ile}; CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu} y GSTM1*1.

El modelo celular seleccionado para esta comparación fueron leucocitos circulantes de sangre periférica, debido a que presenta varias similitudes con el órgano blanco, como se muestra en la Tabla 15, además de ser un modelo no invasivo.

Tabla 15. Propiedades comunes entre leucocitos y glándula mamaria de algunos genes involucrados en el metabolismo de los estrógenos.

GEN		REFERENCIAS
RE α	Receptor de estrógeno alfa mayormente expresado	Scarino y cols., 2008; Delgado y cols., 2008
CYP1B1	Citocromo con mayores niveles de expresión en comparación con el CYP1A1	Abel y cols., 2004 ; Honkakoski y cols., 2000
COMT	Enzima de desintoxicación mayormente expresada	Lehmann y cols.,2008
GSTM1	Enzima que se expresa en niveles bajos a comparación de otras GST´s	Lehmann y cols., 2008 ; Cantlay y cols., 2006

Capítulo III Estudio *in vitro*

Materiales y métodos

Para comparar el mRNA de los genes CYP1A1, CYP1B1, COMT y GSTP1, la cantidad del metabolito 4-CE₂ y los aductos resultantes del metabolismo del 17β-E₂, utilizamos un modelo de leucocitos de sangre periférica tratados con 17β-E₂ de dos mujeres: una de las mujeres con los siguientes genotipos: CYP1A1^{Ile/Ile}, CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu} y GSTM1*1, al cual denominamos, “Combinación de polimorfismos de no riesgo”, y otra mujer con los genotipos CYP1A1^{Val/Val}, CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTM1*0, denominado, “Combinación de polimorfismos de riesgo”. Ambas donadoras fueron menores de 35 años, ninguna tomaba anticonceptivos hormonales, ni estaba embarazada.

Cultivos celulares

La sangre periférica para aislar los leucocitos se colocó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ) y colectamos 30 mL de sangre periférica, de cada una de las dos mujeres seleccionadas.

Los cultivos celulares (tratados y controles) fueron realizados bajo las mismas condiciones por triplicado, para la determinación de mRNA, del metabolito 4-CE₂ y los aductos.

Línea celular MCF-7

Utilizamos la línea celular MCF-7 como control positivo para la detección del metabolito 4-CE₂ y los aductos. Estas células fueron crecidas en Flask T-75 con medio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de SFB Charcoal Stripped (PAA Laboratories, Canadá) con 100 IU/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomicina. Las células fueron mantenidas a 37° C, con 5% de humedad y 95% de CO₂. La línea celular fue tratada con 100 mM de 17β-E₂ durante dos días antes de alcanzar la confluencia. Los cultivos control de las células MCF-7 fueron tratados solamente con dimetilsulfóxido (DMSO), en la misma cantidad (0.005%) que la utilizada para los tratamientos con 17β-E₂.

Capítulo III Estudio *in vitro*

Leucocitos

Los leucocitos obtenidos de sangre periférica de las dos mujeres donadoras los colectamos durante la fase folicular del ciclo menstrual, debido a que en ese momento del ciclo menstrual los niveles de $17\beta\text{-E}_2$ son los más bajos en mujeres premenopáusicas (Fraser & Baird, 1974). Los leucocitos fueron aislados por centrifugación utilizando Lymphoprep de acuerdo a las instrucciones del fabricante (AXIS-SHIELD.U.K.).

Para los análisis de mRNA, 1×10^6 leucocitos, fueron tratados con 100 mM de $17\beta\text{-E}_2$ disuelto en DMSO y la misma cantidad de leucocitos fueron tratados con el cotratamiento de 100 mM de $17\beta\text{-E}_2$ combinado con 100 mM del antiestrógeno ICI 182,780. Para la medición del metabolito 4-CE₂ y de los aductos, se cultivaron y se trataron 7×10^6 leucocitos con 100 mM de $17\beta\text{-E}_2$

La concentración utilizada de $17\beta\text{-E}_2$ en este estudio (100 mM) corresponde a 20 veces la concentración terapéutica máxima, ya que los modelos *in vitro* deben ser expuestos a mayores dosis que las concentraciones fisiológicas, puesto que el tiempo de exposición es más corto.

Extracción de RNA total y RT-PCR

Los leucocitos fueron cultivados por triplicado en medio RPMI 1640 libre de rojo fenol (In Vitro, México), suplementado con L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), aminoácidos no esenciales (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y SFB Charcoal Stripped (PAA Laboratories, Canadá). Después de 24 horas de haber sido aislados, los leucocitos fueron tratados durante 12 horas, con 100 mM de $17\beta\text{-E}_2$ ó con el cotratamiento 100 mM $17\beta\text{-E}_2$ y 100 mM ICI 182, 780 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), después de este tiempo las células fueron cosechadas para la extracción del mRNA. El $17\beta\text{-E}_2$ que utilizamos para tratar las células se disolvió previamente en DMSO, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), seguido de una dilución apropiada en el medio de cultivo. Utilizamos la misma concentración de DMSO para los cultivos tratados y para los cultivos control. La concentra-

Capítulo III Estudio *in vitro*

ción de DMSO era inferior a 0,1%, por lo que no se vio afectada la viabilidad celular (Baral y cols., 2000).

El RNA total fue aislado utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración se midió en un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000) y la pureza se comprobó con la relación 260/280 nm. Para verificar la integridad del RNA obtenido se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con ~500 ng de muestra en cada carril. El gel se colocó en bromuro de etidio para detectar por fluorescencia con luz ultra violeta (UV) el RNA extraído.

La síntesis del cDNA (DNA complementario) se realizó a partir de 2 µg de RNA total usando el oligo (dT) (Promega) y la transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega). Los 2 µg de RNA se mezclaron con 0.5 µg del oligo (dT) y se incubaron 5 minutos a 70°C, posteriormente se colocó en hielo y se agregó el buffer (1x), los dNTPs (0.4 mM), la enzima (200 unidades) y agua libre de RNAsas/DNAsas hasta obtener un volumen final de 25µL, se mezclaron y se incubaron 50 minutos a 37°C y 10 minutos a 50°C para desactivar la enzima. Finalmente las muestras se guardaron a -20°C para su uso posterior.

Utilizamos la técnica de RT-PCR para medir la expresión de los genes CYP1A1, CYP1B1, COMT y GSTP1 implicados en el metabolismo del 17β- E₂. Los oligonucleótidos utilizados en el análisis de RT-PCR fueron: CYP1A1, 5' AAG CAC GTT GCA GGA GCT GAT GG 3', 5' TTC CGA CAC TCT TCC TTC GT 3'; CYP1B1 5' CGC ACG GGC ATG GGA ATT 3', 5' CGG CCA AGG GTC GTT C 3'; GAPDH 5' GAA CGG GAA GCT CAC TGG CAT GG 3', 5' GCC CTC CGA CGC CTG GTT CAC 3' y GSTP1 5' CAC CAA CTA TGA GGC GGG CAA 3', 5' ATC AGC AGC AAG TCC AGC A 3'. CYP1A1 se amplificó por 30 ciclos a 95 ° C durante 30 s, 59 ° C durante 30 s, y 72 ° C por 30. CYP1B1 se amplificó por 29 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 30 s, y 72 ° C por 30 s, GAPDH y CYP1B1 se amplificaron por 27 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 58 ° C durante 30 s, y 72 ° C por 30s. COMT se realizó de acuerdo a Lehmann y cols, 2008. Los niveles de mRNA del gen GAPDH fueron utilizados como control de carga, por ser un gen que se expresa constitutivamente.

Capítulo III Estudio *in vitro*

Para la reacción de PCR se utilizaron 50 ng de cDNA, 0.2mM de dNTP's, 20 pM de cada primer, 1µL de buffer 10X, 2 mM de MgCl₂, 0.1U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y H₂O milli Q para alcanzar un volumen final de 10 µL. Los ciclos del PCR se llevaron a cabo en un termociclador Rapid Cycler de Idaho Technology. La intensidad de las bandas se determinó con el programa Image J.

Los amplicones resultantes de la técnica de PCR de los genes CYP1A1, CYP1B1, COMT y GSTPI fueron extraídos utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y se secuenciaron con ABI BigDye (Applied Biosystems), utilizando un secuenciador capilar ABI 310. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI usando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para corroborar la identidad de los fragmentos amplificados.

Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

La cuantificación del 17β-E₂ y de su metabolito 4-CE₂ se llevaron a cabo con una columna Luna Phenomenex (2) C18 fase reversa (5 µ, 100 Δ. 4,6 x 250 mm,) en un sistema de HPLC Shimadzu LC-2010 C (Shimadzu, Japón) con una función de detector UV-visible. El Software Chromatographic Class VP 5 fue utilizado para la recolección y procesamiento de datos. La absorbancia de UV se utilizó a 254 nm para la detección y cuantificación de 17β-E₂ y 4-CE₂.

El estándar 17β-E₂ se adquirió de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.) y el 4-CE₂ de Steraloids Inc (EE.UU.).

Para la extracción de los estrógenos después del tratamiento con 17β-E₂, se adicionó inmediatamente al medio de cultivo separado de los leucocitos 1% de ácido ascórbico para reducir al mínimo la oxidación de los CE, posteriormente se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10% y se realizaron 3 extracciones con acetato de etilo (30 mL cada vez) para extraer los estrógenos. Las capas de acetato de etilo se evaporaron bajo nitrógeno, y el extracto final se disolvió en acetonitrilo (JT Baker ® Ultra HPLC. EE.UU.), para el

Capítulo III Estudio *in vitro*

posterior análisis de esta solución se utilizaron filtros de 0,20 micras (Millex Japón), y se inyectaron 50µL en la columna de HPLC, para la separación de compuestos se utilizó una elución isocrática a un caudal de 1mL/min de acetonitrilo.

Espectrometría de masas

La identificación de 17β-E₂ y 4-CE₂ por HPLC se confirmó por espectrometría de masas con un espectrómetro JEOL JMS AX-505 HA por impacto electrónico en el Laboratorio de espectrometría de masas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Western Blot

Para la extracción de proteínas, después del tratamiento con 17β-E₂ ó con el contratamiento 17β-E₂ y ICI-182780 ó solamente con DMSO (control), los leucocitos se incubaron durante 20 min a 4 ° C en un buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, difosfato de sodio (Na₄P₂O₇) 40 mM, MgCl₂ 5 mM, ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) 10 M, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1% y benzamidina 5 mM), suplementado con inhibidores de proteasas: leupeptina, pepstatina y aprotinina (1 mM) y ácido okadáico (1 M). Posteriormente las células se centrifugaron a 7500 g durante 15 min a 4 ° C. El sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de las proteínas por el método de Bradford (Bradford y cols, 1976)

Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida (5-12% de gradiente), seguido de una transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra), las proteínas de interés se identificaron utilizando anticuerpos específicos primarios: RE alfa (Chemicon, MAB447) y RE beta Santa Cruz Biotechnology) y se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL (Amersham Biosciences), las imágenes fueron capturadas por el analizador Kodak ID versión de imagen 3,6 (Kodak, NY).

Capítulo III Estudio *in vitro*

El anticuerpo utilizado para determinar la fosforilación de la RE α fue anti-fosfo-RE α (ser118) (Upstate, NY) y para el control de carga se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH (Chemicon, MAB374).

Aislamiento del DNA y determinación de aductos por post-marcaje con ^{32}P

Para la detección de aductos se extrajo el DNA mediante la técnica de fenol-cloroformo y la concentración se determinó espectrofotométricamente a 260 nm. Los aductos en el DNA fueron determinados por el ensayo de post-marcaje con ^{32}P por enriquecimiento de la nucleasa P1 de acuerdo al protocolo de (Yagi y cols., 2001)

Los aductos marcados fueron separados por cromatografía en capa fina sobre placas de celulosa PEI-(Macherey-Nagel, Duren, Alemania) utilizando los siguientes disolventes: D1, 2,3 M de fosfato disódico, pH 6,0; D2, 3,8 M de formiato de litio, 6,8 M de urea, pH 3,5, y D3, cloruro de litio 0,8 M, 0,5 M Tris-HCl, 8,5 M de urea, pH 6,8. Las placas se revelaron, y la zona radiactiva diagonal se cortó para el recuento Cerenkov. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados

Para determinar si los leucocitos seleccionados expresaban la proteína del RE α , el cual es necesario para activar la vía genómica del metabolismo de los estrógenos, realizamos un Western-blot en ambas combinaciones de polimorfismos (riesgo y no riesgo) (Fig 15).

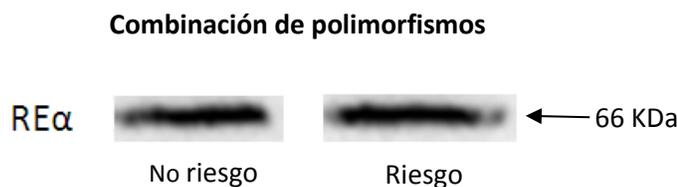


Fig 15. Western blot que muestra la presencia de la proteína del RE α en los leucocitos con los genotipos: CYP1A1^{Ile/Ile}; CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu} y GSTM1*1 denominados “Combinación de polimorfismos de no riesgo” y en leucocitos con los genotipos CYP1A1^{Val/Val}; CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTM1*0 denominados “Combinación de polimorfismos de riesgo”. Los datos que se muestran son imágenes representativas de los experimentos realizados por triplicado.

Posteriormente realizamos los cultivos celulares con ambas combinaciones de polimorfismos (riesgo y no riesgo) con los tratamientos de 17β -E₂, cotratamiento 17β -E₂ con el antiestrógeno ICI-182780 y DMSO. Las condiciones de los tratamientos se especificaron en la sección de Materiales y métodos.

Después de los tratamientos del cultivo celular se determinaron los niveles de mRNA de los genes CYP1A1, CYP1B1 y COMT, estos niveles fueron significativamente diferentes entre los leucocitos con la “Combinación de polimorfismos de riesgo” y los leucocitos con la “Combinación de polimorfismos de no riesgo”, observamos bajos niveles en el mRNA para CYP1A1 y CYP1B1, altos niveles para el mRNA del gen que codifica para la enzima de fase II COMT, en la “Combinación de polimorfismos de no riesgo”, mientras que en la “Combinación de polimorfismos de riesgo” se observó todo lo contrario, niveles significativamente mayores del mRNA para los genes CYP1A1 y CYP1B1 y bajos niveles del RNA mensajero para COMT. (Fig. 16) En el caso del transcrito para el gen GSTP1 no encontramos un cambio significativo en su modulación, tanto en la “Combinación de polimorfismos de no riesgo”, como en la “Combinación de polimorfismos de riesgo”.

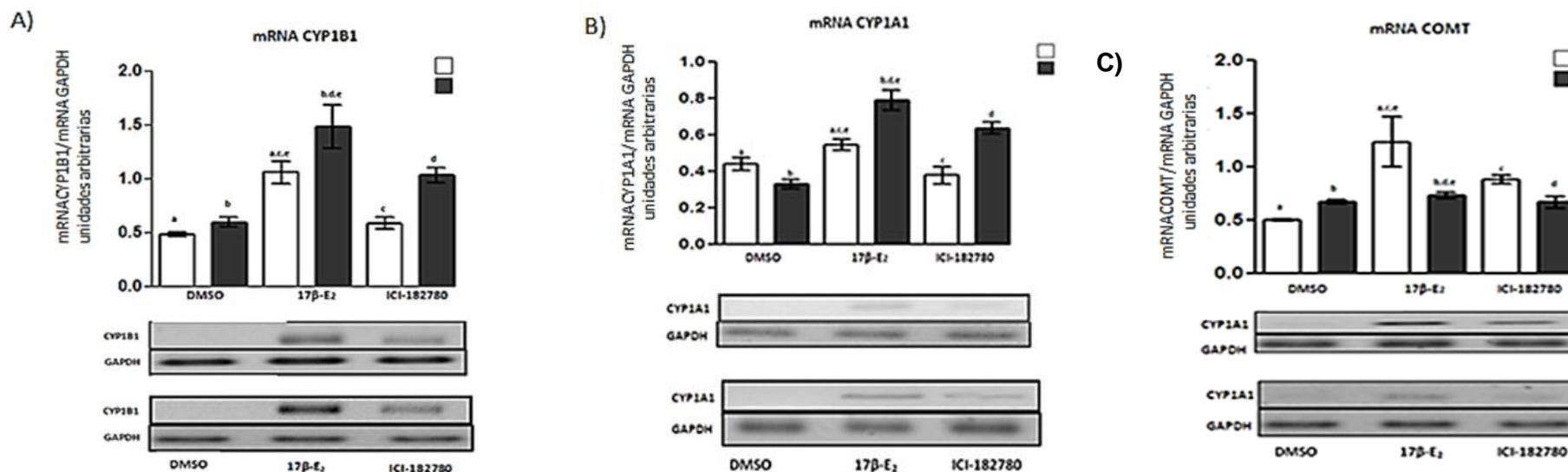


Fig. 16. Niveles detectados de mRNA de los leucocitos con los genotipos: CYP1A1^{Ile/Ile}, CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu} y GSTM1*1 denominados como □ “Combinación de polimorfismos de no riesgo” y en leucocitos con los genotipos CYP1A1^{Val/Val}, CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTM1*0 denominados como ■ “Combinación de polimorfismos de riesgo”.

Los leucocitos (2×10^6) fueron tratados con DMSO (grupo control), 17β-E₂ and ICI-182780 (antiestrógeno). La evaluación densitométrica de las imágenes se realizaron utilizando a GAPDH como control de carga. Las barras representan las medias ± desviación estándar de los experimentos por triplicado. (*) Diferencias significativas. Se utilizó ANOVA con la prueba post hoc Tukey. Los números indican los grupos que se compararon; **a**, diferencia entre el grupo control y el grupo tratado con 17β-E₂ de la “Combinación de polimorfismos de no riesgo”, **b**, diferencia entre el grupo control y el grupo tratado con 17β-E₂ de la “Combinación de polimorfismos de riesgo”, **c**, diferencia entre el grupo tratado con 17β-E₂ y el grupo tratado con ICI-182, 780 de la “Combinación de polimorfismos de no riesgo”, **d**, diferencia entre el grupo tratado con 17β-E₂ y el grupo tratado con ICI-182, 780 del “Combinación de polimorfismos de riesgo”, **e**, diferencia entre los grupos tratados con 17β-E₂ de la “Combinación de polimorfismos de no riesgo” vs la “Combinación de polimorfismos de riesgo”. **4-A** son los niveles de mRNA de CYP1B1; **a** (***), **b** (***), **c** (**), **d** (**), **e** (**). **4-B** son los niveles de mRNA de CYP1A1, **a** (ns), **b** (***), **c** (**), **d** (**), **e** (***), **4-C** son los niveles de mRNA de la COMT, **a** (***), **b** (ns), **c** (*), **d** (ns), **e** (**). ns (no significativo), * (p < 0.05), ** (P < 0.01), *** (p < 0.001).

Capítulo III Estudio *in vitro*

Para confirmar que los niveles detectados de mRNA fueran modulados por la vía genómica del RE, los cultivos de leucocitos se trataron con un antiestrógeno tipo II, llamado (ICI-182780), que evita la dimerización del RE y por lo tanto su unión al ERE y por medio de este mecanismo es capaz de modular la transcripción de los genes involucrados en el metabolismo de la vía genómica del 17β -E₂ (Fawell y cols., 1990).

Observamos que cuando aplicábamos el cotratamiento de 17β -E₂ y el antiestrógeno, disminuían significativamente los niveles de mRNA comparados con los tratados sólo con 17β -E₂ (Fig 16).

Por otro lado también realizamos la técnica de Western-Blot para detectar la proteína del RE α fosforilado, con el cual se confirmó que la activación de éste receptor nuclear disminuye significativamente con el cotratamiento (Fig. 17).

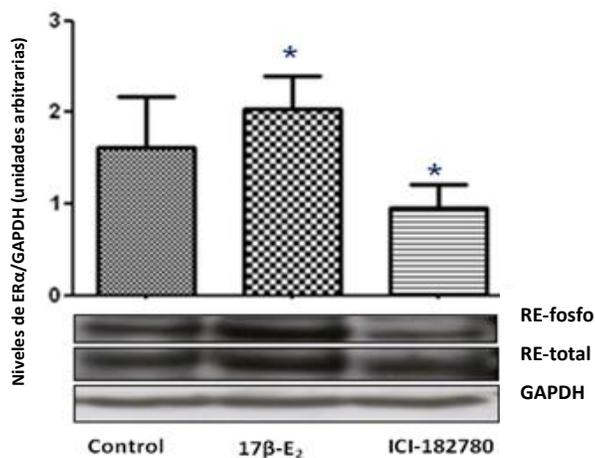


Fig 17. Densitometría de la fosforilación de la proteína del RE α con 17β -E₂, del cotratamiento 17β -E₂ y ICI 182780 y el control con DMSO.

Las barras muestran los valores de las densitometrías de los Western Blots de la fosforilación del RE α después de los tratamientos con 17β -E₂, ICI 182780 y controles (DMSO). La evaluación densitométrica de las imágenes se realizaron utilizando a GAPDH como control de carga. Las barras representan las medias \pm desviación estándar de los experimentos por triplicado. (*) Diferencias significativas con respecto al control (DMSO), de acuerdo a la prueba post hoc Tukey $p < 0.05$

Capítulo III Estudio *in vitro*

Los niveles detectados y cuantificados del metabolito 4-CE₂ en nuestro medelo *in vitro* confirmaron la diferencia en el comportamiento de la “Combinación de polimorfismos de riesgo” comparado con la “Combinación de polimorfismos de no riesgo” ya que detectamos niveles significativamente menores de 4-CE₂ en la “Combinación de polimorfismos de no riesgo” comparado con la “Combinación de polimorfismos de riesgo”, es interesante mencionar que en los niveles de 17β-E₂ no se detectaron diferencias entre ambas combinaciones de polimorfismos. (Fig 18).

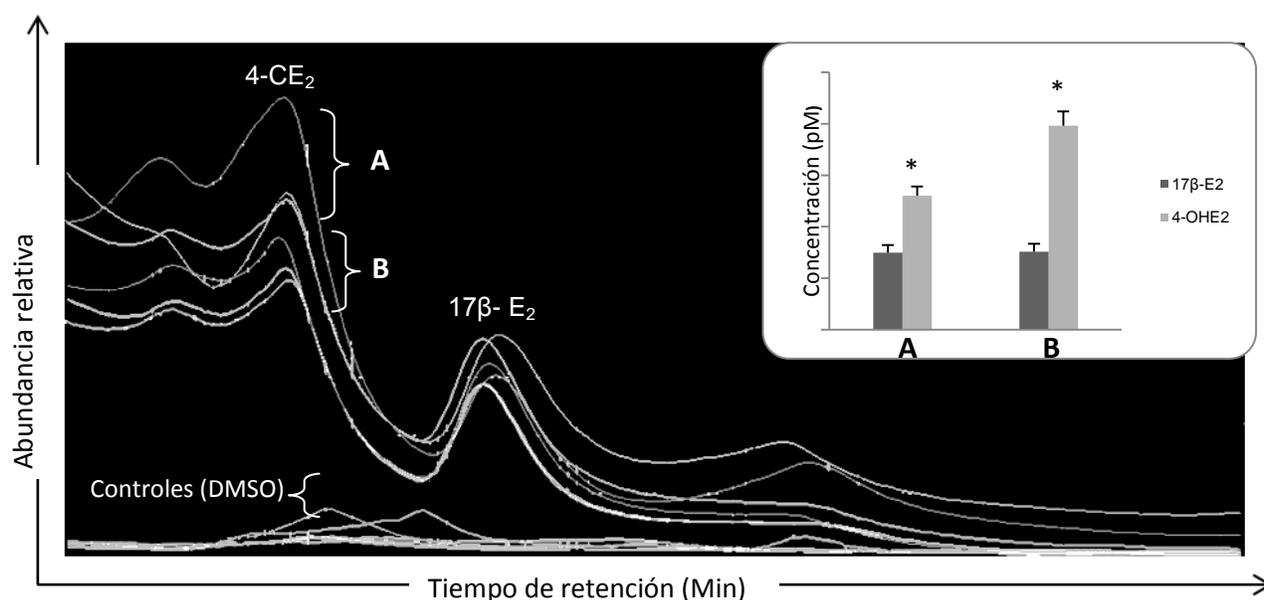


Fig 18. Determinación de los niveles de 17β-E₂ y 4-CE₂ mediante la técnica de HPLC. **A**: Leucocitos con los genotipos CYP1A1^{Val/Val}, CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTM1*0 denominados como “Combinación de polimorfismos de riesgo” **B**: Leucocitos con los genotipos: CYP1A1^{Ile/Ile}, CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu} y GSTM1*1 denominados como “Combinación de polimorfismos de no riesgo”. Las barras representan las medias ± desviación estándar de los experimentos por triplicado * Diferencias significativas.

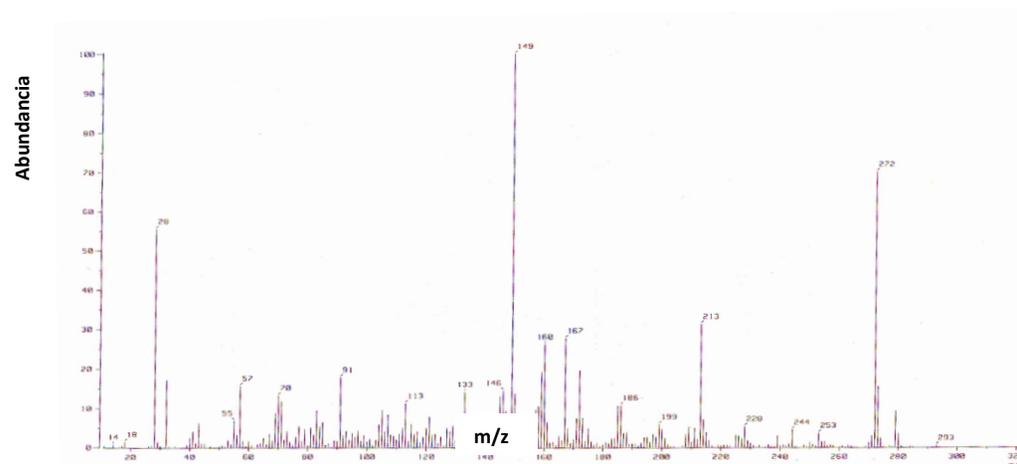
Capítulo III Estudio *in vitro*

La identidad de los compuestos obtenidos por HPLC los corroboramos por espectrometría de masas comparando los picos que corresponden a los iones característicos de las moléculas $17\beta\text{-E}_2$ y 4-CE_2 (estándares comerciales con un 99% de pureza), con los iones que obtuvimos de las muestras obtenidas de los leucocitos después del tratamiento con $17\beta\text{-E}_2$.

Esta fragmentación de los iones de las moléculas $17\beta\text{-E}_2$ y 4-CE_2 y de las muestras obtenidas se muestra en las figuras 19 y 20.

Por otro lado, detectamos los aductos formados por el tratamiento de leucocitos con $17\beta\text{-E}_2$, en ambas combinaciones de polimorfismos y estos aductos fueron significativamente más altos en la “Combinación de polimorfismos de no riesgo” a comparación de la “Combinación de polimorfismos de riesgo” (Figura 21)

17 β -E₂ (estándar)



17 β -E₂ (muestra de leucocitos)

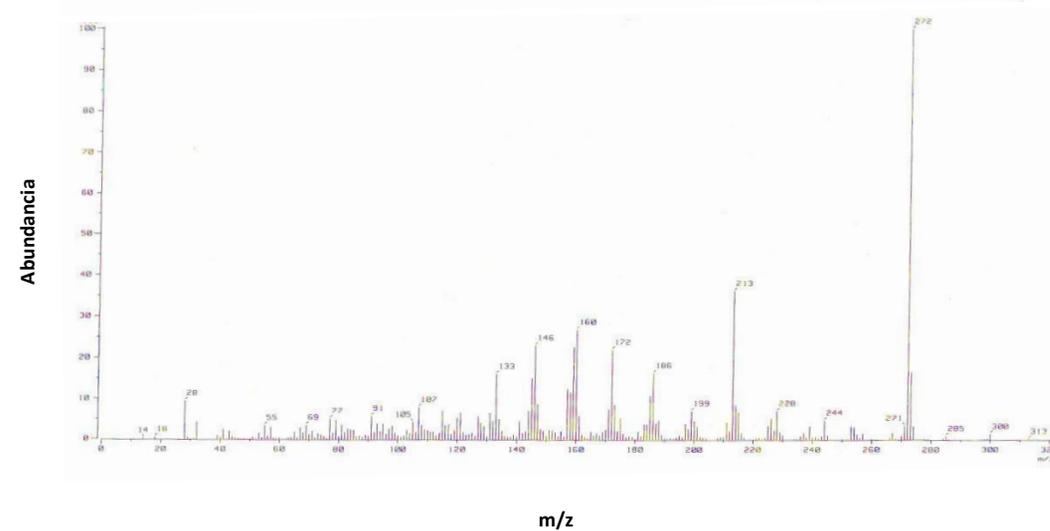
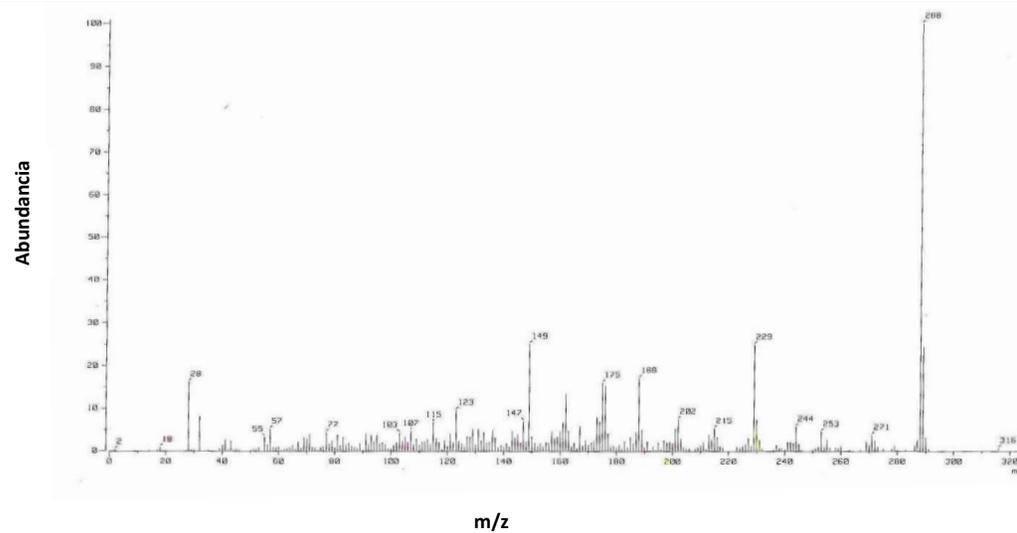


Fig 19. Comparación de la fragmentación iónica del estándar 17 β -E₂ y la muestra obtenida de leucocitos por HPLC.

4-CE₂ (estándar)



4-CE₂ (muestra de leucocitos)

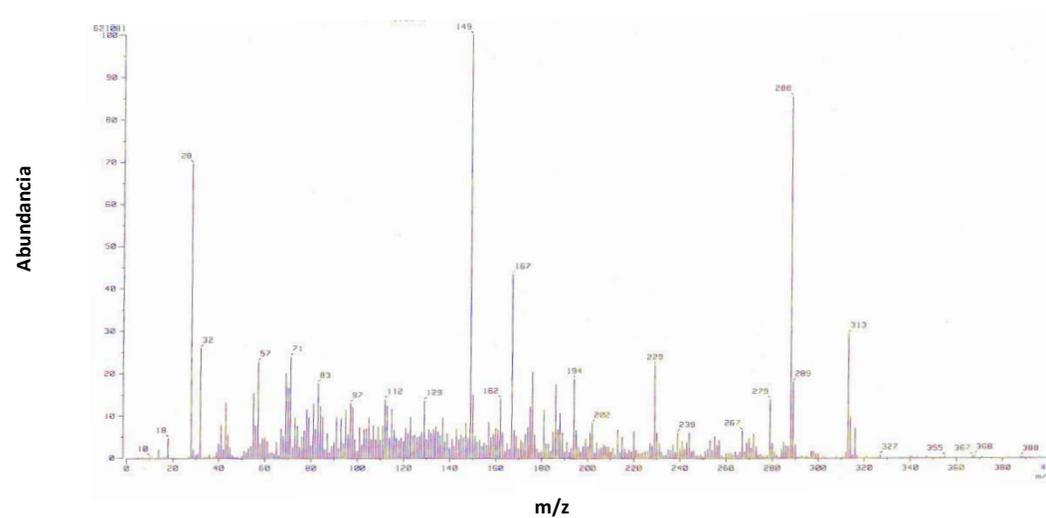


Fig 20. Comparación de la fragmentación iónica del estándar 4-CE₂ y la muestra obtenida de leucocitos por HPLC.

Capítulo III Estudio *in vitro*

TRATAMIENTOS

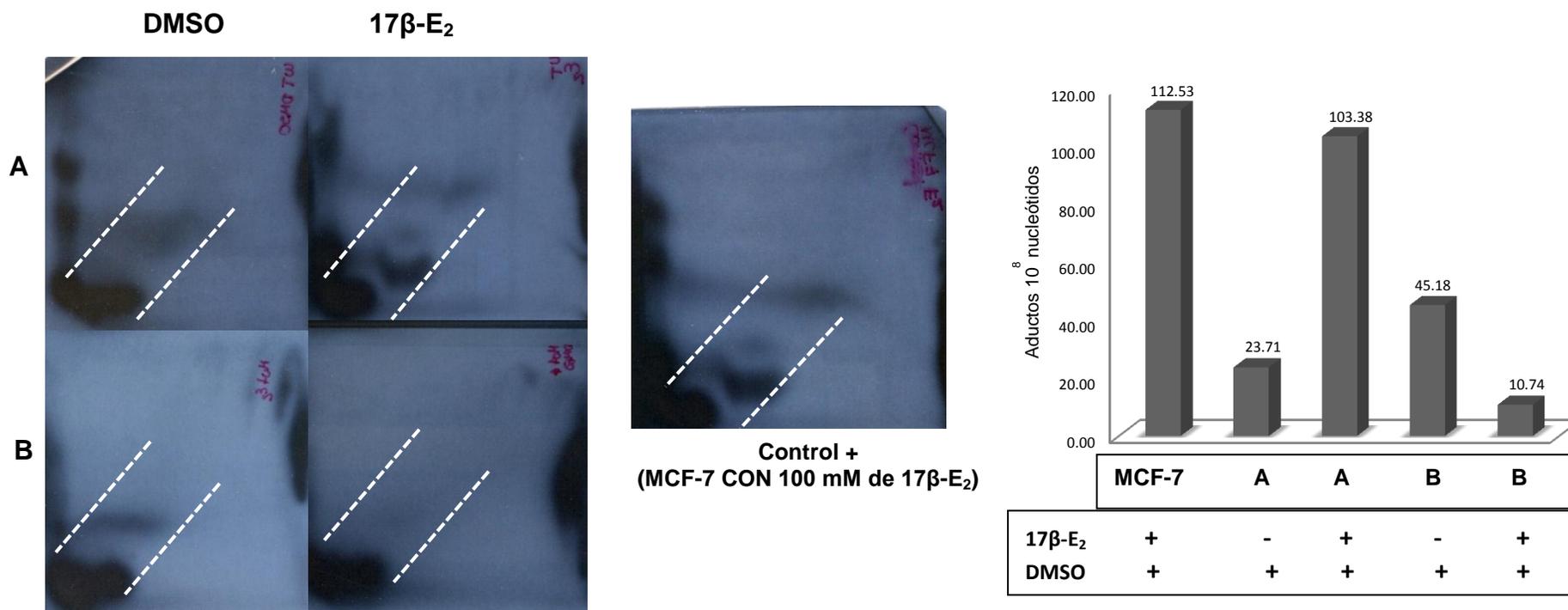


Fig 21. Figuras representativas de los aductos detectados mediante la técnica de Post-post-marcaje con ^{32}P , producto del tratamiento en células MCF-7 y en leucocitos con los genotipos: CYP1A1^{Ile/Ile}; CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu} y GSTM1*1 denominados como “Combinación de polimorfismos de no riesgo” y con en leucocitos con los genotipos CYP1A1^{Val/Val}; CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTM1*0 denominados como “Combinación de polimorfismos de riesgo”, tratados con DMSO y 17β-E₂. El área señalada corresponde a la zona en la que se detectaron los aductos. **A**: Leucocitos con los genotipos CYP1A1^{Val/Val}; CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Val/Val} y GSTM1*0 denominados como “Combinación de polimorfismos de riesgo” **B**: Leucocitos con los genotipos: CYP1A1^{Ile/Ile}; CYP1B1^{Leu/Leu}, COMT^{Val/Val}, GSTP1^{Leu/Leu} y GSTM1*1 denominados como “Combinación de polimorfismos de no riesgo”.

Capítulo III Estudio *in vitro*

Discusión

Para el estudio *in vitro* elegimos leucocitos de sangre periférica como modelo celular debido a que se ha reportado que los citocromos P450 y COMT están abundantemente representados en estas células, así como también se ha reportado que la expresión de su mRNA y de sus proteínas son moduladas mediante diversos compuestos químicos (Raucy y cols., 1997). Es importante saber que se han identificado los receptores RE α y RE β en leucocitos humanos de sangre periférica (Kassi y cols., 2001, Phiel y cols., 2005, Suenaga y cols., 1998, Scariano y cols., 2008), y se ha reportado que el RE α modula directamente al CYP1B1, ya que este gen contiene un elemento de respuesta a estrógenos (Furukawa y cols., 2004). Por otro lado, existen reportes que mencionan que el CYP1A1 en humanos está regulado vía el RE α (Tsuchiya y cols., 2004) y Labrecque, y cols en el 2012 demuestra con un ensayo de inmuno precipitación de la cromatina que en las células MCF-7 tratadas con 17 β -E₂, el CYP1A1 es capaz de reclutar a el RE α (Labrecque y cols., 2012).

La diferencia encontrada en los niveles de mRNA de CYP1A1, entre la “*Combinación de polimorfismos de riesgo*” y la “*Combinación de polimorfismos de no riesgo*”, puede ser que tenga relación con el polimorfismo CYP1A1 Ile462Val (rs1048943), ya que de acuerdo con Ricci el citocromo 1A1 es modulado por el 17 β -E₂ (Ricci y cols., 1999), y afecta los niveles de mRNA y actividad enzimática de CYP1A1 en leucocitos, esta afectación en los niveles del transcrito y de la proteína, probablemente esté dado porque el cambio de nucleótido A / G se encuentra muy cerca del sitio de poliadenilación del mRNA, fuera de la región codificante, esto puede tener efecto en la estabilidad del mensajero y por lo tanto modificar la inducción de este gen (Garte y cols., 2003), otra teoría es que este polimorfismo pueda afectar un área del gen que contenga un enhancer y de esta manera pueda modular la expresión del gen.

En el caso de las diferencias encontradas en los niveles de mRNA del CYP1B1 entre la “*Combinación de polimorfismos de riesgo*” y la “*Combinación de polimorfismos de no riesgo*”, observamos que estos resultados son similares a los encontrados por Helming, y cols, 2009, los cuales muestran la influencia del polimorfismo CYP1B1 (rs1056836) en la

Capítulo III Estudio *in vitro*

expresión del mRNA en leucocitos humanos entre los homocigos Leu/Leu y Val/Val (Helmig y cols., 2009). Esta diferencia en los niveles de mRNA puede estar relacionada con el polimorfismo rs1056836 ya que el cambio de bases C por G podría afectar la estabilidad del mRNA o podría ser que mediante el efecto de desequilibrio de ligamiento existan otras variantes del CYP1B1 las cuales pueden tener secuencias reguladoras de la transcripción.

En cuanto a los bajos niveles de mRNA encontrados en COMT en la “Combinación de polimorfismos de riesgo” comparado con la “Combinación de polimorfismos de no riesgo”, podrían estar relacionados con lo reportado por Nackley en el 2006, ya que en dicho trabajo muestra como el polimorfismo rs4680 del gen COMT afecta la estabilidad de la estructura secundaria del mRNA, (Nackley y cols., 2006) y por lo tanto propicia la degradación del transcrito, por otro lado Chen en el 2004 muestra como en leucocitos que tienen el polimorfismo COMT rs4680 disminuye significativamente los niveles de mRNA (Chen y cols., 2004).

Por otro lado, los resultados que obtuvimos con el cotratamiento del 17β -E₂ combinado con el antiestrógeno ICI 182780 nos apoyan a confirmar que la expresión observada en los genes CYP1A1, CYP1B1 y COMT, está regulada por la vía genómica del receptor de estrógenos, esta activación se da por la adición de 17β -E₂ a los leucocitos y a pesar de que se detecta una disminución en los niveles de mRNA, no se logró bloquear totalmente la activación del RE α , esto puede ser debido a la diferencia de la afinidad entre el antiestrógeno ICI 182780 y el 17β -E₂ por el RE α (Joel y cols., 1998).

Para corroborar las diferencias en el riesgo de padecer CaMa entre las dos combinaciones de polimorfismos incluidas en este trabajo (riesgo y no riesgo), detectamos y cuantificamos el metabolito 4-CE₂, ya que es este metabolito el que tiene la mayor evidencia carcinogénica y mutagénica, documentado en diversos modelos celulares y animales (Liehr y cols., 1986, Li & Li, 1987, Yager & Liehr, 1996), a diferencia del metabolito 2-CE₂ del cual se ha reportado que su metabolito el 2-metoxiestradiol (producto O-metilado del 2-CE₂) tiene propiedades antiangiogénicas (Li & Li, 1987, Liehr y cols., 1986).

La diferencia en la concentración del metabolito 4-OHE₂ encontrada en nuestro estudio entre la “Combinación de polimorfismos de riesgo” y la “Combinación de polimorfismos de

Capítulo III Estudio *in vitro*

no riesgo”, puede ser explicada por algunos reportes previos como el de Kisselev en el 2005, en el cual se muestra que la variante Ile/Ile del CYP1A1 tiene actividad catalítica significativamente más alta en la hidroxilación en posiciones 2 y 4 del $17\beta\text{-E}_2$, a comparación de la variante silvestre Val/Val del CYP1A1 (Kisselev y cols., 2005), por otro lado para el polimorfismo rs1056836 del gen CYP1B1, se ha reportado que la variante homóciga mutante Val/Val forma mayor cantidad del metabolito 4-hidroxiestradiol que la variante homóciga silvestre Leu/Leu. Esta diferencia en el potencial de hidroxilación de ambas enzimas se ve reflejada en los niveles del metabolito carcinogénico 4-CE₂ detectado y cuantificado en ambas combinaciones de polimorfismos (riesgo y no riesgo) incluidos en este estudio.

La diferencia encontrada entre la “Combinación de polimorfismos de riesgo” y la “Combinación de polimorfismos de no riesgo” en la formación del metabolito carcinogénico 4-CE₂, puede también estar influenciada por el polimorfismo COMT Val158Met (rs4680), similar a lo que reporta Lachman, y cols. el 1995, ya que demuestra cómo el cambio en el aminoácido Val por Met en posición 158, altera la estabilidad y disminuye la capacidad de metilación (Lachman y cols., 1996), por lo que puede disminuir la inactivación de los CE aumentando la cantidad de metabolitos carcinogénicos y por lo tanto puede verse reflejado en un incremento en el riesgo de padecer CaMa (Lavigne y cols., 1997).

La importancia en las concentraciones diferenciales detectadas del 4-CE₂ radica en que este metabolito es considerado un marcador de riesgo para el cáncer de mama, ya que se han encontrado niveles más altos en sangre y en tejido mamario en mujeres con CaMa, comparado con los niveles encontrados en mujeres sin cáncer de mama, (Eliassen y cols., 2012, Huang y cols., 2011, Blander, 2006, Gaikwad y cols., 2008, Russo & Russo, 2006, Todorovic y cols., 2001).

Con el fin de incluir otro marcador de riesgo para desarrollar CaMa, decidimos determinar los aductos formados como resultado del metabolismo del $17\beta\text{-E}_2$ adicionado a los leucocitos de ambas combinaciones de polimorfismos (riesgo y no riesgo), ya que en estudios previos se ha asociado a la presencia de aductos, productos de otros compuestos, como un claro biomarcador de diferentes tipos de neoplasias, entre ellas, la de la glándula mamaria.

Capítulo III Estudio *in vitro*

Chakravri en el 2006 muestra como las orto-quinonas (quinonas producto de la oxidación de los CE) son capaces de formar aductos en el DNA de leucocitos circulantes, que posteriormente pueden producir mutaciones que aumentan el riesgo de iniciar una neoplasia en la glándula mamaria (Chakravarti y cols., 2006).

Es importante mencionar que nosotros somos los primeros en inducir y detectar los aductos estables por medio de post-marcaje con ^{32}P , formados en nuestro modelo *in vitro*, resultado del metabolismo del $17\beta\text{-E}_2$.

La diferencia significativa en los aductos detectados es muy importante, ya que de acuerdo con diversas publicaciones, la técnica utilizada en nuestro estudio nos permite detectar aductos estables, sin embargo se ha mostrado que para el desarrollo de cáncer de mama como consecuencia de metabolismo de las hormonas, los aductos más importantes son los inestables, ya que producen sitiosapurínicos los cuales pueden introducir una mutación en genes críticos e iniciar una neoplasia. Sin embargo, resulta de suma importancia realizar un mayor número de repeticiones de nuestro modelo *in vitro*, así como cuantificar los aductos inestables, para tener un panorama más completo de los metabolitos formados.

Nuestros resultados del modelo *in vitro*, son muy importantes ya que por primera vez en un modelo no invasor (células circulantes), fuimos capaces de reproducir parte del metabolismo del $17\beta\text{-E}_2$, parecido al que ocurre en el tejido de la glándula mamaria, es decir, que en nuestro modelo, pudimos determinar y medir los niveles de dos biomarcadores del CaMa, el 4-CE2 y los aductos.

Este modelo puede ser muy útil para predecir el riesgo individual que tienen una mujer a desarrollar cáncer de mama, ya que es capaz de incluir la combinación genética individual, y también podría ayudar a evaluar el riesgo de desarrollar esta neoplasia en las mujeres que utilicen estrógenos exógenos como, anticonceptivos hormonales y/o terapia hormonal de reemplazo.

Este trabajo aporta información para clarificar la razón por la cual los polimorfismos CYP1A1 Ile462Val (rs1048943), CYP1B1*3 (rs1056836) y COMT Val158Met (rs4680) están involucrados en la etiología el cáncer de mama, y han sido relacionados en diferentes estudios epidemiológicos en diversas poblaciones (Crofts y cols., 1994, Surekha y cols.,

Capítulo III Estudio *in vitro*

2009, Singh y cols., 2007, De Vivo y cols., 2002, Torresan y cols., 2008), así como también se ha demostrado que inducen tumores en diferentes modelos animales.

Debido a que las enzimas de los genes CYP1A1, CYP1B1 Y COMT están relacionadas en el metabolismo principal de los estrógenos, en el cual se pueden formar semiquinonas y quinonas (CE-Q), que pueden reaccionar con el DNA para formar principalmente depuración de los aductos 4-OHE₂-1-N3Ade y 4-OHE₂-1-N7Gua, los cuales forman sitios apurínicos que pueden ocasionar mutaciones que induzcan la transformación celular y se inicie una serie de eventos que resulten en una neoplasia. Lu en el 2007 muestra como una disminución en la actividad de COMT se relaciona con un incremento en la formación de sitios apurínicos y lo tanto que se ve reflejado en el aumento de riesgo para desarrollar CaMa.

Estas diferencias interindividuales de las variantes alélicas puede ayudar a explicar por qué las mujeres jóvenes desarrollan cáncer de mama, ya que en nuestro estudio de casos y controles, también se muestra que en las mujeres mexicanas estos polimorfismos pueden estar asociados con el riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Los datos obtenidos en este estudio *in vitro* son muy valiosos, ya que este modelo puede ser propuesto para un estudio piloto que incluya una mayor combinación de genes, incluyendo genes de reparación, un mayor número de metabolitos del estradiol y también es necesario incluir más mujeres tanto premenopáusicas como postmenopáusicas.

Capítulo III Estudio *in vitro*

Conclusiones del estudio *in vitro*

En el presente estudio se consiguió diseñar un modelo no invasivo para simular el metabolismo de los estrógenos tomando en cuenta la combinación genética interindividual.

En nuestro estudio *in vitro*, obtuvimos diferencias significativas en la expresión del mRNA de los genes CYP1A1, CYP1B1 y COMT que puede estar relacionada con la presencia de los polimorfismos CYP1A1 Ile462Val (rs1048943), CYP1B1 * 3 (rs1056836) y COMT Val158Met (rs4680) en los leucocitos seleccionados.

En los leucocitos con la combinación de polimorfismos de riesgo se encontró una mayor formación del metabolito 4-CE₂ y menores niveles de aductos estables.

Es necesario realizar más estudios para corroborar los datos obtenidos, así como incluir un mayor número de mujeres con diferentes combinaciones de polimorfismos.

REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, S. Z., el-Zein, R. A., Anwar, W. A. & Au, W. W. (1996). *Cancer Lett* **107**, 229-233.
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Graham, S., Marshall, J. R., Vena, J. E., Brasure, J. R., Laughlin, R., Nemoto, T., Michalek, A. M., Harrington, A. & y cols. (1995). *Cancer Res* **55**, 3483-3485.
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Thompson, P. A., Bowman, E., Vena, J. E., Marshall, J. R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T. & Shields, P. G. (1999). *Cancer Res* **59**, 602-606.
- Anderson, D. E. & Badzioch, M. D. (1985). *Cancer* **56**, 2092-2098.
- Anderson, T. J., Ferguson, D. J. & Raab, G. M. (1982). *Br J Cancer* **46**, 376-382.
- Apter, D., Reinila, M. & Vihko, R. (1989). *Int J Cancer* **44**, 783-787.
- Ballard-Barbash, R. (1994). *Cancer* **74**, 1090-1100.
- Balmain A, Gray J. Ponder B. Nature Genetics Supplement. 2003.33.238-244
- Baral, E., Nagy, E., Kwok, S., McNicol, A., Gerrard, J. & Berczi, I. (2000). *Neuroimmunomodulation* **7**, 68-76.
- Baron, J. A., La Vecchia, C. & Levi, F. (1990). *Am J Obstet Gynecol* **162**, 502-514.
- Beato, M. (1989). *Cell* **56**, 335-344.
- Beekman, J. M., Allan, G. F., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1993). *Mol Endocrinol* **7**, 1266-1274.
- Berkey, C. S., Frazier, A. L., Gardner, J. D. & Colditz, G. A. (1999). *Cancer* **85**, 2400-2409.
- Bernstein, L. (2002). *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 3-15.
- Bernstein, L., Henderson, B. E., Hanisch, R., Sullivan-Halley, J. & Ross, R. K. (1994). *J Natl Cancer Inst* **86**, 1403-1408.
- Blair, I. A. (2010). *Steroids* **75**, 297-306.
- Blander, C. L. (2006). *N Engl J Med* **354**, 1647-1648; author reply 1647-1648.
- Bozina, N., Bradamante, V. & Lovric, M. (2009). *Arh Hig Rada Toksikol* **60**, 217-242.
- Campbell, M. J., Julious, S. A. & Altman, D. G. (1995). *BMJ* **311**, 1145-1148.
- Cavalieri, E., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., Muti, P., Rogan, E., Russo, J., Santen, R. & Sutter, T. (2006). *Biochim Biophys Acta* **1766**, 63-78.
- Cavalieri, E. L. & Rogan, E. G. (2004). *Ann N Y Acad Sci* **1028**, 247-257.
- Clarke, R., Dickson, R. B. & Lippman, M. E. (1992). *Crit Rev Oncol Hematol* **12**, 1-23.
- Clemons, M. & Goss, P. (2001). *N Engl J Med* **344**, 276-285.
- Crofts, F., Taioli, E., Trachman, J., Cosma, G. N., Currie, D., Toniolo, P. & Garte, S. J. (1994). *Carcinogenesis* **15**, 2961-2963.
- Chakravarti, D., Zahid, M., Backora, M., Myers, E. M., Gaikwad, N., Weisenburger, D. D., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. & Joshi, S. S. (2006). *Leuk Lymphoma* **47**, 2635-2644.
- Charrier, J., Maugard, C. M., Le Mevel, B. & Bignon, Y. J. (1999). *Br J Cancer* **79**, 346-353.

REFERENCIAS

- Chen, J., Lipska, B. K., Halim, N., Ma, Q. D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B. S., Hyde, T. M., Herman, M. M., Apud, J., Egan, M. F., Kleinman, J. E. & Weinberger, D. R. (2004). *Am J Hum Genet* **75**, 807-821.
- De Vivo, I., Hankinson, S. E., Li, L., Colditz, G. A. & Hunter, D. J. (2002). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 489-492.
- Delgado B. *Cancer epidemiol Biomarkers Prev*. 2008. (17). 43-50
- Dickson, R. B. & Lippman, M. E. (1987). *Endocr Rev* **8**, 29-43.
- Dorgan, J. F., Longcope, C., Stephenson, H. E., Jr., Falk, R. T., Miller, R., Franz, C., Kahle, L., Campbell, W. S., Tangrea, J. A. & Schatzkin, A. (1997). *Environ Health Perspect* **105 Suppl 3**, 583-585.
- Duax, W. L., Griffin, J. F., Weeks, C. M. & Wawrzak, Z. (1988). *J Steroid Biochem* **31**, 481-492.
- Dumitrescu, R. G. & Cotarla, I. (2005). *J Cell Mol Med* **9**, 208-221.
- Dunn, L. J. & Bradbury, J. T. (1967). *Am J Obstet Gynecol* **97**, 465-471.
- Dupont, W. D. & Page, D. L. (1985). *N Engl J Med* **312**, 146-151.
- Egan, K. M., Cai, Q., Shu, X. O., Jin, F., Zhu, T. L., Dai, Q., Gao, Y. T. & Zheng, W. (2004). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 197-204.
- Eliassen, A. H., Spiegelman, D., Xu, X., Keefe, L. K., Veenstra, T. D., Barbieri, R. L., Willett, W. C., Hankinson, S. E. & Ziegler, R. G. (2012). *Cancer Res* **72**, 696-706.
- Escrich, E., Solanas, M., Moral, R., Costa, I. & Grau, L. (2006). *Clin Transl Oncol* **8**, 868-883.
- Evans, R. M. (1988). *Science* **240**, 889-895.
- Fawell, S. E., White, R., Hoare, S., Sydenham, M., Page, M. & Parker, M. G. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6883-6887.
- Feigelson, H. S. & Henderson, B. E. (1996). *Carcinogenesis* **17**, 2279-2284.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. (2010). *Int J Cancer* **127**, 2893-2917.
- Fernández, S. V., Russo, I. H. & Russo, J. (2006). *Int J Cancer* **118**, 1862-1868.
- Fletcher O, Houlston R. *Nat Rev Cancer*. 2010. 10: 353-361
- Floderus, Y., Saaf, J., Ross, S. B. & Wetterberg, L. (1981). *Ups J Med Sci* **86**, 309-318.
- Forman, B. M. & Samuels, H. H. (1990). *Mol Endocrinol* **4**, 1293-1301.
- Forman, M. R., Hursting, S. D., Umar, A. & Barrett, J. C. (2004). *Annu Rev Nutr* **24**, 223-254.
- Fraser, I. S. & Baird, D. T. (1974). *J Clin Endocrinol Metab* **39**, 564-570.
- Freund, G. (1979). *Cancer Res* **39**, 2899-2901.
- Furukawa, M., Nishimura, M., Ogino, D., Chiba, R., Ikai, I., Ueda, N., Naito, S., Kuribayashi, S., Moustafa, M. A., Uchida, T., Sawada, H., Kamataki, T., Funae, Y. & Fukumoto, M. (2004). *Cancer Sci* **95**, 520-529.
- Gaikwad, N. W., Yang, L., Muti, P., Meza, J. L., Pruthi, S., Ingle, J. N., Rogan, E. G. & Cavalieri, E. L. (2008). *Int J Cancer* **122**, 1949-1957.
- Gail, M. H., Brinton, L. A., Byar, D. P., Corle, D. K., Green, S. B., Schairer, C. & Mulvihill, J. J. (1989). *J Natl Cancer Inst* **81**, 1879-1886.
- Garrido-Latorre, F., Lazcano-Ponce, E. C., López-Carrillo, L. & Hernandez-Avila, M. (1996). *Int J Gynaecol Obstet* **53**, 159-166.

REFERENCIAS

- Garte, S., Ganguly, S. & Taioli, E. (2003). *Biochem Pharmacol* **65**, 441-445.
- Hayashi, S. I., Watanabe, J., Nakachi, K. & Kawajiri, K. (1991). *Nucleic Acids Res* **19**, 4797.
- Helmig, S., Hadzaad, B., Dohrel, J. & Schneider, J. (2009). *Drug Metab Dispos* **37**, 1490-1495.
- Helzlsouer, K. J., Selmin, O., Huang, H. Y., Strickland, P. T., Hoffman, S., Alberg, A. J., Watson, M., Comstock, G. W. & Bell, D. (1998). *J Natl Cancer Inst* **90**, 512-518.
- Henderson, B. E., Ross, R. K., Judd, H. L., Krailo, M. D. & Pike, M. C. (1985). *Cancer* **56**, 1206-1208.
- Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Sánchez G. *Salud Pública Mex.* 2009; 51 (2). S197-S207
- Ho, B. C., Wassink, T. H., O'Leary, D. S., Sheffield, V. C. & Andreasen, N. C. (2005). *Mol Psychiatry* **10**, 229, 287-298.
- Honda, A., Kurabayashi, T., Yahata, T., Tomita, M., Takakuwa, K. & Tanaka, K. (1998). *Int J Gynaecol Obstet* **63**, 253-258.
- Houlston R, Peto J. *Nature.* 2004. 23: 6471-6476
- Huang, C. S., Chern, H. D., Chang, K. J., Cheng, C. W., Hsu, S. M. & Shen, C. Y. (1999). *Cancer Res* **59**, 4870-4875.
- Huang, H. J., Chiang, P. H. & Chen, S. H. (2011). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **879**, 1748-1756.
- Hulka, B. S. & Moorman, P. G. (2001). *Maturitas* **38**, 103-113; discussion 113-106.
- Hunter, D. J. & Willett, W. C. (1993). *Epidemiol Rev* **15**, 110-132.
- Jefcoate, C. R., Liehr, J. G., Santen, R. J., Sutter, T. R., Yager, J. D., Yue, W., Santner, S. J., Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G. & Berstein, L. (2000). *J Natl Cancer Inst Monogr* 95-112.
- Jiao, H., Liu, C., Guo, W., Peng, L., Chen, Y. & Martin, F. L. *Biomark Insights* **5**, 21-27.
- Joel, P. B., Traish, A. M. & Lannigan, D. A. (1998). *J Biol Chem* **273**, 13317-13323.
- Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R. G., Neriishi, K. & Land, C. E. (2000). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 575-579.
- Kassi, E. N., Vlachoyiannopoulos, P. G., Moutsopoulos, H. M., Sekeris, C. E. & Moutsatsou, P. (2001). *Eur J Clin Invest* **31**, 86-93.
- Kaushal, M., Mishra, A. K., Raju, B. S., Ihsan, R., Chakraborty, A., Sharma, J., Zomawia, E., Verma, Y., Katakai, A., Kapur, S. & Saxena, S. *Mutat Res* **703**, 143-148.
- Kawajiri, K. (1999). *IARC Sci Publ* 159-172.
- Kelsey, J. L. & Horn-Ross, P. L. (1993). *Epidemiol Rev* **15**, 7-16.
- Key, T. J. (1999). *Endocr Relat Cancer* **6**, 175-180.
- Key, T. J., Verkasalo, P. K. & Banks, E. (2001). *Lancet Oncol* **2**, 133-140.
- Khan, N., Afaq, F. & Mukhtar, H. (2010). *Cancer Lett* **293**, 133-143.
- Kisselev, P., Schunck, W. H., Roots, I. & Schwarz, D. (2005). *Cancer Res* **65**, 2972-2978.
- Knaul F, Arreola-Ornelas H, Velázquez E, Dorantes J, Méndez O, Ávila-Burgos L. *Salud Pública Mex.* 2009. 51(2). S286-S295
- Kocabas, N. A., Sardas, S., Cholerton, S., Daly, A. K. & Karakaya, A. E. (2002). *Arch Toxicol* **76**, 643-649.

REFERENCIAS

- Kuper, H., Ye, W., Weiderpass, E., Ekblom, A., Trichopoulos, D., Nyren, O. & Adami, H. O. (2000). *Br J Cancer* **83**, 949-951
- Labrecque, M. P., Takhar, M. K., Hollingshead, B. D., Prefontaine, G. G., Perdew, G. H. & Beischlag, T. V. (2012). *PLoS One* **7**, e29545.
- Lachman, H. M., Papolos, D. F., Saito, T., Yu, Y. M., Szumlanski, C. L. & Weinshilboum, R. M. (1996). *Pharmacogenetics* **6**, 243-250.
- Lahiri, D. K. & Nurnberger, J. I., Jr. (1991). *Nucleic Acids Res* **19**, 5444.
- Landi, M. T., Bertazzi, P. A., Shields, P. G., Clark, G., Lucier, G. W., Garte, S. J., Cosma, G. & Caporaso, N. E. (1994). *Pharmacogenetics* **4**, 242-246.
- Landi, S. (2000). *Mutat Res* **463**, 247-283.
- Lavigne, J. A., Helzlsouer, K. J., Huang, H. Y., Strickland, P. T., Bell, D. A., Selmin, O., Watson, M. A., Hoffman, S., Comstock, G. W. & Yager, J. D. (1997). *Cancer Res* **57**, 5493-5497.
- Lee, I. M. (1999). *Proc Assoc Am Physicians* **111**, 10-15.
- Li, D. N., Seidel, A., Pritchard, M. P., Wolf, C. R. & Friedberg, T. (2000). *Pharmacogenetics* **10**, 343-353.
- Li, J. J. & Li, S. A. (1987). *Fed Proc* **46**, 1858-1863.
- Liehr, J. G. (2000). *Endocr Rev* **21**, 40-54.
- Liehr, J. G., Fang, W. F., Sirbasku, D. A. & Ari-Ulubelen, A. (1986). *J Steroid Biochem* **24**, 353-356.
- Linhares, J. J., Da Silva, I. D., De Souza, N. C., Noronha, E. C., Ferraro, O., De Carvalho, C. V., Baracat, E. C. & Baracat, F. F. (2005). *Biol Res* **38**, 273-281.
- Lipworth, L., Bailey, L. R. & Trichopoulos, D. (2000). *J Natl Cancer Inst* **92**, 302-312.
- Long, J. R., Cai, Q., Shu, X. O., Cai, H., Gao, Y. T. & Zheng, W. (2007). *Pharmacogenet Genomics* **17**, 331-338.
- López-Carrillo, L., Bravo-Alvarado, J., Poblano-Verastegui, O. & Ortega Altamirano, D. (1997). *Ann N Y Acad Sci* **837**, 537-550.
- MacMahon, B., Lin, T. M., Lowe, C. R., Mirra, A. P., Ravnihar, B., Salber, E. J., Trichopoulos, D., Valaoras, V. G. & Yuasa, S. (1970). *Bull World Health Organ* **42**, 185-194.
- MacMahon, B., Purde, M., Cramer, D. & Hint, E. (1982). *J Natl Cancer Inst* **69**, 1035-1038.
- MacMahon, B., Trichopoulos, D., Brown, J., Andersen, A. P., Cole, P., deWaard, F., Kauraniemi, T., Polychronopoulou, A., Ravnihar, B., Stormby, N. & Westlund, K. (1982). *Int J Cancer* **30**, 427-431.
- Mannisto, S., Pietinen, P., Pyy, M., Palmgren, J., Eskelinen, M. & Uusitupa, M. (1996). *Int J Cancer* **68**, 8-13.
- Matthews, J. & Gustafsson, J. A. (2003). *Mol Interv* **3**, 281-292.
- McKeown, N. (1999). *Nutr Rev* **57**, 321-324.
- McPherson, K., Steel, C. M. & Dixon, J. M. (1994). *BMJ* **309**, 1003-1006.
- Meng, L., Maskarinec, G. & Wilkens, L. (1997). *Int J Epidemiol* **26**, 1151-1158.
- Mirra, A. P., Cole, P. & MacMahon, B. (1971). *Cancer Res* **31**, 77-83.
- Mitrunen, K. & Hirvonen, A. (2003). *Mutat Res* **544**, 9-41.

REFERENCIAS

- Mitrunen, K., Jourenkova, N., Kataja, V., Eskelinen, M., Kosma, V. M., Benhamou, S., Kang, D., Vainio, H., Uusitupa, M. & Hirvonen, A. (2001). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 635-640.
- Mitrunen, K., Jourenkova, N., Kataja, V., Eskelinen, M., Kosma, V. M., Benhamou, S., Vainio, H., Uusitupa, M. & Hirvonen, A. (2001). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 229-236.
- Miyoshi, Y. & Noguchi, S. (2003). *Biomed Pharmacother* **57**, 471-481.
- Miyoshi, Y., Takahashi, Y., Egawa, C. & Noguchi, S. (2002). *Breast J* **8**, 209-215.
- Mohar, A., Bargallo, E., Ramírez, M. T., Lara, F. & Beltrán-Ortega, A. (2009). *Salud Pública Mex* **51 Suppl 2**, s263-269.
- Mohr, L. C., Rodgers, J. K. & Silvestri, G. A. (2003). *Anticancer Res* **23**, 2111-2124.
- Moreno-Galván, M., Herrera-González, N. E., Robles-Pérez, V., Velasco-Rodríguez, J. C., Tapia-Conyer, R. & Sarti, E. *Int J Biol Markers* **25**, 157-163.
- Nackley, A. G., Shabalina, S. A., Tchivileva, I. E., Satterfield, K., Korchynskyi, O., Makarov, S. S., Maixner, W. & Diatchenko, L. (2006). *Science* **314**, 1930-1933.
- Nandi, S., Guzman, R. C. & Yang, J. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3650-3657.
- Nelson, N. J. (2006). *J Natl Cancer Inst* **98**, 436-438.
- Okobia, M. N., Bunker, C. H., Garte, S. J., Zmuda, J. M., Ezeome, E. R., Anyanwu, S. N., Uche, E. E., Osime, U., Ojukwu, J., Kuller, L. H., Ferrell, R. E. & Taioli, E. (2009). *Infect Agent Cancer* **4 Suppl 1**, S12.
- Oldenburg, R. A., Meijers-Heijboer, H., Cornelisse, C. J. & Devilee, P. (2007). *Crit Rev Oncol Hematol* **63**, 125-149.
- Opdahl, S., Nilsen, T. I., Romundstad, P. R., Vanky, E., Carlsen, S. M. & Vatten, L. J. (2008). *Br J Cancer* **99**, 201-206.
- Ortega-Ceballos, P. A., Morán, C., Blanco-Muñoz, J., Yunes-Díaz, E., Castañeda-Iniguez, M. S. & Salmerón, J. (2006). *Salud Pública Mex* **48**, 300-307.
- Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42* (1987). **7**, 1-440.
- Paracchini, V., Raimondi, S., Gram, I. T., Kang, D., Kocabas, N. A., Kristensen, V. N., Li, D., Parl, F. F., Rylander-Rudqvist, T., Soucek, P., Zheng, W., Wedren, S. & Taioli, E. (2007). *Am J Epidemiol* **165**, 115-125.
- Pathak, D. R., Osuch, J. R. & He, J. (2000). *Cancer* **88**, 1230-1238.
- Pecorino L. Oxford University. 2008.
- Pérez-Morales, R., Méndez-Ramírez, I., Castro-Hernández, C., Martínez-Ramírez, O. C., Gonsebatt, M. E. & Rubio, J. *Genet Mol Biol* **34**, 546-552.
- Phiel, K. L., Henderson, R. A., Adelman, S. J. & Elloso, M. M. (2005). *Immunol Lett* **97**, 107-113.
- Raucy, J. L., Schultz, E. D., Wester, M. R., Arora, S., Johnston, D. E., Omdahl, J. L. & Carpenter, S. P. (1997). *Drug Metab Dispos* **25**, 1429-1435.
- Rebbeck, T. R., Rosvold, E. A., Duggan, D. J., Zhang, J. & Buetow, K. H. (1994). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**, 511-514.
- Reichman, M. E., Judd, J. T., Longcope, C., Schatzkin, A., Clevidence, B. A., Nair, P. P., Campbell, W. S. & Taylor, P. R. (1993). *J Natl Cancer Inst* **85**, 722-727.

REFERENCIAS

- Ricci, M. S., Toscano, D. G., Mattingly, C. J. & Toscano, W. A., Jr. (1999). *J Biol Chem* **274**, 3430-3438.
- Rodríguez-Cuevas, S., Macías, C. G., Franceschi, D. & Labastida, S. (2001). *Cancer* **91**, 863-868.
- Rodríguez-Cuevas, S., Macías Martínez, C. G. & Labastida Almendaro, S. (2000). *Ginecol Obstet Mex* **68**, 185-190.
- Romieu, I. & Lajous, M. (2009). *Salud Pública Mex* **51 Suppl 2**, s172-180.
- Russo, J. & Russo, I. H. (2006). *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**, 89-96.
- Sangrajang, S., Sato, Y., Sakamoto, H., Ohnami, S., Laird, N. M., Khuhaprema, T., Brennan, P., Boffetta, P. & Yoshida, T. (2009). *Int J Cancer* **125**, 837-843.
- Sazci, A., Ergul, E., Utkan, N. Z., Canturk, N. Z. & Kaya, G. (2004). *Toxicology* **204**, 197-202.
- Scariano, J. K., Emery-Cohen, A. J., Pickett, G. G., Morgan, M., Simons, P. C. & Alba, F. (2008). *J Recept Signal Transduct Res* **28**, 285-293.
- Sergentanis, T. N. & Economopoulos, K. P. *Breast Cancer Res Treat* **122**, 459-469.
- Shin, A., Kang, D., Choi, J. Y., Lee, K. M., Park, S. K., Noh, D. Y., Ahn, S. H. & Yoo, K. Y. (2007). *Exp Mol Med* **39**, 361-366.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D. & y cols. (1994). *Endocr Rev* **15**, 342-355.
- Singh, N., Mitra, A. K., Garg, V. K., Agarwal, A., Sharma, M., Chaturvedi, R. & Rath, S. K. (2007). *Oncol Res* **16**, 587-597.
- Skaik, Y. A. (2010). *Int J Ayurveda Res* **1**, 132.
- Smith, S. J., Deacon, J. M. & Chilvers, C. E. (1994). *Br J Cancer* **70**, 112-119.
- Suenaga, R., Evans, M. J., Mitamura, K., Rider, V. & Abdou, N. I. (1998). *J Rheumatol* **25**, 1305-1312.
- Sugano, H. & Ikawa, Y. (1971). *Kyobu Geka* **24**, 554-562.
- Suh Y, Vijg J. *Mut Res*. 2005; 573: 41-53
- Surekha, D., Sailaja, K., Rao, D. N., Padma, T., Raghunadharao, D. & Vishnupriya, S. (2009). *Indian J Med Sci* **63**, 13-20.
- Swann, P. F., Coe, A. M. & Mace, R. (1984). *Carcinogenesis* **5**, 1337-1343.
- Taioli, E. & Bonassi, S. (2002). *Mutat Res* **512**, 85-92.
- Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Berry, S., Bogden, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J. F., Mitchell, J. T., McArthur-Morrison, J., Nguyen, K., Peng, Y., Samson, C., Schroeder, M., Snyder, S. C., Steele, L., Stringfellow, M., Stroup, C., Swedlund, B., Swense, J., Teng, D., Thomas, A., Tran, T., Tranchant, M., Weaver-Feldhaus, J., Wong, A. K., Shizuya, H., Eyfjord, J. E., Cannon-Albright, L., Labrie, F., Skolnick, M. H., Weber, B., Kamb, A. & Goldgar, D. E. (1996). *Nat Genet* **12**, 333-337.
- Tenhunen, J., Heikkilä, P., Alanko, A., Heinonen, E., Akkila, J. & Ulmanen, I. (1999). *Cancer Lett* **144**, 75-84.

REFERENCIAS

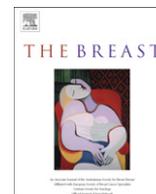
- Thompson, P. A., Shields, P. G., Freudenheim, J. L., Stone, A., Vena, J. E., Marshall, J. R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T., Kadlubar, F. F. & Ambrosone, C. B. (1998). *Cancer Res* **58**, 2107-2110.
- Todorovic, R., Devanesan, P., Higginbotham, S., Zhao, J., Gross, M. L., Rogan, E. G. & Cavalieri, E. L. (2001). *Carcinogenesis* **22**, 905-911.
- Torresan, C., Oliveira, M. M., Torrezan, G. T., de Oliveira, S. F., Abuazar, C. S., Losi-Guembarovski, R., Lima, R. S., Urban, C. A., Cavalli, I. J. & Ribeiro, E. M. (2008). *Clin Exp Med* **8**, 65-71.
- Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. (2003). *Biomed Pharmacother* **57**, 145-155.
- Truss, M. & Beato, M. (1993). *Endocr Rev* **14**, 459-479.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Kyo, S., Kanaya, T., Inoue, M. & Yokoi, T. (2004). *Cancer Res* **64**, 3119-3125.
- Vara-Salazar E, Suárez-López L, Ángeles-Llerenas A, Torres-Mejía G, Lazcano-Ponce. INSP. 2011; 53 (5). 385-393.
- Vatten, L. J. & Kvinnsland, S. (1992). *Eur J Cancer* **28A**, 1148-1153.
- Wacholder, S., Hartge, P., Prentice, R., Garcia-Closas, M., Feigelson, H. S., Diver, W. R., Thun, M. J., Cox, D. G., Hankinson, S. E., Kraft, P., Rosner, B., Berg, C. D., Brinton, L. A., Lissowska, J., Sherman, M. E., Chlebowski, R., Kooperberg, C., Jackson, R. D., Buckman, D. W., Hui, P., Pfeiffer, R., Jacobs, K. B., Thomas, G. D., Hoover, R. N., Gail, M. H., Chanock, S. J. & Hunter, D. J. (2010). *N Engl J Med* **362**, 986-993.
- Wartenberg, D., Calle, E. E., Thun, M. J., Heath, C. W., Jr., Lally, C. & Woodruff, T. (2000). *J Natl Cancer Inst* **92**, 1666-1673.
- Watson, M. A., Stewart, R. K., Smith, G. B., Massey, T. E. & Bell, D. A. (1998). *Carcinogenesis* **19**, 275-280.
- Weber, B. L. & Nathanson, K. L. (2000). *Eur J Cancer* **36**, 1193-1199.
- Wen, W., Cai, Q., Shu, X. O., Cheng, J. R., Parl, F., Pierce, L., Gao, Y. T. & Zheng, W. (2005). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 329-335.
- Wickramasinghe, S. N., Gardner, B. & Barden, G. (1986). *Lancet* **2**, 823-826.
- Wu, A. H., Tseng, C. C., Van Den Berg, D. & Yu, M. C. (2003). *Cancer Res* **63**, 7526-7529.
- Xie, T., Ho, S. L. & Ramsden, D. (1999). *Mol Pharmacol* **56**, 31-38.
- Yager, J. D. & Davidson, N. E. (2006). *N Engl J Med* **354**, 270-282.
- Yager, J. D. & Liehr, J. G. (1996). *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 203-232.
- Yagi, E., Barrett, J. C. & Tsutsui, T. (2001). *Carcinogenesis* **22**, 1505-1510.
- Yue, W., Santen, R. J., Wang, J. P., Li, Y., Verderame, M. F., Bocchinfuso, W. P., Korach, K. S., Devanesan, P., Todorovic, R., Rogan, E. G. & Cavalieri, E. L. (2003). *J Steroid Biochem Mol Biol* **86**, 477-486.
- Zhang, Z. Y., Fasco, M. J., Huang, L., Guengerich, F. P. & Kaminsky, L. S. (1996). *Cancer Res* **56**, 3926-3933.
- Zheng, W., Gustafson, D. R., Sinha, R., Cerhan, J. R., Moore, D., Hong, C. P., Anderson, K. E., Kushi, L. H., Sellers, T. A. & Folsom, A. R. (1998). *J Natl Cancer Inst* **90**, 1724-1729.

REFERENCIAS

- Zheng, W., Xie, D. W., Jin, F., Cheng, J. R., Dai, Q., Wen, W. Q., Shu, X. O. & Gao, Y. T. (2000). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 147-150.
- Zhu, B. T. & Conney, A. H. (1998). *Carcinogenesis* **19**, 1-27.
- Zimniak, P., Nanduri, B., Pikula, S., Bandorowicz-Pikula, J., Singhal, S. S., Srivastava, S. K., Awasthi, S. & Awasthi, Y. C. (1994). *Eur J Biochem* **224**, 893-899.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

The Breast

journal homepage: www.elsevier.com/brst

Original article

Polymorphisms of catechol estrogens metabolism pathway genes and breast cancer risk in Mexican women

O.C. Martínez-Ramírez^a, R. Pérez-Morales^b, C. Castro^a, A. Flores-Díaz^a, K.E. Soto-Cruz^a, A. Astorga-Ramos^c, M.E. Gonsebatt^a, L. Casas^d, M. Valdés-Flores^d, J. Rubio^{a,*}^aDepartamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, C.P. 04510, México D.F., Mexico^bDepartamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, C.P. 35010, Durango, Mexico^cInstituto Nacional de Cancerología, C.P. 14080, México D.F., Mexico^dDepartamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, C.P. 14389, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2012

Received in revised form

7 August 2012

Accepted 20 August 2012

Keywords:

Breast cancer

Genetic polymorphism

Estrogens

Catechol estrogens

Mexican women

ABSTRACT

Breast cancer is associated to estrogen exposure. Allelic variants involved in estrogen metabolism might change the risk of developing this neoplasia. We examined the potential association of breast cancer risk in Mexican women with the polymorphisms CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680, GSTP1 rs1695, GSTT1 null and GSTM1 null which are involved in estrogen metabolism pathway. This study included 150 cases and 150 controls. A significant association was observed between, CYP1A1 rs1048943 (OR = 1.95, C.I. 1.13–3.36) and GSTP1 rs1695 (OR = 2.39, C.I. 1.24–4.24) polymorphisms with the risk of breast cancer. This risk was increased when the women were stratified according to their menopausal status. The results show that breast cancer risk significantly increases in women with 3–6 risk polymorphisms (OR = 3.75, C.I. 1.44–9.74).

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer worldwide among women and is also the leading cause of death associated with neoplasias in women.^{1,2} Hereditary BC is linked to mutations in high penetrance genes such as BRCA1, BRCA2 and p53, and occurs in about 5% or 10% of total cases of BC. Other 90–95% of other cases are sporadic BC and are more related with low penetrance genes and interactions between carcinogenic agents such as estrogens.^{3–6}

The association between exposure to estrogens and BC risk is well established and attributed to the ability of estrogens to induce

the proliferation of breast tissue cells, formation of reactive oxygen species (ROS) and the release of carcinogenic metabolites.^{7–10}

Most of the known risk factors for BC are linked to an increased lifetime exposure to estrogens.¹¹ Exposure to endogenous estrogens principally arises from woman's ovulatory cycles. If menarche begins under the age of 12 and/or if menopause starts over the age of 55, these women may be considered at high risk to develop BC.^{10,12,13} An increased risk for BC has also been associated with nulliparity, tardy first childbirth, the use of hormonal contraceptives and hormone replacement therapy.^{14–16}

Estrogens are mainly metabolized by the catechol estrogens metabolism pathway (CEMP), which produces ROS and adducts that may cause mutations and DNA damage that may initiate the development of the neoplasia.^{17–19}

In the CEMP, estrogens are hydroxylated by either cytochrome CYP1A1 producing 2-hydroxycatechol estrogen (2-OH CE) or by CYP1B1 producing 4-hydroxycatechol estrogen (4-OH CE). These two catechol estrogens (CEs) can be inactivated by O-methylation catalyzed by COMT; however, if this reaction does not occur, the CEs are oxidized to catechol estrogen quinones (CE-Qs). These CE-Qs can then be conjugated with glutathione by the action of glutathione-S-transferases (GSTs), GSTT1, GSTM1 and GSTP1, to

Abbreviations: BC, breast cancer; CEMP, catechol estrogens metabolism pathway; CYP1A1, cytochrome P450 1A1; CYP1B1, cytochrome P450 1B1; GSTP1, glutathione-S-transferase P1; GSTM1, glutathione-S-transferase M1; GSTT1, glutathione-S-transferase T1; COMT, catechol-O-methyl-transferase; OR, odds ratio; ROS, reactive oxygen species; 2-OH CE, 2-hydroxycatechol estrogen; 4-OH CE, 4-hydroxycatechol estrogen; CEs, catechol estrogens; CE-Qs, catechol estrogen quinones; MLR, multivariable logistic regression; MDR, multifactor-dimensionality reduction; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 91 78; fax: +52 55 56 22 91 82.

E-mail address: juruli@unam.mx (J. Rubio).

prevent DNA damage, or they may react with DNA to form adducts that ultimately generate apurinic sites, which may lead to mutations and may potentially initiate BC.^{17,18,20–22}

The genes involved in the CEMP have allelic variants with modified enzymatic activities (Table 1). These alleles have been widely studied in different populations providing evidence of their contribution to BC risk,^{23–26} often with inconsistent or contradictory results, even within the same ethnic group.^{23,27–29}

In this study, we analyzed the association of polymorphisms in six genes (individually and in cluster) of the CEMP with the risk of developing BC in a cohort of Mexican women.

Materials and methods

Subjects

Mexican Mestizo cohort

In order to determine the allelic frequency of polymorphisms in a Mexican population, as previously reported for four of the studied polymorphisms,⁴⁰ we selected 382 (420 for CYP1B1) unrelated, healthy Mexican Mestizo men and women who attended to the Hospital “20 de Noviembre” in Mexico City from October 2001 to November 2004 as blood donors. Subjects filled out a questionnaire, which included data about sex, age, birthplace, parents’ and grandparents’ birthplace, and lifestyle. All participants, their parents and grandparents were born in Mexico. With these figures we calculated the sample size needed for the cases–controls study.

Retrospective study of cases and controls

We included 150 cases: unrelated women who attended from 2006 to 2007 to the Instituto Nacional de Cancerología (Mexico City). These patients were diagnosed with primary breast carcinoma (stages IIA–IV) and their histopathological analysis demonstrated the presence of invasive or in situ ductal carcinoma in 105 cases, and invasive or in situ lobular carcinoma in 45 cases. All of the patients were over 30 years old (mean age 48.09 ± 9.6 years old) and had no history of hereditary BC syndrome, according to the specifications of the National Cancer Institute of United States^{3,41,42} and the National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology, which reduces the possibility of including women with mutations in high penetrance genes such as BRCA1 and BRCA2. The population controls were healthy age-paired women without diagnostic of BC (mean age 48.27 ± 10.75 years old). Control samples were also collected between 2006 and 2007.

Cases and controls were born in Mexico, their parents and grandparents were born in Mexico. Informed consent was obtained from all participants, who also answered a questionnaire about risk factors for BC.

Table 1
Genetic polymorphisms involved in catechol estrogens metabolism pathway.

Gene (rs)	Role in estrogen metabolism	Genotype	Functional effect	References
CYP1B1 (rs1056836)	4-hydroxylase generates 4-OH CEs	C → G Leu → Val	Increased activity	[30,31]
CYP1A1 (rs1048943)	2-hydroxylase generates 2-OH CEs	A → G Ile → Val	Increased activity/inducibility	[32,33]
COMT (rs4680)	Methyltransferase inactivation of CEMP	G → A Val → MetI	Four-times reduced methylation activity	[34–36]
GSTT1 (deletion)	Conjugation of estrogen quinones to glutathione	Null	Lack of enzyme	[37,38]
GSTM1 (deletion)		Null	Lack of enzyme	
GSTP1 (rs1695)		A → G Ile → Val	Reduced activity	

The research protocol was approved by the Bioethics Committees of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México and the Instituto Nacional de Cancerología (Mexico City). The Hospital “20 de Noviembre” gave permission to use the buffy coat of blood bank samples.

DNA samples

DNA preparations used for the genotyping analyses were extracted from blood samples collected and stored at -20°C until used. Mononuclear white cells and the genomic DNA were isolated as described in Ref..⁴³

Genotyping

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses were used to assess the CYP1A1 rs1048943, CYP1B1 rs1056836, COMT rs4680 and GSTP1 rs1695 polymorphisms. A multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay was used to simultaneously determine the presence of the GSTM1 and GSTT1 null alleles. The restriction endonucleases were acquired at Fermentas and New England Biolabs. GSTM1 null, GSTT1 null, CYP1A1 rs1048943 and GSTP1 rs1695 polymorphisms were previously reported in Ref..⁴⁰

The PCR products and restriction fragments were separated by electrophoresis in 2% agarose gels (4% agarose for COMT), and visualized after staining with ethidium bromide on a UV transilluminator (Bio-Rad Hercules, CA, USA). Primers were obtained from Invitrogen.

The primers and PCR conditions used, as well RFLP features are summarized in Table 2.

Case–control study design

Due to frequencies of polymorphisms for CYP1B1 rs1056836 and COMT rs4680 have not been previously determined in Mexican population, we estimated these allelic frequencies in a sample of unrelated healthy Mexican individuals (Table 3). Based on the obtained frequencies, the minimal necessary sample size for the case–control study was estimated for each polymorphism according to the formula

$$n = \left[\frac{z\left(\frac{\alpha}{2}\right) \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}}{p_1 - p_2} \right]^2,$$

where $z_{\alpha/2} = 1.96$ for a confidence level of 95%, $z_{1-\beta} = 0.80$ for a statistical power of 78.8%, p_2 is the exposure frequency of controls, p_1 is an estimate of the exposure frequency of cases derived from previously reported OR's^{47–52} and $p = (p_1 + p_2)/2$.

Table 2
Primers and conditions of PCR-RFLP and multiplex PCR.

Gene (rs)	Primer sequence 5'–3'	Fragment length (bp)	PCR conditions	Cycles	Restriction endonuclease	Reference
CYP1A1 (rs1048943)	Forward CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC Reverse TTCCACCCGTTCAGCAGGATAGCC	204	30 s 94 °C 30 s 63 °C 30 s 72 °C	35	BsrDI	[40]
CYP1B1 (rs1056836)	Forward TCACTTGCTTTTCTCTCTCC Reverse AATTTCAGCTTGCCCTCTTG	650	30 s 94 °C 25 s 60 °C 40 s 72 °C	35	Eco57I	[44]
COMT (rs4680)	Forward GGGCTACTGTGGCTACTCA Reverse GGCCCTTTTCCAGTCTGACA	165	30 s 94 °C 30 s 60 °C 40 s 72 °C	40	NlaIII	[45]
GSTP1 (rs1695)	Forward ACCCCAGGGCTCTATGGGAA Reverse TGAGGGCACAAGAAGCCCTT	176	20 s 94 °C 20 s 60 °C 20 s 72 °C	30	BsmA1	[40]
GSTM null	Forward GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC Reverse GTTGGGCTCAAATATACGGTGG	215	60 s 94 °C 45 s 59 °C	35	NA ^a	[40,46]
GSTT1 null	Forward TTCCCTACTGGTCTCACATCTC Reverse TCACCGGATCATGGCCAGCA	480	45 s 72 °C		NA ^a	[40]

^a NA – Not applicable.

Statistical analyses

Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) was tested separately in cases and controls for each polymorphism, when applicable, with statistical package GenePop version 4.0.10 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

Epidemiological risk factors and risk of developing BC were examined using Person's χ^2 tests, Fisher's exact tests, and the Freeman–Halton extension of the Fisher's exact test. The former two tests were carried out using GraphPad Prism 5 software. Freeman–Halton extension was computed using the test calculator (http://in-silico.net/statistics/fisher_exact_test/2x3).

To explore a possible association between BC risk and individual polymorphisms, an unconditional logistic regression analysis to calculate the crude odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs), χ^2 tests and Fisher's exact tests were performed in GraphPad Prism 5 for CYP1A1, CYP1B1, COMT, GSTT1, GSTM1 and GSTP1. The heterozygous and homozygous variant genotypes of these genes were compared to the homozygous wild-type genotype, when applicable.^{53–56} Groups having the lowest risk were used as reference value. Assuming a biological activity gradient (codominant model), a linear regression Cochran–Armitage trend test was performed in XLSTAT 2012 for individual polymorphisms in CYP1A1, CYP1B1, COMT, and GSTP1.^{57,58} The associations in unstratified and stratified women according to menopausal status were studied.

Multivariate logistic regression (MLR) models were performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS-PC; SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) to assess the effect of covariates in the BC risk.

Under the hypothesis of additivity of BC risk alleles in women, we determined the gene–gene interactive effects of the six studied polymorphisms using Multifactor-Dimensionality Reduction (MDR; Version 1.1.0), which reduces dimensionality by pooling multilocus genotypes into two groups.⁵⁹ This program calculates the OR's of different models of interaction among genes and is proposed as a quantitative measure of disease risk.⁶⁰

Statistical differences were considered significant at $p \leq 0.05$. All p -values reported are two tailed.

Results

The women included in this study were from 30 to 74 years. The evaluation of additional risk factors for BC is shown in Table 4. There was no significant difference in the age distribution between patients and controls. In fact, we only found that the age at menopause was statistically different between them ($p = 0.003$).

The genotypes tested were under HWE. It was not possible to analyze GSTT1 and GSTM1 HWE.

Table 5 shows the allelic distribution and the association of their polymorphisms with BC risk. A statistically significant association was found between the CYP1A1^{Val/Val} ($p = 0.01$) and GSTP1^{Val/Val}

Table 3
Frequency of breast cancer risk polymorphisms among Mexican Mestizo cohort and sample required for a case–control study.

Gene (rs)	Genotype frequency, n (%)					Allelic frequency		Reference	Sample required for a case–control study ^d	
	Mutant allele	n	Wild-type homozygous	Heterozygous	Mutant homozygous	p^b	q^c		Case	Control
CYP1A1 (1048943)	Val	382	86 (22.5)	176 (46.1)	120 (31.4)	0.45	0.55	[40]	143	143
CYP1B1 (1056836)	Val	420	60 (14.28)	230 (54.7)	130 (30.95)	0.41	0.59	This study	150	150
COMT (4680)	Met	382	161 (42.1)	156 (40.8)	65 (17.1)	0.62	0.38	This study	133	133
GSTP1 (947894)	Val	382	102 (27.7)	192 (50.3)	88 (23)	0.52	0.48	[40]	135	135
GSTM1 (deletion)	Null	382	239 (62.6)	N.D. ^a	143 (37.4)	N.D. ^a	N.D. ^a	[40]	133	133
GSTT1 (deletion)	Null	382	324 (84.8)	N.D. ^a	58 (15.2)	N.D. ^a	N.D. ^a	[40]	206	206

Table modified with permission from Pérez-Morales et al., 2011.

^a Not determined.

^b p wild-type allele.

^c q mutant allele.

^d According to the calculation described in Materials and methods with a power of 78.8% and a confidence interval 95%.

Table 4
Evaluation of risk factors for breast cancer.

Risk factor	Cases n (%)	Controls n (%)	p-value
Age (years)			
<40	36 (24.0)	38 (25.3)	0.51 ^a
40–50	50 (33.3)	45 (30.0)	
50–60	49 (32.6)	44 (29.3)	
>60	15 (10.0)	23 (15.3)	
Body mass index (BMI)			
Healthy weight (from 18.5 to 25)	62 (41.4)	69 (46)	0.72 ^b
Overweight and obese (>25)	88 (58.6)	81 (54)	
Age at menarche (years)			
<12	29 (19.3)	34 (22.6)	0.23 ^a
12–14	95 (63.3)	100 (66.6)	
>14	26 (17.3)	16 (10.6)	
Menopausal status			
Pre	82 (58.0)	81 (54.0)	0.9 ^b
Post	68 (42.0)	69 (46)	
Age at menopause (years)			
<45	4 (4.70)	16 (23.1)	0.003 ^{c*}
45–55	60 (90.4)	52 (75.3)	
>55	4 (4.70)	1 (1.44)	
Parity			
>5	13 (8.60)	19 (12.6)	0.48 ^a
1–5	110 (73.3)	108 (72.0)	
0	27 (18.0)	23 (15.3)	
Use of contraceptives (years)			
Never	104 (69.3)	92 (61.3)	0.28 ^a
<5	34 (22.6)	46 (30.6)	
>5	12 (8.0)	12 (8.0)	
Use of hormone replacement therapy			
No	133 (88.6)	136 (90.7)	0.70 ^b
Yes	17 (11.3)	14 (9.3)	

* Significant values.

^a Chi-square.^b Fisher's exact test.^c Freeman–Halton–Fisher's exact test.

($p = 0.009$) genotypes and BC risk, these Fisher's exact test results were consistent with the ones of the Cochran–Armitage's test. Also, CYP1B1 and COMT polymorphisms showed a marginal significance ($p = 0.057$ and $p = 0.085$, respectively).

The association with BC risk was also observed in premenopausal and postmenopausal women (Table 6). The statistical

analysis with Fisher's exact test showed that the association of both genotypes with BC risk was higher in the premenopausal group (CYP1A1^{Val/Val} $p = 0.009$, GSTP1^{Val/Val} $p = 0.005$) than in the postmenopausal women (CYP1A1^{Val/Val} $p = 0.06$, GSTP1^{Val/Val} $p = 0.09$).

The significance observed in premenopausal women is consistent with Cochran–Armitage's test results, but the significance observed in postmenopausal women is not present within the trend test.

Using MLR we adjusted the model to the only risk factor that was significantly different in our study (age at menopause). We could not make the adjustment to age at menopause and THR for premenopausal women because is not possible to have these variables in this group. However, when we adjusted for age at menopause in postmenopausal women, the significance of CYP1A1^{Val/Val} was lost, but in contrast, a significant association between CYP1B1^{Leu/Val}, CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met} and BC risk emerged and the significance of GSTP1^{Val/Val} was preserved (Table 6).

We examined whether there was an additive effect of the risk alleles (homozygous mutants) of the CEMP genes associated with BC risk. This analysis (Table 7) showed a tendency of BC risk increment with increased numbers of risk polymorphisms, and a significant escalation of cancer risk in women with more than 3 risk alleles ($p = 0.008$).

Contrary to postmenopausal women, the additive effect in premenopausal women showed a clear association to BC risk (Table 8).

To determine the relative risk of combinations of risk polymorphisms, and their additive effect we carried out an MDR analysis. Table 9 shows a significant increased risk of developing BC (OR-MDR) associated with an increasing number of interactions of risk genes.

Discussion

Prior to the case–control study we determined the genotypic frequencies of CYP1B1 and COMT in Mexican population (Table 3) and obtained the sample size for a case–control study required (Table 3) by using the formula and the model for sample size estimation described in Materials and methods; it was considered

Table 5
Association of genetic polymorphisms with breast cancer risk.

Genotype	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p-value	Cochran–Armitage's trend test p-value
CYP1A1					
Ile/Ile	39 (27.3)	57 (37.3)	1.0 ^a		0.01*
Ile/Val	37 (26.0)	43 (30.0)	1.18 (0.65–2.1)	0.65	
Val/Val	74 (46.6)	50 (32.6)	1.95 (1.13–3.36)	0.01*	
CYP1B1					
Leu/Leu	27 (18)	33 (20.6)	1.0 ^a		0.057
Leu/Val	46 (30.6)	62 (42)	0.83 (0.44–1.59)	0.62	
Val/Val	77 (51.3)	55 (37.3)	1.57 (0.84–2.93)	0.15	
COMT					
Val/Val	52 (34.6)	68 (44.6)	1.0 ^a		0.085
Val/Met	66 (44.0)	59 (38.6)	1.46 (0.88–2.43)	0.15	
Met/Met	32 (21.3)	23 (16.6)	1.64 (0.87–3.11)	0.14	
GSTT1					
Wild type	103 (68.6)	108 (72)	1.0 ^a		
Null	47 (31.3)	42 (28)	1.17 (0.71–1.92)	0.61	
GSTM1					
Wild type	85 (56.6)	89 (58.6)	1.0 ^a		
Null	65 (43.3)	61 (41.3)	1.08 (0.68–1.71)	0.81	
GSTP1					
Ile/Ile	40 (27.3)	43 (32)	1.0 ^a		0.008*
Ile/Val	39 (34.6)	66 (48.6)	0.83 (0.48–1.44)	0.57	
Val/Val	71 (38.0)	41 (19.3)	2.39 (1.24–4.24)	0.009*	

* Significant values.

^a Reference value; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table 6
Association of genetic polymorphisms with breast cancer risk according to menopausal status.

Genotype	Premenopausal women					Postmenopausal women					Adjusted by age at menopause	
	Unadjusted					Unadjusted					OR (95% CI)	p-value
	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p-value	Cochran–Armitage's trend test p-value	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p-value	Cochran–Armitage's trend test p-value		
CYP1A1												
Ile/Ile	20 (24.3)	31 (38.2)	1.0 ^a			19 (27.9)	26 (37.6)	1.0 ^a				
Ile/Val	19 (23.1)	26 (32.0)	1.13 (0.50–2.56)	0.83		18 (26.4)	17 (24.6)	0.53(0.21–1.31)	0.25		1.02 (0.46–2.24)	0.96
Val/Val	43 (52.4)	24 (29.6)	2.77 (1.30–5.89)	0.009*	0.006*	31 (45.5)	26 (37.6)	2.33 (1.01–5.35)	0.06	0.229	1.46 (0.72–2.94)	0.28
CYP1B1												
Leu/Leu	16 (19.5)	20 (24.6)	1.0 ^a			11 (16.1)	13 (18.8)	1.0 ^a				
Leu/Val	25 (30.4)	28 (34.5)	1.11 (0.47–2.61)	0.83		21 (30.8)	34 (49.2)	0.72 (0.27–1.92)	0.62		0.49 (0.24–1.00)	0.05*
Val/Val	41 (50.0)	33 (40.7)	1.55 (0.69–3.46)	0.31	0.242	36 (52.9)	22 (31.8)	1.85 (0.70–4.82)	0.23	0.058*	2.22 (1.09–4.49)	0.02*
COMT												
Val/Val	30 (36.5)	39 (48.1)	1.0 ^a			22 (32.3)	29 (42.0)	1.0 ^a				
Val/Met	38 (46.3)	29 (35.8)	1.70 (0.86–3.35)	0.16		28 (41.1)	30 (43.4)	1.19 (0.56–2.53)	0.70		0.77 (0.38–1.57)	0.48
Met/Met	14 (17.0)	13 (16.0)	1.40 (0.57–3.41)	0.50	0.266	18 (26.4)	10 (14.4)	2.37 (0.91–6.14)	0.10	0.102	2.37 (0.98–5.70)	0.05*
GSTT1												
Wild type	57 (69.5)	60 (74.0)	1.0 ^a			46 (67.6)	48 (69.5)	1.0 ^a				
Null	25 (30.4)	21 (25.9)	1.25 (0.63–2.48)	0.60		22 (32.3)	21 (30.4)	1.04 (0.5–2.1)	1.0		0.99 (0.49–2.01)	0.98
GSTM1												
Wild type	44 (53.6)	46 (56.7)	1.0 ^a			41 (60.2)	43 (62.3)	1.0 ^a				
Null	38 (46.3)	35 (43.2)	1.13 (0.61–2.10)	0.75		27 (39.7)	26 (37.6)	1.11 (0.56–2.21)	0.86		1.11 (0.53–2.32)	0.77
GSTP1												
Ile/Ile	21 (25.6)	28 (34.5)	1.0 ^a			19 (27.9)	15 (21.7)	1.0 ^a				
Ile/Val	24 (29.2)	38 (46.9)	0.84 (0.39–1.81)	0.70		15 (22.0)	28 (40.5)	1.16 (0.50–2.64)	0.83		0.36 (0.16–0.79)	0.01*
Val/Val	37 (45.1)	15 (18.5)	3.28 (1.44–7.50)	0.005*	0.004*	34 (50.0)	26 (37.6)	2.40 (0.94–6.11)	0.09	0.657	1.87 (0.92–3.77)	0.07

* Significant values.

^a Reference value; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table 7
Estimated odds ratio of breast cancer risk associated with the number of high-risk genotypes.

No. of high-risk genotypes	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p-value
Zero	8 (5.3)	15 (10.4)	1.0 ^a	
One	33 (22.0)	51 (33.9)	1.21 (0.46–3.10)	0.81
Two	43 (28.6)	51 (33.3)	1.58 (0.61–4.08)	0.48
Three-six	66 (40)	33 (55)	3.75 (1.44–9.74)	0.008*

* Significant values. p-value calculated by use of Fisher's exact test.
^a Reference value; OR, odds ratio not adjusted; CI, confidence interval.

to have a first approximation of the importance of these polymorphisms for BC risk in Mexican women.

Although we determined that for GSTT1 a greater sample size was necessary, a preliminary estimation of the effect of GSTT1 on BC risk was also included in our study due to the essential role that this enzyme has in the detoxification of carcinogenic metabolites of steroid hormones.

In our univariate analyses, if multiple testing corrections were performed, our associations would not be detected. Although, without these corrections, the probability of false positive is incremented, like this is a preliminary study, is important to label all possible interactions.

Our sample included a high percentage of premenopausal women (58%; Table 4). This is consistent with findings of previous studies in Mexican women, in which the most frequently affected age group for BC was the 40–49 years old group with a median age one decade younger than that of Caucasian women (60–64-year old).^{61,62} Mean age for menopause in Mexican women is 45–47-year old,^{63,64} hence, these facts explain the elevated percentage of premenopausal women with BC compared to other reported populations. This difference in the age to develop BC in Mexican women might explain the smaller impact of conventional risk factors associated with exposure to endogenous and exogenous estrogens, which are more strongly related to BC in women over 55 years old.^{24,65–70} Nevertheless, as this is an exploratory study, confirmation of these data are needed.

A difference between the age at menopause between cases and controls was found (Table 3). An explanation might be the decreased exposure time to endogenous estrogen.^{65,70,71}

Table 8
Estimated OR of breast cancer associated with the number of high-risk genotypes according to menopausal status.

No. of high-risk genotypes	Premenopausal women				Postmenopausal women			
	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p-value	Cases n (%)	Controls n (%)	OR (95% CI)	p-value
Zero	2 (2.43)	11 (13.2)	1.0 ^a		5 (7.3)	5 (7.1)	1.0 ^a	
One	18 (21.9)	26 (31.3)	3.8 (0.75–19.2)	0.11	15 (22.0)	26 (37.14)	0.57 (0.14–2.3)	0.48
Two	27 (32.9)	28 (33.7)	5.3 (1.07–6.19)	0.03*	24 (27.9)	23 (32.85)	1.04 (0.26–4.08)	1
Three-six	35 (42.6)	16 (19.75)	12.3 (2.38–60.7)	0.001*	24 (35.29)	15 (21.7)	1.60 (0.39–6.47)	0.71

* Significant values p-value calculated by use of Fisher's exact test.
^a Reference value; OR, odds ratio not adjusted; CI, confidence interval.

Table 9
Estimated multivariate-OR of genetic interaction of the homozygous mutants of genes with risk for breast cancer.

No. of risk genes	Models	Testing balanced accuracy	CVC	OR-MDR	95% CI	p-value of X ² test
2	CYP1B1–GSTP1	0.667	7/10	2.88	(1.78–4.65)	<0.0001*
3	COMT–CYP1A1–GSTP1	0.634	8/10	3.91	(2.42–6.31)	<0.0001*
4	COMT–CYP1A1–GSTP1–GSTT1	0.662	8/10	6.43	(3.87–10.6)	<0.0001*
5	COMT–CYP1A1–GSTP1–GSTT1–CYP1B1	0.572	9/10	13.0	(7.24–23.3)	<0.0001*
6	COMT–CYP1A1–GSTP1–GSTT1–CYP1B1–GSTM1	0.591	10/10	37.6	(17.11–82.9)	<0.0001*

Abbreviations: CVC, cross-validation consistency; OR-MDR, odds ratio-multifactor-dimensionality reduction; 95% CI, confidence interval 95%. Risk estimate was based on the combination and dichotomization of the distribution of genetic factors according to the MDR software.

* Significant values.

On the other hand, there is evidence that wild-type homozygous individuals have less risk than the heterozygous ones and the latter, have less risk than mutant homozygous individuals. The polymorphism CYP1B1 (rs1056836) has recently been found to have the most profound impact on its catalytic properties, with 4-hydroxylase activity of the Val432 allele displaying three-fold higher activity compared to Leu432 allele.⁷² In CYP1A1, the polymorphism rs1048943 has been suggested to lead to higher enzyme activity and mRNA expression and therefore higher rates of carcinogen activation⁷³; the COMT rs4680 polymorphism has been associated with three- to four-fold decreased activity of COMT activity compared with the wild-type and the polymorphism GSTP1 (rs1695) also results in a decreased enzymatic activity.⁷⁴ These works show that heterozygous variants of these four polymorphisms have an intermediate risk falling between the wild-type homozygous and mutant homozygous genotypes. Based on these evidences we applied a codominant model where the associations among BC risk, CYP1A1^{Val/Val} and GSTP1^{Val/Val} may be explained by the increased enzymatic activity of CYP1A1^{Val/Val} and the decreased enzymatic activity of GSTP1^{Val/Val}. In both cases, the polymorphic genotypes may still increase the overall levels of mutagenic metabolites.

In the trend test, associations of polymorphisms CYP1A1 rs1048943 and GSTP1 rs1695 with BC risk were found in premenopausal women, but not in postmenopausal women. Associations found only in premenopausal women highlight the potential role of these polymorphisms in the development of BC in younger women who have been less exposed to endogenous estrogens and extrinsic related risk factors emphasizing the role of genes in the development of BC in this group.

However, it is interesting that when we introduced the variable age at menopause variable to our model of postmenopausal women we found a significant association with CYP1B1^{Leu/Val}, CYP1B1^{Val/Val}, COMT^{Met/Met}, GSTP1^{Ile/Val}, GSTP1^{Val/Val} and the BC risk. This points to the importance of these polymorphisms in older women, that might be exposed to estrogen by more number of ovulatory cycles.

In a previous study in Mexican women, an increased BC risk associated with CYP1A1^{Val/Val} variant was only found in premenopausal women, and no association with COMT^{Met/Met} was found neither in premenopausal women nor in postmenopausal women.²⁷

Our results on the association of CYP1A1^{Val/Val} and the BC risk are in agreement with previous reports.^{23–26} The association of

Table 10

Reports showing association of breast cancer with polymorphisms of catechol estrogens metabolism pathway genes.

First author	Year	Gene	Genotype	Population	Results OR (95% CI)	Number of participants		References
						Cases	Controls	
Miyushi	2002	CYP1A1	Val/Val	Japanese	0.66 (0.45–0.96)	195	272	[23]
Shin	2007			Korean	0.98 (0.56–1.71)	513	447	[26]
Torresan	2008			Brazilian	1.46 (0.76–2.79)	102	102	[25]
Moreno-Galván	2010			Mexican	0.86 (0.38–1.95)	91	94	[27]
This study	2012			Mexican	1.94 (1.13–3.34)	150	150	
Kocabas	2002	CYP1B1	Val/Val	Turkish	1.27 (0.47–3.43)	84	103	[75]
Jiao	2010			Asian	0.85 (0.67–1.08)	152	156	[76]
Okobia	2009			Nigerian	1.09 (0.61–1.95)	250	250	[77]
This study	2012			Mexican	1.17 (0.68–2.01)	150	150	
Wu	2003	COMT	Met/Met	Asian	0.84 (0.54–1.30)	589	563	[78]
Sazci	2004			Turkish	1.0 (0.93–1.29)	130	233	[79]
Wen	2005			Chinese	0.92 (0.67–1.26)	1135	1235	[29]
Moreno-Galván	2010			Mexican	0.89 (0.39–2.25)	91	94	[27]
This study	2012			Mexican	1.74 (0.91–3.0)	150	150	
Mitrunen	2001	GSTP1	Val/Val	Finnish	0.57 (0.31–1.04)	483	482	[65]
Torresan	2008			Brazilian	1.81 (1.04–3.16)	102	102	[25]
Kaushal	2010			Indian	1.43 (0.96–2.11)	117	174	[56]
This study	2012			Mexican	2.39 (1.30–4.40)	150	150	
Charrier	1999	GSTM1	Null	French	1.99 (1.19–3.32)	361	437	[49]
Helzlsouer	1998			Caucasian	2.10 (1.22–3.64)	110	113	[50]
Mitrunen	2001			Finnish	1.49 (1.03–2.15)	483	482	[65]
Kaushal	2010			Indian	0.57 (0.32–1.00)	117	174	[56]
This study	2012			Mexican	1.09 (0.69–1.84)	150	150	
Mitrunen	2001	GSTT1	Null	Finnish	1.18 (0.80–1.76)	483	482	[65]
Torresan	2008			Brazilian	0.91 (0.51–1.65)	102	102	[25]
Kaushal	2010			Indian	0.59 (0.36–0.99)	117	174	[56]
This study	2012			Mexican	1.13 (0.69–1.84)	150	150	

OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval. All studies were case–control.

GSTP1^{Val/Val} with an increased BC risk has been described.⁶⁹ Interestingly, in the Brazilian women, although the mentioned genotypes were also found to increase the risk of developing BC, no such association was observed for CYP1B1^{Val/Val} and GSTM1 null. Some reports have demonstrated the association of those polymorphisms of the CEMP with BC risk (Table 10).

The additive effect of risk polymorphisms shows a more significant contribution in premenopausal women than in postmenopausal women (Table 7) underlining the importance of the additive risk of polymorphisms in young women, less exposed to susceptibility factors.

The results of multivariate MDR model (Table 8) show that the BC risk increases proportionally to the number of risk alleles in the individuals.

Although our results need to be confirmed in larger studies, this study provides, for the first time, evidence of the participation of some CEMP polymorphisms in BC risk in Mexican women.

Conclusions

We found that CYP1A1 rs1048943 and GSTP1 rs1695 polymorphisms are associated with a significantly increased BC risk.

We determined a significant association between menopausal status and the BC risk due to the participations of the polymorphisms involved in the CEMP in Mexican women.

A greater number of risk polymorphisms present in a woman may generate a higher risk to develop for BC.

Further studies are needed to confirm our results and to explore the relationship between risk allelic variants and BC, in Mexican women.

Ethical approval

This work was performed under the approval of the Ethics Committees of Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM and of Instituto Nacional de Cancerología, Mexico.

Conflict of interest statement

The authors have declared that they do not have conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN219807-3 and IN210111 to JR and KESC received a scholarship through this grant), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 46311-M, to MEG). OCMR received a scholar fellowship from CONACYT (210363). We thank all our blood donors for their valuable contribution to this project. To Pavel Petrosyan for careful and critical reading of the manuscript and to Tzipe Govezensky for supervision in statistical analyses.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN. *Int J Cancer* 2008;**127**(12): 2893–917.
2. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in Mexico: an urgent priority. *Salud Pública Mex* 2009;**51**(Suppl. 2): s335–44.
3. Hemel D, Domchek SM. Breast cancer predisposition syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010;**24**(5):799–814.
4. Palacios J, Robles-Frías MJ, Castilla MA, López-García MA, Benítez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology* 2008;**75**(2):85–94.
5. Lynch HT, Silva E, Snyder C, Lynch JF. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J* 2008;**14**(1):3–13.
6. Lynch MA, Jackson J, Kim JA, Leeming RA. Optimal number of radioactive sentinel lymph nodes to remove for accurate axillary staging of breast cancer. *Surgery* 2008;**144**(4):525–31. discussion 531–2.
7. Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 1988;**48**(2): 246–53.
8. Banerjee MR. Responses of mammary cells to hormones. *Int Rev Cytol* 1976;**47**: 1–97.

9. Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**(9): 3650–7.
10. Pike MC, Spicer DV, Dahmouh L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;**15**(1):17–35.
11. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect* 1993;**101**(5):372–7.
12. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;**15**(1):36–47.
13. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;**15**(1):48–65.
14. Russo J, Hasan Lareef M, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;**87**(1):1–25.
15. Mitrunen K, Hirvonen A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res* 2003;**544**(1):9–41.
16. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003;**362**(9382):419–27.
17. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;**102**(1–5):89–96.
18. Cavaliere E, Chakravarti D, Guttenplan J, Hart E, Ingle J, Jankowiak R, et al. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1766**(1):63–78.
19. Ball P, Knuppen R. Catecholestrogens (2- and 4-hydroxyestrogens): chemistry, biogenesis, metabolism, occurrence and physiological significance. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1980;**232**:1–127.
20. Cavaliere E, Frenkel K, Liehr G, Rogan E, Roy D. Estrogens as endogenous genotoxic agents—DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000;**27**: 75–93.
21. Cavaliere E, Rogan E, Chakravarti D. The role of endogenous catechol quinones in the initiation of cancer and neurodegenerative diseases. *Meth Enzymol* 2004;**382**:293–319.
22. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006;**354**(3):270–82.
23. Miyoshi Y, Takahashi Y, Egawa C, Noguchi S. Breast cancer risk associated with CYP1A1 genetic polymorphisms in Japanese women. *Breast J* 2002;**8**(4): 209–15.
24. Surekha D, Sailaja K, Rao DN, Padma T, Raghunadharao D, Vishnupriya S. Association of CYP1A1*2 polymorphisms with breast cancer risk: a case control study. *Indian J Med Sci* 2009;**63**(1):13–20.
25. Torresan C, Torrezan GT, Oliveira MM, Abuázar CS, Losi-Guembarovski R, Lima RS, et al. Genetic polymorphisms in oestrogen metabolic pathway and breast cancer: a positive association with combined CYP/GST genotypes. *Clin Exp Med* 2008;**8**(2):65–71.
26. Shin A, Kang D, Choi JY, Lee KM, Park SK, Noh DY, et al. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms and breast cancer risk in Korean women. *Exp Mol Med* 2007;**39**(3):361–6.
27. Moreno-Galván M, Herrera-González NE, Robles-Pérez V, Velasco-Rodríguez JC, Tapia-Conyer R, Sarti E. Impact of CYP1A1 and COMT genotypes on breast cancer risk in Mexican women: a pilot study. *Int J Biol Markers* 2011;**25**(3):157–63.
28. Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, Tee L, Luben RN, Folkard E, et al. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004;**96**(12):936–45.
29. Wen W, Cai Q, Shu X, Cheng J, Parl F, Pierce L, et al. Cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase genetic polymorphisms and breast cancer risk in Chinese women: results from the shanghai breast cancer study and a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**(2):329–35.
30. Hanna IH, Dawling S, Roodi N, Guengerich P, Parl F. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer Res* 2000;**60**(13):3440–4.
31. Shimada T, Watanabe J, Kwajiri K, Sutter TR, Guengerich FP, Gillam EM, et al. Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis* 1999;**20**(8):1607–13.
32. Evens AM, Gartenhaus RB. Molecular etiology of mature T-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Front Biosci* 2003;**8**:d156–75.
33. Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, et al. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 1994;**15**(12):2961–3.
34. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melén K, Julkunen I, et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 1995;**34**(13):4202–10.
35. Weinsilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: catechol O-methyltransferase, thiopurine methyltransferase, and histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;**39**:19–52.
36. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinsilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 1996;**6**(3):243–50.
37. Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg* 2003;**73**(7):517–22.
38. Bruhn C, Brockmoller J, Kerb R, Roots I, Borchert HH. Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase theta (GSTT1). *Biochem Pharmacol* 1998;**56**(9):1189–93.
39. Pandya U, Srivastava SK, Singhal SS, Pal A, Awasthi S, Zimniak P, et al. Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**278**(1):258–62.
40. Pérez-Morales R, Méndez-Ramírez I, Castro-Hernández C, Martínez-Ramírez OC, Gonshebbatt ME, et al. Polymorphisms associated with the risk of lung cancer in a healthy Mexican Mestizo population: application of the additive model for cancer. *Genet Mol Biol* 2011;**34**(4):546–52.
41. Eccles DM, Evans DG, Mackay J. Guidelines for a genetic risk based approach to advising women with a family history of breast cancer. UK Cancer Family Study Group (UKCFSG). *J Med Genet* 2000;**37**(3):203–9.
42. Negri E, Braga C, La Vecchia C, Silvia F, Parazzini F. Family history of cancer and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 1997;**72**(5):735–8.
43. Lahiri DK, Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**(19):5444.
44. Zheng W, Xie D, Jin F, Cheng J, Dai Q, Wen W, et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;**9**(2):147–50.
45. Ho BC, Wassink TH, O'Leary DS, Sheffield VC, Andreasen NC. Catechol-O-methyl transferase Val158Met gene polymorphism in schizophrenia: working memory, frontal lobe MRI morphology and frontal cerebral blood flow. *Mol Psychiatry* 2005;**10**(3):229–287–298.
46. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;**107**(2):229–33.
47. Sergentanis TN, Economopoulos KP. Four polymorphisms in cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010;**122**(2):459–69.
48. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Vena JE, Brasure JR, et al. Cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Res* 1995;**55**(16): 3483–5.
49. Charrier J, Maugard CM, Le Mevel B, Bignon YJ. Allelotype influence at glutathione S-transferase M1 locus on breast cancer susceptibility. *Br J Cancer* 1999;**79**(2):346–53.
50. Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, Strickland PT, Hoffman S, Alberg AJ, et al. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;**90**(7): 512–8.
51. Lavigne JA, Helzlsouer KJ, Huang HY, Strickland PT, Bell DA, Selmin O, et al. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Res* 1997;**57**(24): 5493–7.
52. Thompson PA, Shield PG, Freudenheim JL, Stone A, Vena JE, Marshall JR, et al. Genetic polymorphisms in catechol-O-methyltransferase, menopausal status, and breast cancer risk. *Cancer Res* 1998;**58**(10):2107–10.
53. Hatagima A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. *Cad Saude Publica* 2002;**18**(2):357–77.
54. Zhong SL, Zhou S, Chen X, Huang M. Rapid determination of common mutations in glutathione S-transferase gene by PCR-based methods in healthy Chinese. *Clin Chim Acta* 2006;**364**(1–2):205–8.
55. Schindler J, Li Y, Marion MJ, Paroly A, Brandt-Rauf PW. The effect of genetic polymorphisms in the vinyl chloride metabolic pathway on mutagenic risk. *J Hum Genet* 2007;**52**(5):448–55.
56. Kaushal M, Mishra AK, Raju BS, Ihsan R, Chakraborty A, Sharma J, et al. Betel quid chewing as an environmental risk factor for breast cancer. *Mutat Res* 2010;**703**(2):143–8.
57. Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997;**53**(4):1253–61.
58. Armitage P. Tests for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics* 1955;**11**:375–86.
59. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, et al. Multi-factor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet* 2001;**69**(1):138–47.
60. Chung Y, Lee SY, Elston RC, Park T. Odds ratio based multifactor-dimensionality reduction method for detecting gene-gene interactions. *Bioinformatics* 2007;**23**(1):71–6.
61. Rodríguez-Cuevas S, Macías Martínez CG, Labastida Almdaró S. Breast cancer in Mexico. Is it a young women disease?. *Ginecol Obstet Mex* 2000;**68**: 185–90.
62. Rodríguez-Cuevas S, Macías CG, Franceschi D, Labastida S. Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer* 2001;**91**(4):863–8.
63. Ortega-Ceballos PA, Morán C, Blanco-Muñoz J, Yunes-Díaz E, Castañeda-Iñiguez MS, Salmerón J, et al. Reproductive and lifestyle factors associated with early menopause in Mexican women. *Salud Publica Mex* 2006;**48**(4):300–7.
64. Garrido-Latorre F, Lázcano-Ponce EC, López-Carrillo L, Hernández-Avila M. Age of natural menopause among women in Mexico City. *Int J Gynaecol Obstet* 1996;**53**(2):159–66.
65. Mitrunen K, Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, et al. Polymorphic catechol-O-methyltransferase gene and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;**10**(6):635–40.

66. Huang CS, Chern HD, Chang KJ, Cheng CW, Hsu SM, Shen CY. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res* 1999;**59**(19):4870–5.
67. Sangrajang S, Sato Y, Sakamoto H, Ohnami S, Laird NM, Khuhaprema T, et al. Genetic polymorphisms of estrogen metabolizing enzyme and breast cancer risk in Thai women. *Int J Cancer* 2009;**125**(4):837–43.
68. Linhares JJ, Da Silva ID, De Souza NC, Noronha EC, Ferraro O, DeCarvalho CV, et al. Genetic polymorphism of GSTM1 in women with breast cancer and interact with reproductive history and several clinical pathologies. *Biol Res* 2005;**38**(2–3):273–81.
69. Egan KM, Cai Q, Shu XO, Jin F, Zhu TL, Dai Q, et al. Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTP1, and GSTT1 and the risk for breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;**13**(2):197–204.
70. Opdahl S, Nilsen TI, Romundstad PR, Vanky E, Carlsen SM, Vatten LJ. Association of size at birth with adolescent hormone levels, body size and age at menarche: relevance for breast cancer risk. *Br J Cancer* 2008;**99**(1):201–6.
71. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001;**344**(4):276–85.
72. Li DN, Seidel A, Pritchard MP, Wolf CR, Friedberg T. Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics* 2000;**10**(4):343–53.
73. Landi MT, Bertazzi PA, Shields PG, Clark G, Lucier GW, Garte SJ, et al. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics* 1994;**4**(5):242–6.
74. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998;**19**(2):275–80.
75. Kocabas NA, Sardas S, Cholerton S, Daly AK, Karakaya AE. Cytochrome P450 CYP1B1 and catechol O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population. *Arch Toxicol* 2002;**76**(11):643–9.
76. Jiao H, Liu C, Guo W, Peng L, Chen Y, Martin FL. Association of CYP1B1 polymorphisms with breast cancer: a case-control study in the Han population in Ningxia Hui Autonomous Region, P. R. China. *Biomark Insights* 2010;**5**:21–7.
77. Okobia MN, Bunkar CH, Garte SJ, Zmuda JM, Ezeome ER, Anyanwu NC, et al. Cytochrome P450 1B1 Val432Leu polymorphism and breast cancer risk in Nigerian women: a case control study. *Infect Agent Cancer* 2009;**4**(Suppl. 1):S12.
78. Wu AH, Tseng CC, Van Den Band Yu MC. Tea intake, COMT genotype, and breast cancer in Asian-American women. *Cancer Res* 2003;**63**(21):7526–9.
79. Sazci A, Erqul E, Utkan NZ, Cantuik NZ, Ky G. Catechol-O-methyltransferase Val 108/158 Met polymorphism in premenopausal breast cancer patients. *Toxicology* 2004;**204**(2–3):197–202.