



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS
CYP1A1*2A Y CYP1B1*3 CON EL RIESGO DE
PADECER CÁNCER DE MAMA EN MUJERES
MEXICANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KARLA ESPERANZA SOTO CRUZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias

A mis padres, Cruz Manuel y Martha Leticia, quienes siempre me han brindado su cariño y apoyo.

A mis hermanas, Ángela, Maricruz y Martha, quienes siempre me han acompañado.

A mis abuelos Roberto y Trino, donde quiera que se encuentren.

A mis amigos, a quienes debo tantos ratos agradables y memorables.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la participación de muchas personas que me dieron su apoyo y ayuda de una forma u otra, a quienes deseo expresar mis más sinceros agradecimientos; de antemano me disculpo si he omitido u olvidado a alguien.

Quisiera agradecer muy en especial a mis padres por su apoyo en todo momento y por el amor que me han brindado, así como a mis hermanas por todos esos momentos que hemos pasado juntas.

A mi asesora la Dra. Julieta Rubio por ayudarme a mejorar mi trabajo y mi formación como bióloga, pero sobre todo por brindarme su amistad y sus consejos.

A mis amigos (de aquí y de allá) a quienes debo tantos ratos agradables y memorables, porque me han permitido aprender de ustedes, por sus consejos y ánimos.

A mis profesores quienes han sido un pilar fundamental en mi formación como bióloga y como persona.

A mis sinodales y a la Dra. Tzipe Govezensky por sus revisiones y valiosos comentarios realizados a este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio por los consejos y recomendaciones para este trabajo y a Pavel por su peculiar sentido del humor, por las sonrisas robadas.

El desarrollo de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero y beca de PAPIT-UNAM.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. ANTECEDENTES	
La glándula mamaria	2
Definición del cáncer de mama	3
Clasificación del cáncer de mama.....	3
Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en México y en el mundo	5
Factores de riesgo y protectores	6
❖ Factores genéticos	7
❖ Sexo.....	8
❖ Edad.....	8
❖ Factores reproductivos	9
❖ Factores del estilo de vida	12
❖ Otros.....	14
Carcinogenicidad de los estrógenos.....	15
Acción molecular de los estrógenos.....	15
Mecanismo molecular del cáncer de mama.....	16
Metabolismo de los estrógenos	17
Epidemiología molecular del cáncer de mama	20
Citocromos P450	20
Polimorfismos en los citocromos P450.....	21
Variabilidad interétnica de los polimorfismos.....	23
Estudios de asociación (casos y controles)	26
JUSTIFICACIÓN.....	27
OBJETIVOS (general y particulares)	28
HIPÓTESIS	28
II. MATERIALES Y MÉTODOS	28
Obtención de muestras (mujeres sanas y pacientes con cáncer de mama primario).....	28
❖ Criterios de inclusión	29

❖ Criterios de exclusión.....	29
Población abierta	30
Estimación del tamaño de la muestra.....	30
Purificación del DNA.....	31
Análisis genotípico de CYP1A1*2A.....	31
Análisis genotípico de CYP1B1*3.....	33
Obtención de frecuencias genotípicas y alélicas	34
Análisis estadísticos.....	35
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Población abierta	36
Casos y controles	39
IV. CONCLUSIONES.....	48
V. PERSPECTIVAS.....	48
VI. LITERATURA CITADA	50
VII. ANEXOS	59

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CYP1A1*2A Y CYP1B1*3 CON EL RIESGO DE PADECER CÁNCER DE MAMA EN MUJERES MEXICANAS

RESUMEN

Se han descrito diversos genes de baja penetrancia relacionados con el cáncer de mama cuyo impacto individual es pequeño en términos de riesgo relativo, pero en conjunto contribuyen a los casos de cáncer de mama esporádico, los cuales van en aumento en México y en el mundo. A la fecha, la mayoría de los genes candidatos de baja penetrancia que han sido evaluados en relación con este tipo de cáncer codifican para proteínas que participan en el metabolismo de los estrógenos, varios de éstos son miembros de la superfamilia de citocromos P450 (CYPs) y presentan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). El CYP1A1*2A y el CYP1B1*3 son variantes polimórficas que participan en dicho metabolismo y que pueden incidir en la estructura, la función o en la actividad de las proteínas codificadas, alterando la cantidad de metabolitos carcinogénicos resultantes, estos contribuyen a la aparición de aductos en el DNA que conducen a la generación de mutaciones asociadas al desarrollo de tumores.

Los estudios de asociación entre dichos polimorfismos y la susceptibilidad a padecer cáncer de mama suelen ser inconsistentes, lo cual puede deberse al tamaño de la muestra y/o a la frecuencia de los polimorfismos en las poblaciones analizadas.

En el presente estudio se analizó una muestra de población abierta mexicana para determinar la frecuencia del polimorfismo CYP1B1*3. Posteriormente se analizaron las frecuencias de los polimorfismos CYP1A1*2A y CYP1B1*3 en mujeres mexicanas sanas y en mujeres mexicanas con cáncer de mama primario y se determinó su posible asociación con la susceptibilidad de desarrollar esta neoplasia.

En la población mexicana, la frecuencia del polimorfismo CYP1B1*3 fue 0.31, similar a la reportada en la población Latina, e intermedia entre las reportadas para las poblaciones asiática y caucásica. En cuanto a la posible asociación de estos polimorfismos con la susceptibilidad a cáncer de mama, se encontró que el tamaño de muestra resulta insuficiente. El polimorfismo CYP1A1*2A se asocia con un aumento no significativo del riesgo, particularmente en mujeres postmenopáusicas con el genotipo CC. Contrariamente, el polimorfismo CYP1B1*3 parece tener un efecto protector no significativo, especialmente en mujeres postmenopáusicas portadoras del genotipo Leu/Val.

Finalmente, esta investigación pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios que incluyan un mayor número de pacientes y de otros marcadores en el desarrollo de esta enfermedad que contribuyan al desarrollo de nuevas herramientas de predicción de riesgo y respuesta terapéutica en nuestra población.

I. ANTECEDENTES

La glándula mamaria

La glándula mamaria es una glándula alveolar, compuesta por un conjunto de unos 20 lóbulos separados por tejido conectivo interlobular denso y grasa (Geneser, 2000). Cada lóbulo se compone de numerosos lobulillos y tiene un sistema ductal que drena a través de una vía excretora independiente o conducto galactóforo, éste se ensancha a nivel de la areola mamaria formando un seno lactífero, que sirve como reservorio de leche, y que posteriormente desemboca en el pezón.

Antes de la pubertad el complejo sistema de conductos ramificados termina en fondos ciegos, pero al comienzo de la menarca, en respuesta a los niveles crecientes de hormonas ováricas sexuales, prolifera distalmente formando unos treinta conductillos o acinos revestidos de epitelio. Además del desarrollo del sistema de conductos epiteliales, se acumula grasa en el tejido conectivo entre los lóbulos y los lobulillos (Secretaría de Salud, 2002).

La mama completa su desarrollo y actividad funcional al término del embarazo y la lactancia (Secretaría de Salud, 2002), no aparecen nuevos componentes estructurales pero los ya existentes (epitelios lobulillar y ductal) terminan su diferenciación y se convierten en células secretoras.

En los años posteriores a la menopausia la glándula mamaria sufre una involución gradual, las estructuras epiteliales y del tejido conectivo experimentan una atrofia provocada por la deficiencia hormonal (Geneser, 2000; Secretaría de Salud, 2002); Los lobulillos y los conductos degeneran y disminuyen en número, y el tejido adiposo puede desaparecer por completo.

Definición del cáncer de mama

El cáncer de mama es una proliferación acelerada, desordenada y no controlada de células pertenecientes a los tejidos de la glándula mamaria (Martínez, 2007) y se cree que es consecuencia de la acumulación de mutaciones que pueden resultar en la activación de proto-oncogenes y/o en la inactivación de genes supresores de tumores.

Clasificación del cáncer de mama

La presencia de varias anomalías histológicas del epitelio mamario sugiere la posibilidad de progreso del cáncer de mama a través de etapas de displasia, neoplasia no invasora (carcinoma *in situ*) y neoplasia con alto potencial metastásico (carcinoma invasor/infiltrante). Del 15 al 30% de las neoplasias malignas de mama corresponden a carcinomas *in situ*, y el resto a carcinomas invasores/infiltrantes. Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares. Dentro de los carcinomas infiltrantes existen otros subtipos menos ordinarios tales como tubular/cribiforme, coloides, medulares y papilares (Cotran et al., 1999 en Martínez, 2007). Estas características histopatológicas referentes a la diferenciación de los tumores son importantes para estimar el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama.

También se puede clasificar al cáncer de mama en estadios de acuerdo con el sistema de clasificación TNM. En este sistema la etapa clínica se determina por la extensión del tumor (T), la implicación de ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M). De acuerdo con estas etapas se puede determinar si la enfermedad es temprana, localmente avanzada o metastásica (Martínez, 2007).

Los perfiles de expresión génica de pacientes también han generado una buena clasificación de los tumores e identificado subgrupos tumorales con características clínicas particulares (Hidalgo-Miranda y Jiménez-Sánchez, 2009):

1. El grupo *ERBB2*, que expresa altos niveles del gen *ERBB2* (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), así como de otros genes localizados en el amplicón *ERBB2* negativos al receptor de estrógenos (RE). Los pacientes muestran una mejor respuesta a la quimioterapia y cerca de 50% responde al tratamiento con trastuzumab, anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente a *ERBB2* inhibiendo la proliferación de células tumorales mediada por este oncogen.
2. El grupo “parecido al normal” se caracteriza por expresar un gran número de genes propios del epitelio mamario normal negativos al RE.
3. El grupo “basal” expresa genes característicos de las células basales de la mama, en particular queratinas 5 y 17, y son negativos al RE, al receptor de progesterona (RP) y a la amplificación de *ERBB2*, es decir, son negativos triples. En este subtipo las pacientes tienen la menor tasa de sobrevida.
4. El grupo “luminal” se distingue por la expresión, relativamente alta, de muchos genes expresados en las células epiteliales de la luz de los conductos mamaros, incluido el RE. Son tumores negativos a *ERBB2* y los pacientes suelen tener la mejor tasa de sobrevida.

Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en México y en el mundo

El cáncer de mama se ha incrementado en incidencia y mortalidad en México y en el mundo convirtiéndose en el cáncer más común y de mayor mortalidad en la mujer, por lo que representa un serio problema de salud pública.

De acuerdo con lo publicado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) en GLOBOCAN 2008, se detectaron 1,383,523 casos nuevos de cáncer de mama en el mundo y murieron 458,367 mujeres por dicha neoplasia. Asimismo se estima que para 2030 habrá 2,166,673 casos nuevos de cáncer de mama y alrededor de 700,000 muertes atribuibles a esta enfermedad.

Las tasas de incidencia ajustadas por edad (ASR, *Age-standardised rate*) van de 19.3 (por 100,000 mujeres) en África oriental a 89.9 en Europa occidental. Estas son altas (>80) en las regiones desarrolladas (excepto en Japón) y bajas en la mayoría de las regiones en desarrollo (<40); se cree que estas diferencias se deben a la influencia que el estilo de vida puede tener en los factores de riesgo, mencionados más adelante, y posiblemente también, al sesgo que los diferentes métodos de detección y registro pueden inducir en datos de incidencia (Brandan y Villaseñor, 2006).

En cuanto a la mortalidad el rango de las ASR es menor (aproximadamente de 6 a 19 por 100,000 mujeres). Esto refleja una mejor tasa de supervivencia a la enfermedad en los países desarrollados debida, probablemente, a un mejor acceso a procedimientos eficaces y oportunos de detección y tratamiento (Brandan y Villaseñor, 2006).

En México, se registraron 11,656 casos en el 2002 según el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), y de acuerdo con el INEGI durante el período de 2004 a 2007 el cáncer de mama fue la principal causa de egreso hospitalario en mujeres. Esta neoplasia presenta un incremento constante en los últimos diez años (1998-2008), ubicándose en el primer lugar a partir del 2006 (INEGI, 2010) desplazando al cáncer cérvico-uterino.

En el 2008 se reportan 13,939 casos nuevos de cáncer de mama, lo que representa el 21.2% del total de casos de cáncer que ocurren en la mujer; se estima que para el año 2030 habrán 24,386 nuevos casos, y que el número de muertes debidas a esta enfermedad estará cerca de duplicarse pasando de 5,217 defunciones en el 2008 a 9,778 en el 2030 (GLOBOCAN 2008).

Al igual que en el plano internacional, en México se ha observado que existen diferencias regionales en cuanto a la incidencia y mortalidad del cáncer de mama en nuestro país; las mayores tasas se encuentran en los estados del norte y centro del país, los cuales tienen un

nivel socioeconómico más elevado, en contraste con los estados del sur donde la incidencia, la mortalidad y el nivel socioeconómico son menores (López-Ríos et al. 1997; Palacio-Mejía et al. 2009).

Según un estudio realizado con base en los casos registrados desde 1993 hasta 1996 en el RHNM, en el 46% de las mujeres mexicanas afectadas por el cáncer de mama éste se presenta antes de los 50 años y el grupo de edad más afectado es el de 40-49 años con una frecuencia de 29.5%, mientras que los grupos de 30 a 39 y de 60 a 69 años tienen una frecuencia de 14% (Rodríguez-Cuevas et al. 2001). En cuanto a la mortalidad, alrededor del 40% de las defunciones se concentran en el grupo de edad de 60 años y más (INEGI, 2010).

Factores de riesgo y protectores

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y multifactorial, en la que intervienen tanto factores genéticos como no genéticos (Torrades, 2003). Los principales factores de riesgo para el cáncer de mama se han relacionado con una exposición prolongada a estrógenos.

❖ Factores genéticos

Sólo un 0.1-10%, dependiendo del tipo de cáncer, es hereditario. En el caso del cáncer de mama, alrededor del 5-10% es hereditario; el 90% restante es esporádico, es decir, no heredable (Torrades, 2003).

Se han descrito diversos genes relacionados con el cáncer de mama; el primer grupo de riesgo lo constituyen genes de alta penetrancia (mutaciones en estos genes aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar cáncer de mama) como *BRCA1* y *BRCA2*, asociados con el cáncer de mama hereditario o de tipo familiar (Torrades, 2003; Hidalgo-Miranda y Jiménez-Sánchez, 2009).

Las mutaciones en el gen supresor tumoral *P53*, dentro del marco del síndrome de Li-Fraumeni, también se consideran como de alta penetrancia, ya que las pacientes con este síndrome presentan un riesgo significativamente más elevado de padecer cáncer de mama. Asimismo en los síndromes de Cowden (mutaciones en *PTEN*) y Peutz-Jeghers (*STK11*) y el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario (mutaciones en *CDH1*) se ha identificado una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, las mutaciones en genes supresores de tumores como *P53*, *PTEN*, *STK11* y *CDH1* son muy raras en los tumores de mama esporádicos (Hidalgo-Miranda y Jiménez-Sánchez, 2009).

Aunque en el 85% de los casos de cáncer mamario no hay evidencia de historia familiar, cuando ésta se presenta en familiares de primer grado, el riesgo para la mujer aumenta de 2 a 3 veces comparado con mujeres sin antecedentes familiares de cáncer de mama (Brandan y Villaseñor, 2006).

Por otro lado, existen diversos genes de baja penetrancia, cuyo impacto individual es pequeño en términos de riesgo relativo, pero en conjunto contribuyen a los casos de cáncer de mama esporádico que usualmente se presentan en mujeres postmenopáusicas que son positivas para el RE. Cabe mencionar que estos tumores son causados por la interacción entre muchos polimorfismos genéticos y factores ambientales (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

En síntesis, la historia familiar, mutaciones genéticas *BRCA1* y *BRCA2* (en aproximadamente una de cada mil mujeres) y la frecuencia de polimorfismos genéticos asociados a la síntesis de estrógenos y su metabolismo, son factores que determinarán la prevalencia de cáncer mamario en una población (Brandan y Villaseñor, 2006).

❖ 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 cáncer de mama es ser mujer, la relación de cáncer de mama entre mujeres y hombres es aproximadamente de 100 a 1 (Hulka y Moorman, 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 (Torrades, 2003). Sin embargo, el cáncer de mama muestra algunos rasgos distintivos en términos de las tasas de incidencia específicas por edad; a diferencia de la mayoría de los cánceres comunes cuyas tasas de incidencia comienzan a aumentar al final de los 40 años, las tasas de incidencia del cáncer de mama empiezan a aumentar desde los 20 años (Hulka y Moorman, 2001), duplicándose aproximadamente cada 10 años hasta la menopausia, etapa en que el ritmo de crecimiento disminuye (McPherson et al. 2000). 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 y Moorman, 2001).

❖ **Factores reproductivos**

Estrógenos endógenos

La exposición a hormonas sexuales endógenas está determinada por diferentes variables entre ellas: edad de la menarca, edad al término del primer embarazo, número de embarazos, tiempo de lactancia y edad de la menopausia.

El riesgo aumentado de padecer cáncer de mama está asociado con una menarca temprana (<12 años) y una menopausia tardía (>55años); a menor edad de la menarca y mayor edad de la menopausia se maximiza el número de ciclos ovulatorios y por ende la exposición del epitelio mamario a los estrógenos, lo que constituye un factor crítico de la carcinogénesis en la mama (Mcpherson et al., 2000; Mitrunen y Hirvonen, 2003; Brandan y Villaseñor, 2006).

Por cada año que se retrasa la menopausia, el riesgo de cáncer de mama aumenta en aproximadamente un 3% (Mitrunen y Hirvonen, 2003). Las mujeres que tienen una menopausia después de los 55 años tienen el doble de probabilidades de desarrollar cáncer de mama que las mujeres que experimentan la menopausia antes de los 45 años (McPherson et al., 2000).

En este sentido la ooforectomía bilateral (extirpación de ambos ovarios) tiene un impacto significativo en el riesgo de cáncer de mama, pues las mujeres que se someten a esta cirugía antes de la edad de 35 años tienen sólo el 40% del riesgo que presentan las mujeres que tienen una menopausia natural (McPherson et al., 2000), de hecho ésta fue una de las primeras observaciones que sugirieron un papel hormonal en la etiología del cáncer de mama (Hulka y Moorman, 2001).

La nuliparidad y la edad tardía (>30 años) del primer parto también aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Por el contrario, la multiparidad y una edad de término del primer embarazo antes de los 20 años se refieren como factores protectores contra cáncer de mama, lo mismo que la lactancia prolongada (>1año) (Calderón-Garcidueñas et al., 2000; Hulka y Moorman, 2001; Mitrunen y Hirvonen, 2003).

El riesgo en mujeres que tienen su primer hijo después de los 30 años es aproximadamente el doble que en mujeres que tienen su primer hijo antes de cumplir los 20 años. El grupo de mayor riesgo son aquéllas que tienen su primer hijo después de los 35 años; estas mujeres parecen tener un riesgo aún mayor que las mujeres nulíparas. (McPherson et al., 2000).

El efecto protector del embarazo se ha observado principalmente para el cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas (Hulka y Moorman, 2001). Aunque no se conoce el mecanismo, algunos estudios han demostrado un aumento en el riesgo durante y después

del embarazo, que se ha atribuido a los altos niveles de exposición a estrógenos y a progesterona (Lambe, et al.,1994 en Hulka y Moorman, 2001) . Después de un período posparto de 10 a 15 años, se observa una protección a largo plazo, probablemente como resultado de la plena diferenciación de las células de la glándula mamaria que ocurre con el embarazo (Russo et al., 2000 en Mitrunen y Hirvonen, 2003), haciéndolas menos susceptibles a transformaciones carcinogénicas.

Asimismo, se sabe que la lactancia posterga el regreso de la ovulación después del embarazo y está asociada con un ambiente hormonal diferente (prolactina aumentada), que se traduce en menor exposición a los estrógenos en la mama. También se ha sugerido que agentes carcinógenos potenciales podrían ser excretados en la leche materna (Newcomb, et al., 1994 en Hulka y Moorman, 2001).

Recientemente se ha demostrado que muchos de estos factores hormonales están más asociados con el cáncer que es positivo para el RE y al RP que para el cáncer que es negativo para los mismos (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

Estrógenos exógenos

La ingesta de hormonas sexuales es muy común entre las mujeres, ya sea como anticonceptivos o como terapia hormonal de reemplazo (THR) para evitar los efectos negativos de la menopausia, por lo que su relación con el cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada. Cambios en los patrones de uso, la reducción de la dosis de la hormona, y consideraciones temporales, contribuyen a la dificultad para comparar estudios (Hulka y Moorman, 2001).

Más que la edad a la que se inició la ingesta, o la dosis y el tipo de hormonas empleadas, e incluso que el tiempo de uso, lo más relevante es que tan recientemente se utilizaron (Mcperson et al., 2000; Hulka y Moorman, 2001).

Un meta-análisis realizado con datos de 54 estudios sugiere que el uso de anticonceptivos orales aumenta en un 24% el riesgo a padecer cáncer de mama, y éste desaparece 10 años después de terminar el tratamiento (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

Respecto a la THR, su uso a largo plazo (5 años o más) parece estar asociado con un aumento del 30-50% en el riesgo de padecer cáncer de mama según los informes del Grupo de Colaboración sobre los factores hormonales en el cáncer de mama; el riesgo desaparece 5 años después de suspender su uso (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

Algunos agentes ambientales (pesticidas, colorantes, contaminantes, plastificantes, conservadores de alimentos) también llamados xenoestrógenos o disruptores endocrinos porque interfieren con las acciones de los estrógenos endógenos, juegan un papel en la etiología del cáncer de mama (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

❖ Factores del estilo de vida

Dieta

Se ha especulado ampliamente que la dieta es una de las causas de las diferencias observadas en las tasas de incidencia de cáncer de mama entre los países. Se han realizado comparaciones internacionales que muestran una correlación entre el promedio de ingesta de grasas de un país y las tasas de incidencia de cáncer de mama (Hulka y Moorman, 2001), sin embargo, la evidencia epidemiológica al respecto es inconsistente.

Un estudio realizado por Bartsch y colaboradores (1999) sugiere que un alto consumo de grasa, particularmente ácidos grasos poli-insaturados, aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama. Además, la evidencia experimental en animales demuestra que un alto consumo de grasa aumenta la tasa de formación de tumores mamarios (Hulka y Moorman, 2001). También el consumo de carne se ha asociado con un aumento en el riesgo a cáncer de mama en algunos estudios (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que el consumo de frutas y verduras, fuente de antioxidantes naturales, puede disminuir el riesgo de padecer cáncer de mama (Mitrunen y Hirvonen, 2003). Las observaciones de la dieta en países con menores tasas de cáncer de mama como Japón y China, han sugerido que la soya también puede proteger contra este cáncer, y se cree que hay una reducción del riesgo debido al efecto de los fitoestrógenos contenidos en la proteína de la soya, estos componentes actúan como antagonistas del estrógeno, de forma análoga a la acción del tamoxifeno (Hulka y Moorman, 2001).

Obesidad

La obesidad está asociada con un riesgo dos veces mayor de padecer cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, mientras que en mujeres premenopáusicas se asocia con una menor incidencia (McPherson et al., 2000; Randolph et al., 2004).

Lo anterior debido a que en mujeres postmenopáusicas la producción ovárica de estrógenos disminuye considerablemente, por lo que casi la totalidad de los estrógenos proviene de la síntesis extragonadal en el hígado y otros tejidos, como el adiposo, que expresan el citocromo CYP19-aromatasa, enzima que convierte andrógenos, como la testosterona o la androstendiona, en estrógenos. Esos precursores androgénicos son producidos principalmente en las glándulas suprarrenales y, en menor proporción, en el ovario. La aromatización de androstendiona da lugar a la formación de estrona, el estrógeno más abundante en el suero de las mujeres postmenopáusicas; también se producen estradiol y estriol, pero en cantidades menores (Riancho y González, 2004). Como resultado, las mujeres postmenopáusicas obesas muestran niveles más altos de estrona y estradiol circulante comparadas con mujeres delgadas (Hulka y Moorman, 2001).

Por el contrario, se ha sugerido una asociación inversa para la obesidad y el cáncer de mama en mujeres premenopáusicas, pues en éstas más del 95% del estradiol proviene de

la síntesis ovárica y un mayor grado de anovulación debida a la obesidad puede resultar en niveles más bajos de estrógenos (Mitrunen y Hirvonen, 2003; Randolph et al., 2004).

Tabaquismo

Los estudios que asocian el hábito de fumar con el riesgo de padecer cáncer de mama, suelen ser controversiales, esto debido a que los componentes del humo del cigarro incluyen agentes con efectos antiestrogénicos, como la nicotina que actúa como inhibidor de la aromatasas CYP19, pero también contiene agentes carcinógenos.

En general, el tabaquismo parece tener poco efecto sobre el riesgo de padecer cáncer de mama; algunos mutágenos del humo del cigarro se han detectado en el tejido de la mama, sugiriendo la posibilidad de un efecto carcinogénico directo, sin embargo se ha observado que las mujeres que fuman tienden a ser delgadas, tener bajos niveles de estrógenos en la orina y presentan a una edad menor la menopausia que las no fumadoras, efectos que, como se ha mencionado anteriormente, tienden a reducir el riesgo de cáncer de mama (Hulka y Moorman, 2001; Randolph et al., 2004).

Consumo de alcohol

Existen varios estudios que han demostrado una relación entre el consumo de alcohol y la incidencia de cáncer de mama (Mcpherson et al., 2000; Mitrunen y Hirvonen, 2003), en promedio, ingerir entre uno y dos tragos por día aumenta el riesgo modestamente (riesgo relativo en el rango de 1.2-1.4) (Hulka y Moorman, 2001).

Se sabe que el alcohol induce la producción de especies reactivas de oxígeno y aumenta la formación de aductos, posiblemente debido a la expresión disminuida de enzimas de desintoxicación; sin embargo no se conoce totalmente el mecanismo responsable del efecto carcinogénico, pero se ha demostrado que las mujeres que consumen alcohol presentan altas concentraciones plasmáticas de estrógenos (Mitrunen y Hirvonen, 2003; Torrades, 2003).

Actividad física

La actividad física se considera un factor protector contra el cáncer de mama, posiblemente a través de la reducción de ciclos ovulatorios regulares (Henderson et al., 1985) y del aumento de la cantidad de catecolestrógenos metilados (De Créé et al., 1997).

❖ **Otros**

Otros factores de riesgo como el estatus socioeconómico alto y la localización geográfica (países desarrollados), se explican en gran medida por la influencia que el estilo de vida, incluidos los cambios en los patrones reproductivos y nutricionales, puede tener en los factores de riesgo antes mencionados como la nuliparidad, edad tardía al primer parto, ingesta de grasas y un mayor uso de hormonas sintéticas, como anticonceptivos y THR.

Carcinogenicidad de los estrógenos

El 17-beta estradiol (E_2) es el estrógeno natural más activo en el tejido mamario y el que tiene la mayor afinidad por el RE. El RE se sobreexpresa en el tejido maligno en comparación con las células normales (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

En modelos animales se ha visto que induce aneuploidía, cambios cromosómicos estructurales y tumores (Cavalieri et al., 2000; Liehr, 2000; Yager, 2000); asimismo estudios epidemiológicos muestran que el E_2 aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama y útero.

De acuerdo con la IARC (1987, 1999, 2007) existe suficiente evidencia de su carcinogenicidad en humanos, sin embargo se supone que su actividad carcinogénica es débil, debido a que los estrógenos esteroideos son hormonas endógenas con valores picomolares, que de ser carcinógenos fuertes habrían constituido una desventaja evolutiva para los seres humanos y para muchas otras especies (Liehr, 2000).

Acción molecular de los estrógenos

El efecto de los estrógenos sobre las células diana depende generalmente de su fijación a receptores específicos (activación dependiente de ligando). Estos receptores se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo, y están asociados con proteínas que sirven como chaperonas que estabilizan al receptor en su estado inactivo o que cubren el sitio de unión al DNA. Una vez que una molécula de estrógeno se une al dominio de unión del ligando del RE, éste se disocia de sus chaperonas citoplasmáticas, y forma un complejo estrógeno-RE que difunde al núcleo y se une a regiones específicas del DNA, llamadas elementos de respuesta a estrógenos (ERE), y con la colaboración de otras proteínas que actúan como coactivadores o represores, modulan la transcripción de diversos genes. Existen al menos dos tipos de estos receptores estrogénicos, el alfa y el beta. (Gruber et al., 2002; Riancho y González, 2004).

En ausencia del ligando hormonal, el RE también puede ser activado por fosforilación; algunos factores de crecimiento aumentan la actividad de las cinasas que fosforilan diferentes sitios de la molécula del RE y de esta manera se puede llevar a cabo la transcripción (Gruber et al., 2002).

Además existe otro mecanismo de acción extranuclear de los estrógenos, llamado “no genómico”, porque no depende de la transcripción. Este mecanismo está implicado en varias de las acciones de los estrógenos a nivel de tejidos no reproductivos, como la vasodilatación arterial, la activación neuronal y la formación ósea. Dichas acciones parecen depender de la fijación del estrógeno a una variante de receptores estrogénicos unidos a la membrana celular (como el GPR30). Dichos receptores tienden a localizarse en invaginaciones de la membrana llamadas cavéolas y modulan la actividad de ciertas cinasas que a su vez influyen en diversos procesos celulares, mediante cascadas de señalización (Gruber et al., 2002; Riancho y González, 2004).

Mecanismo molecular del cáncer de mama

El cáncer es consecuencia de la acumulación de mutaciones que pueden resultar en la activación de proto-oncogenes y en la inactivación de genes supresores de tumores, esto seguido por proliferación celular y/o apoptosis no controladas.

Como ya se mencionó, el cáncer de mama está relacionado con la exposición prolongada a estrógenos, éstos tienen un doble papel en la carcinogénesis: como procarcinógenos que causan daños genéticos que pueden iniciar una neoplasia y como hormonas estimulantes que actúan como promotores de la proliferación celular tras la iniciación (Liehr, 2000).

La principal actividad de los estrógenos es a través de la estimulación de la proliferación celular del epitelio mamario; lo cual puede aumentar la tasa de división celular y por ende la probabilidad de originar errores genéticos (mutaciones espontáneas) durante la replicación del DNA, lo que a su vez puede llevar a desarrollar una neoplasia maligna (Yager, 2000; Mitrunen y Hirvonen, 2003).

Aunado a lo anterior, hay evidencia que apoya la participación de una vía complementaria (ruta catecol), en la que se genera genotoxicidad directa (mediante la formación de aductos) o indirectamente (generación de especies reactivas de oxígeno, ROS *Reactive Oxygen Species*) de los metabolitos de los estrógenos, comúnmente llamados catecolestrógenos (CE); dichos metabolitos actúan como iniciadores de alteraciones celulares por lo que juegan un papel importante en la iniciación del cáncer de mama (Yager, 2000).

Metabolismo de los estrógenos

Todos los estrógenos tienen un anillo aromático (anillo A), un grupo fenólico en el C-3 y un grupo metilo en la posición C-13. El E₂ se puede metabolizar a través de tres vías: por hidroxilación en el anillo A, ya sea en el carbono 2 ó en el 4, o bien, por hidroxilación en el anillo D. La hidroxilación en el anillo A lleva a la formación de catecoles, llamados 2 o 4-

hidroxiestradiol ó CE, mientras que la hidroxilación en el anillo D produce 16-hidroxiestradiol. Se sabe que el metabolismo predominante es hacia la formación de los 2- y 4-hidroxiderivados, mientras que la metabolización hacia el 16-hidroxiderivado es sólo del 10% (Liehr et al., 1986 en Mitrunen y Hirvonen, 2003) por lo que de aquí en adelante sólo se tratará la ruta catecol (Figura 1.1).

El metabolismo de los estrógenos está mediado por la acción de varios citocromos P450. En el hígado participan CYP1A2, 3A3 y 3A4, y en tejidos extrahepáticos CYP1A1 y CYP1B1. En la mayoría de las especies de mamíferos, la hidroxilación aromática del E₂ se produce principalmente en el carbono 2 y en menor medida en el carbono 4 (Liehr, 2000; Thompson y Ambrosone, 2000).

CYP1A1 convierte E₂ en 2-hidroxiestradiol (2-OHE₂), y debido a la falta de especificidad de la enzima, también se forma entre 15-20% de 4-hidroxiestradiol (4-OHE₂). Por el contrario, CYP1B1 es más específica y convierte E₂ exclusivamente en 4-OHE₂; la concentración de 4-OHE₂ comparada con 2-OHE₂ en una biopsia de tejido de cáncer de mama es 4:1 (Liehr, 2000), lo que sugiere que el 4-OHE₂ tiene un papel más importante en la carcinogénesis que el 2-OHE₂.

Los derivados 2 y 4-hidroxilados pueden ser inactivados por *O*-metilación, catalizada por la catecol *O*-metiltransferasa (COMT). Se cree que la falta de actividad carcinogénica observada en los 2-hidroxiestrógenos se debe a que éstos tienen una tasa más rápida de metilación (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

Si los CE no son metilados, sufren una oxidación originando la formación de semiquinonas (E₂-SQs), y posteriormente una segunda oxidación genera quinonas (E₂-Qs). Las E₂-SQs pueden reaccionar con oxígeno molecular y formar radicales superóxido, éstos son reducidos a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) espontáneamente o por la acción de la superóxido dismutasa (SOD). Las E₂-Qs a su vez pueden conjugarse con glutatión (GSH) por

las glutatión-S-transferasas (GSTs) o ser reducidas a CE por la quinona reductasa (Mitrunen y Hirvonen, 2003).

De no conjugarse, las E₂-2,3Q pueden unirse establemente al DNA, mientras que las E₂-3,4Q forman aductos de purinas, los cuales se separan del DNA por segmentación del enlace glucosídico dejando sitios apurínicos (Mitrunen y Hirvonen, 2003) que causan alteraciones celulares que pueden inducir la iniciación tumoral. Además, el ciclo redox entre E₂-SQs y E₂-Qs produce ROS, que pueden causar daño oxidante a lípidos y al DNA.

Epidemiología molecular del cáncer de mama

La epidemiología molecular consiste en el análisis de genotipos específicos en poblaciones de interés y permite conocer si existe asociación entre los genotipos de riesgo y el desarrollo de enfermedades en dichas poblaciones (Pérez-Morales, 2006).

A la fecha, la mayoría de los genes candidatos de baja penetrancia que han sido evaluados en relación con el cáncer de mama codifican para proteínas que participan en el metabolismo de los estrógenos (Huang et al., 1999a; Kristensen y Borresen-Dale, 2000; Thompson y Ambrosone, 2000; Weber y Nathanson, 2000; Mitrunen y Hirvonen, 2003; Miyoshi y Noguchi, 2003; Kocabaş, et al., 2005; Le Marchand et al., 2005; Diergaarde et al., 2008; Reding et al., 2009). Varios de éstos son miembros de la superfamilia de citocromos P450 y presentan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), estas variantes polimórficas pueden incidir en la estructura, la función o en la actividad de las proteínas codificadas (Shimada et al., 1999; Hanna et al., 2000; Aklillu et al., 2002), alterando la cantidad de metabolitos carcinogénicos resultantes y por ende la susceptibilidad individual de desarrollar esta neoplasia.

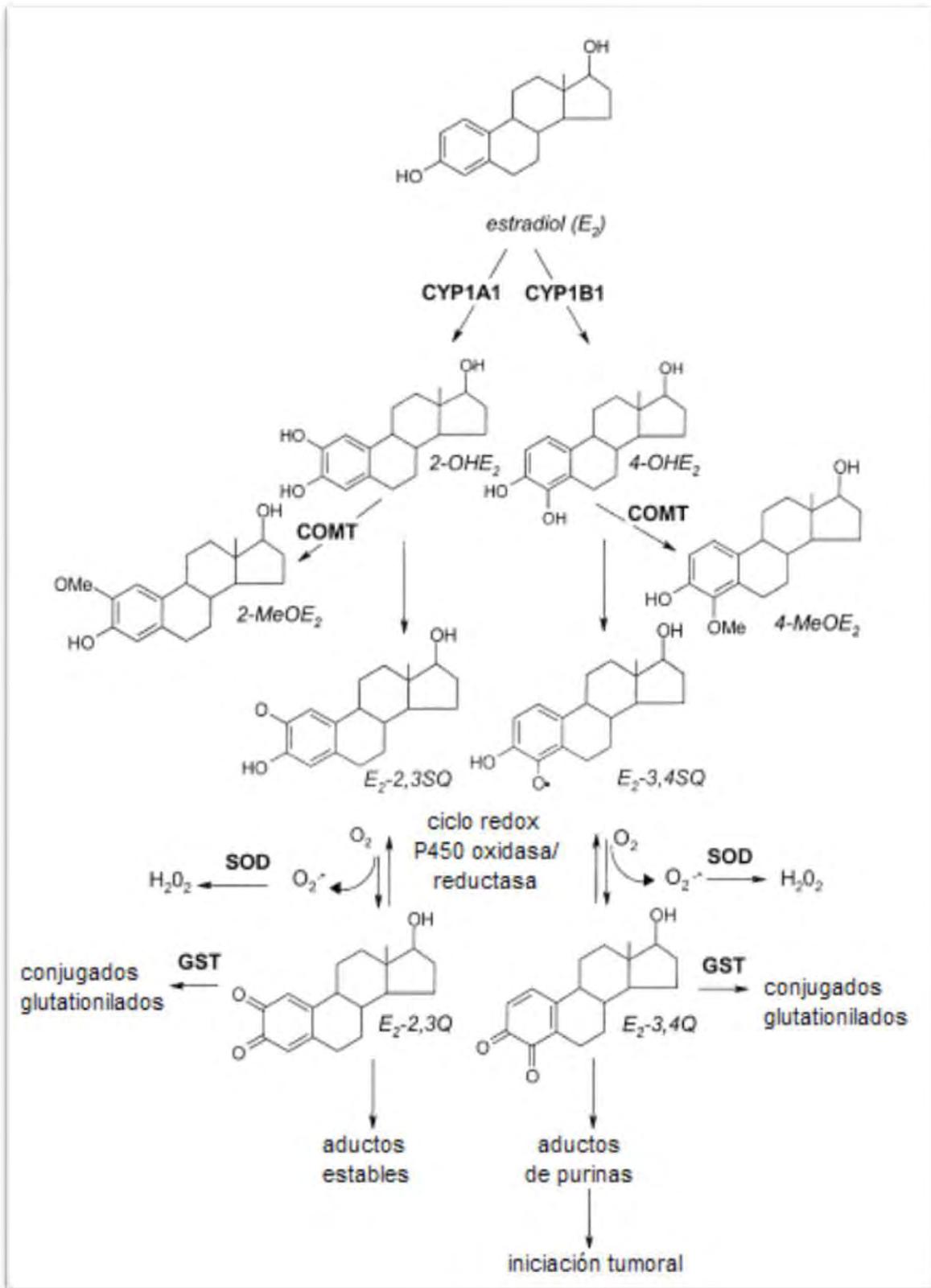


Figura 1.1 Metabolismo del estradiol (modificada de Mitrunen y Hirvonen, 2003)

Citocromos P450

Los citocromos P450 (CYPs) son una superfamilia de hemoproteínas que participan en el metabolismo oxidante de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, etc, así como en la transformación de numerosos fármacos, carcinógenos químicos, mutágenos y otros contaminantes ambientales (Petersen et al., 1991; Pérez-Morales, 2006). La nomenclatura utilizada actualmente para los CYPs está publicada en el sitio www.imm.ki.se/CYPalleles/.

Estas enzimas también llamadas enzimas de fase I introducen en los compuestos un grupo funcional polar generando moléculas más hidrosolubles, que pueden ser eliminadas del organismo con mayor facilidad; sin embargo existen otros compuestos que son transformados en compuestos más reactivos a través del metabolismo de fase I, estos intermediarios son los que, de no ser conjugados con otra molécula más hidrofílica (la cual es producida mediante el metabolismo de fase II) interactúan con el DNA para formar aductos covalentes que interfieren con la replicación y expresión del genoma (Brockmöller et al., 2000; Guengerich, 1987 en Pérez-Morales, 2006).

Los citocromos CYP1A1 y CYP1B1 se expresan constitutivamente en tejidos esteroideos tales como cerebro, útero, mama, ovario, testículo, próstata y glándula suprarrenal (Thompson y Ambrosone, 2000); y muestran una expresión elevada en una amplia variedad de cánceres humanos.

El CYP1A1 es la enzima responsable de la 2-hidroxilación del E₂ en varios tejidos extrahepáticos (Mitrunen y Hirvonen, 2003), también lleva a cabo la activación de los componentes del humo del cigarro y de otros contaminantes ambientales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*); se expresa tanto en el tejido mamario normal como en el transformado (Huang et al., 1996 en Bailey et al., 1998b).

El CYP1B1 se expresa elevadamente en cánceres de piel, cerebro, testículo (Murray et al., 1997 en Aklillu et al., 2002) ovario y mama (McKay et al., 1995 en Aklillu et al., 2002), de hecho el aumento de expresión de CYP1B1 y las altas tasas de 4-hidroxilación en el tejido transformado son marcadores de un fenotipo maligno y pueden servir de base para la selección de los medicamentos contra el cáncer que se metabolizan por esta enzima.

Polimorfismos en los citocromos P450

Los polimorfismos son variaciones en una posición o región específica en la secuencia de DNA que se presentan en al menos un 1% de la población (INMEGEN, 2010). Un polimorfismo genético se refiere a la existencia de más de un alelo para un gen en una población y frecuentemente los alelos polimórficos se expresan con diferentes fenotipos. (Pérez-Morales, 2006).

El gen CYP1A1 se localiza en el cromosoma 15q22-q24 y comprende siete exones, 6 intrones y 5,8 kilobases (Petersen et al., 1991). En este gen se han descrito varios SNP's entre los más estudiados se encuentran el CYP1A1*2C (A4889G) que produce el intercambio de aminoácidos isoleucina por valina en el codón 462 (Ile462Val) y el CYP1A1*4 (C4887A) que produce el intercambio de aminoácidos treonina por asparagina en el codón 461 (Thr461Asn); ambos polimorfismos se encuentran en el exón 7 del gen, que corresponde al sitio catalítico de la proteína. En el polimorfismo CYP1A1*2A se produce un cambio T6235C, en la región 3' no codificante y en el CYP1A1*3 se produce un cambio T5639C, también en la región 3' no codificante, ambos polimorfismos introducen un sitio de restricción para la enzima *MspI* (Mitrunen y Hirvonen, 2003; Pérez-Morales, 2006).

Se ha propuesto que el polimorfismo CYP1A1*2A incide en la inducibilidad de la enzima, ya que se encuentra vecino a secuencias conocidas como "elementos de respuesta a xenobióticos" (XRE, *Xenobiotic Response Elements*) que gobiernan la regulación (Petersen

et al., 1991; Pérez-Morales, 2006). Asimismo la variante C está asociada con un aumento de la actividad catalítica (Diergaarde et al., 2008). También se ha sugerido que este polimorfismo puede ser un marcador de una alteración en el metabolismo del estradiol, que conlleva al aumento en la susceptibilidad genética de cáncer de mama (Taioli et al. 1999 en da Fonte de Amorim et al., 2002).

En cuanto al gen CYP1B1, se localiza en el cromosoma 2p21-p22 y abarca tres exones, la región codificante comienza en el exón 2. El RNAm es de 5,2 kilobases y codifica una proteína de 543 aminoácidos. Se han reportado diferentes SNPs, de los cuales cuatro provocan sustituciones de aminoácidos; el CYP1B1*2 tiene dos polimorfismos ligados en el exón 2, 142C3G (m1) y 355G3T (m2), resultando en las sustituciones de aminoácidos Arg48Gly y Ala119Ser, respectivamente. El CYP1B1*3, 4326C→G (m3), causa un intercambio de una Leu432Val, y el CYP1B1*4 tiene 4390A3G (m4), dando lugar a una sustitución Asn453Ser (Aklillu et al., 2002).

El polimorfismo CYP1B1*3 aumenta la función de la enzima y parece tener el efecto más importante sobre el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Mitrunen y Hirvonen, 2003); el alelo Val tiene una mayor eficiencia catalítica para hidroxilar en el carbono 4 del E₂ comparada con el alelo Leu (Shimada et al., 1999; Hanna et al., 2000; Tang et al., 2000) favoreciendo la formación de 4-OHE₂ que como se menciono anteriormente tiene un papel más importante en la carcinogénesis que el 2-OHE₂.

Paracchini et al. (2005 en Kato et al., 2009) demostró que la concentración de 4-OHE₂ comparada con 2-OHE₂ fue mayor en sujetos portadores del alelo Val; por otra parte De Vivo et al. (2002) encontraron que las mujeres postmenopáusicas con al menos un alelo Leu tienen niveles plasmáticos de E₂ mayores (8.37%, P= 0.05) comparadas con las que tienen el genotipo Val/Val.

Además en pacientes caucásicas Bailey y colaboradores (1998a) reportaron que el genotipo Val/Val está asociado con un porcentaje significativamente mayor de tumores que son positivos para el RE y el RP, lo que sugiere que este polimorfismo puede ser funcionalmente importante para la expresión de estos receptores esteroides en el cáncer de mama.

Variabilidad interétnica de los polimorfismos

Existen diversas publicaciones entre las cuales se observa una gran variabilidad de resultados según las distintas poblaciones analizadas (ver Tablas 1.1 y 1.2), dicha variabilidad podría modificar el impacto de los polimorfismos en cada población.

Los estudios se han realizado principalmente en tres grupos étnicos: caucásicos, asiáticos y africanos. Siendo los dos primeros los mejor caracterizados.

La población caucásica presenta una frecuencia importante del polimorfismo CYP1B1*3 (41-43%); el polimorfismo CYP1A1*2A es menos prevalente (8-11%) respecto al resto de las poblaciones analizadas (Bailey et al., 1998a; Bailey et al., 1998b; Garte, 1998; Tang et al., 2000; De Vivo et al., 2002; Le Marchand et al., 2005).

En la población asiática se han reportado distintas frecuencias para el polimorfismo CYP1B1*3 dependiendo del lugar de origen de los individuos estudiados, 0.49 en población del norte de India (Kumar et al. 2009), 0.20 en Japón (Le Marchand et al., 2005) y 0.17 en China (Tang et al., 2000) siendo estas últimas la más bajas reportadas hasta el momento. La frecuencia del polimorfismo CYP1A1*2A en esta población es de 0.37 (Garte, 1998).

Tabla 1.1 Variación interétnica del polimorfismo CYP1A1*2A

<i>Población</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Referencia</i>
Caucásica	2,250	0.10	Garte, 1998
	328	0.08	Bailey et al., 1998b
	199	0.11	Le Marchand et al., 2005
Asiática	1,498	0.37	Garte, 1998
-Japón	249	0.36	Le Marchand et al., 2005
Africana			
Afroamericana	389	0.21	Le Marchand et al., 2005
	146	0.22	Garte, 1998
	118	0.20	Bailey et al., 1998b
Americana			
-Latina	371	0.32	Le Marchand et al., 2005
-Mexicana	382	0.49	Pérez-Morales, 2010
Hawaiana	162	0.42	Le Marchand et al., 2005

Tabla 1.2 Variación interétnica del polimorfismo CYP1B1*3

<i>Población</i>	<i>N</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Referencia</i>
Caucásica	453	0.42	De Vivo et al., 2002
	328	0.41	Bailey et al., 1998a
	199	0.43	Le Marchand et al., 2005
	189	0.43	Tang et al., 2000
Asiática			
-China	109	0.17	Tang et al., 2000
-India	168	0.49	Kumar et al. 2009
-Japón	249	0.20	Le Marchand et al., 2005
Africana			
-Afroamericana	389	0.76	Le Marchand et al., 2005
	118	0.69	Bailey et al., 1998a
	52	0.75	Tang et al., 2000
-Etiopía	150	0.53	Aklillu et al., 2002
-Nigeria	226	0.89	Okobia et al., 2009
Americana			
Latina	371	0.34	Le Marchand et al., 2005
Hawaiana	162	0.20	Le Marchand et al., 2005

La población africana presenta una alta prevalencia del polimorfismo CYP1B1*3 (0.53-0.89) y una baja frecuencia del polimorfismo CYP1A1*2A (0.20-0.22).

En población Hawaiana Le Marchand y colaboradores (2005) encontraron una frecuencia de 0.42 para el polimorfismo CYP1A1*2A y de 0.20 para el alelo Val (polimorfismo CYP1B1*3).

En cuanto a la población mexicana un estudio en individuos mestizos mexicanos reporta una frecuencia de 0.49 para el polimorfismo CYP1A1*2A (Pérez-Morales, 2010). Para el CYP1B1*3 no existen reportes.

Estudios de asociación (casos y controles)

Como se mencionó anteriormente, las variantes enzimáticas de CYP1A1 y CYP1B1 juegan un papel muy importante en el metabolismo primario de los estrógenos y se han propuesto como posibles biomarcadores de susceptibilidad genética a cáncer de mama, en estudios de asociación (casos vs controles) sin embargo, los resultados son muy heterogéneos ya sea por el tamaño de la muestra y/o debido a la frecuencia del polimorfismo en determinada población.

El polimorfismo CYP1A1*2A se ha asociado con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama principalmente en población asiática y afroamericana (Taioli et al. 1995; Huang et al., 1999a; Huang et al., 1999b; Taioli et al. 1999; Shen et al., 2006). Ambrosone et al. (1995) también encontró dicha asociación en mujeres caucásicas aunque el polimorfismo es menos prevalente en esta población. Por otro lado, Miyoshi y Noguchi (2002) y da Fonte de Amorim et al. (2002) reportan un efecto protector en mujeres japonesas y brasileñas respectivamente. No obstante, un meta-análisis realizado con datos de 17 estudios sugiere que el polimorfismo CYP1A1*2A no se encuentra asociado con el riesgo de padecer cáncer de mama (Masson et al., 2005).

En cuanto al polimorfismo CYP1B1*3 existe mucha controversia pues mientras que algunos autores encuentran asociación del alelo Val otros encuentran asociación con el alelo Leu, al parecer dependiendo de la población. En población asiática Zheng et al. (2000) reportan que el alelo Leu confiere un riesgo significativamente mayor de desarrollar cáncer de mama (Leu/Leu → OR= 2.3; IC-95%= 1.02-4.03), similar a lo encontrado por Jiao et al. (2010) (OR= 2.8; IC-95%= 1.04-7.51). Igualmente un estudio en población caucásica encontró que el genotipo heterócigo Val/Leu se asocia con un riesgo dos veces mayor de padecer cáncer de mama (OR=2.15; IC-95%=1.31–3.52), mientras que el homócigo mutante Leu/Leu confieren un riesgo tres veces mayor (OR=3.30 IC-95%=1.76–6.19) (Listgarten et al., 2004).

En población africana, Okobia et al. (2009) reportaron que el genotipo Val/Leu se asoció con un aumento significativo en el riesgo de padecer cáncer de mama (OR= 1.59; IC-95%= 1.01–2.58) en particular en mujeres premenopáusicas (OR = 2.04; IC-95%= 1.10–3.78) de Nigeria. Sin embargo Kato et al. (2009) observaron un efecto protector en mujeres afroamericanas con genotipo Leu/Leu (OR= 0.33; IC-95%= 0.14-0.78). Por otro lado en mujeres turcas Kocabaş y colaboradores (2002) encontraron un aumento del riesgo para el alelo Val (Val/Val y Val/Leu →OR= 2.32; IC-95%= 1.26 a 4.25).

Un meta-análisis realizado con datos de 13 estudios sugiere que el alelo Val aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama en poblaciones caucásicas (OR=1.5; 95%-IC= 1.1–2.1), y que existe una asociación inversa en poblaciones afroamericanas (OR= 0.8; 95%-IC= 0.7-0.9) y mestizas. No se encontró asociación entre este polimorfismo y el cáncer de mama en población asiática (Paracchini et al., 2007).

JUSTIFICACIÓN

Las poblaciones humanas no son homogéneas en términos de riesgos de enfermedades. De hecho, cada ser humano tiene un riesgo singularmente definido, basado en su constitución heredada (genética) más las características no-genéticas o medioambientales adquiridas durante su vida.

Por lo anterior resulta indispensable la identificación de variantes genéticas vinculadas con un mayor riesgo a presentar enfermedades como el cáncer de mama que en los últimos años ha aumentado de manera importante en nuestra población. Esta variación podría explicar en parte la susceptibilidad a cáncer de mama asociada con características reproductivas y con la exposición a hormonas. Además el análisis genómico del cáncer de mama puede contribuir al desarrollo de nuevas herramientas de predicción de riesgo y respuesta terapéutica, así como al desarrollo de nuevos fármacos.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar si existe asociación entre los polimorfismos CYP1A1*2A y CYP1B1 *3 y el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres mexicanas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la frecuencia del polimorfismo CYP1B1*3 en población abierta mexicana.
- Determinar la frecuencia de los polimorfismos CYP1A1*2A y CYP1B1*3 en mujeres sanas.
- Determinar la frecuencia de los polimorfismos CYP1A1*2A y CYP1B1*3 en pacientes diagnosticados con cáncer de mama primario.

HIPÓTESIS

Se espera encontrar una mayor frecuencia de los polimorfismos CYP1A1*2A y CYP1B1*3 en mujeres mexicanas con cáncer de mama primario que en mujeres mexicanas sanas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Mujeres sanas

Las muestras sanguíneas pertenecientes a los controles corresponden a mujeres mexicanas no relacionadas y fueron colectadas en el período de Noviembre de 2008 a Febrero de 2010. Cada donadora firmó una carta de consentimiento informado, aprobada por el comité de bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Anexo I), y contestó un cuestionario (Anexo II) estructurado para obtener información sobre características demográficas y reproductivas, así como de antecedentes familiares de cáncer de mama y otros factores relacionados con el estilo de vida considerados como de riesgo para esta enfermedad.

Pacientes con cáncer de mama primario

Para la obtención de muestras sanguíneas de pacientes con cáncer de mama primario se estableció una colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), bajo la supervisión de la Dra. Alma Magdalena Astorga Ramos. Las donadoras que voluntariamente aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado aprobada por el comité de bioética del INCAN (Anexo III). La información relativa a los factores de riesgo se obtuvo a partir de sus expedientes clínicos.

❖ **Criterios de inclusión**

- Mujeres
- Mexicanas (con padres y abuelos mexicanos)
- Sanas para los controles, y con diagnóstico de cáncer de mama primario para los casos.
- Mayores de 25 años
- No relacionadas

❖ Criterios de exclusión

- Hombres
- Extranjeras
- Pacientes con cáncer de mama secundario
- Menores de 25 años
- Relacionadas

*En este estudio se consideró como mexicanas, a mujeres nacidas en México, con padres y abuelos también nacidos en México. Y se consideró como sanas, a aquellas mujeres sin diagnóstico de cáncer de mama primario al momento de la toma de muestra.

Población abierta

En lo que respecta a la población abierta se emplearon muestras del banco de DNA de la Dra. Julieta Rubio correspondientes a individuos mexicanos no relacionados que donaron sangre al banco de sangre del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE de la Ciudad de México, en el periodo de Octubre del 2001 a Noviembre del 2004, que respondieron un cuestionario acerca de su lugar de nacimiento, así como el de sus padres y abuelos, edad, género, factores de exposición, etc.

Estimación del tamaño de la muestra (población abierta, casos y controles)

Se realizó un estudio piloto con una muestra de 100 individuos población mexicana abierta para obtener las frecuencias alélicas del polimorfismo CYP1B1*3, y así estimar el tamaño de muestra necesario que permita obtener resultados confiables estadísticamente significativos, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2}$$

Donde:

$Z^2 \alpha = 1.96$ (95% confianza)

$d^2 = 0.05$ error estándar

p y q = depende del gen y de la variabilidad en la población analizada

Estimación del número de individuos necesarios para obtener la frecuencia del polimorfismo CYP1B1*3 en población mexicana: $n = (1.96)^2(.54)(.46) / (0.05)^2 = 382$

Para el polimorfismo CYP1A1*2A se tomaron las frecuencias de un estudio previo en población mexicana sana (Pérez-Morales, 2010).

El tamaño de muestra necesario para el estudio de asociación (casos y controles) se estimó con la siguiente fórmula:

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

Donde: $p = \frac{p_1 + p_2}{2}$; $p_1 = \frac{w p_2}{(1-p_2) + w p_2}$ $z_{1-\alpha/2} = 1.96$ y $z_{1-\beta} = 0.84$

w es una idea del valor aproximado del OR que se desea estimar

p_1 es la frecuencia de la exposición entre los casos

p_2 la frecuencia de la exposición entre los controles

Estimación del número de individuos necesarios por grupo (casos y controles) para detectar una asociación entre el polimorfismo CYP1A1*2A y el riesgo de padecer cáncer de mama (OR= 2) en mujeres mexicanas:

$$n = \left[(1.96 \sqrt{2(0.575)(1-0.575)} + 0.84 \sqrt{0.66(1-0.66) + 0.49(1-0.49)}) / (0.66-0.49) \right]^2 = 132 \text{ individuos}$$

Estimación del número de individuos necesarios por grupo (casos y controles) para detectar una asociación entre el polimorfismo CYP1B1*3 y el riesgo de padecer cáncer de mama (OR= 2) en mujeres mexicanas:

$$n = \left[(1.96 \sqrt{2(0.39)(1-0.39)} + 0.84 \sqrt{0.47(1-0.47) + 0.31(1-0.31)}) / (0.47-0.31) \right]^2 = 144 \text{ individuos}$$

Purificación del DNA

A partir de una muestra de sangre total de 2mL o más, con EDTA como anticoagulante, se purificó el DNA por el método reportado por Lahiri y Nurnberger (1991).

Análisis genotípico de CYP1A1*2A

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: 5'TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT 3' y 5'CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT 3'.

Para la reacción de PCR se utilizaron 50ng de DNA genómico, 0.2mM de dntp's, 20 pM de cada oligonucleótido, 1 µL de buffer 10X, 1.5mM de MgCl₂, 1U de Taq Polimerasa Recombinante y H₂O MQ para completar un volumen de 10µL. La amplificación fue realizada en un termociclador Rapid Cycler de Idaho Technology, y las condiciones fueron las siguientes:

Tabla 2.1 Condiciones para la amplificación de CYP1A1*2A

<i>No. ciclos</i>	<i>Etapa</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
1	Desnaturalización	5 min	94° C
35	Desnaturalización	30 seg	94° C
	Alineamiento	30 seg	55° C
	Extensión	30seg	72° C
1	Extensión Final	5 min	72° C

El producto del PCR, el cual corresponde a un fragmento de 350 pb, fue digerido con la enzima de restricción *MspI*, esta enzima reconoce el sitio 5'...CCGG...3' que se pierde en el gen CYP1A1 por la transición T → C en la posición 6235.

Las condiciones de restricción utilizadas fueron las siguientes: 1µL de buffer 2 10x, 0.1µL de *MspI* (20 unidades), 2µL de producto de PCR y 6.9µL de agua. Se digiere a 37°C toda la noche y se corre en gel de agarosa al 2%.

Los alelos se determinaron de la siguiente manera: dos fragmentos de 250 y 150pb para el alelo C (CTG), y un fragmento de 350pb para el alelo T (GTG). Los genotipos se muestran en la Figura 2 (Líneas 8 y 9 corresponden al wild type (TT), las líneas 3, 4, 6 y 7 al heterócigo (TC) y las líneas 1, 2 y 5 al homócigo mutante (CC)).

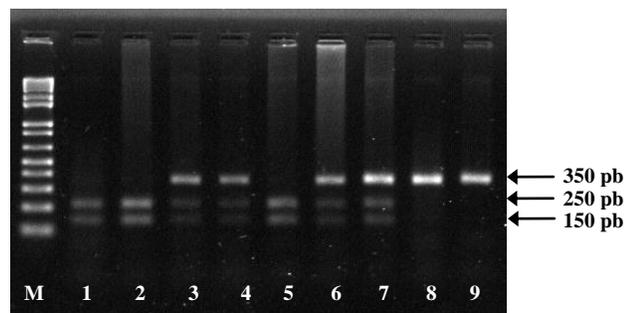


Figura 2.1 Análisis de RFLP's para CYP1A1*2A.

Análisis genotípico de CYP1B1*3

Los genotipos se determinaron mediante PCR-RFLP; los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'- TCACTTGCTTTTCTCTCTCC - 3' (forward); 5'-AATTCAGCTTGCCTCTTG - 3' (reversa) reportados por Zheng et al. (2000).

Para la reacción de PCR se utilizaron 50ng de DNA genómico, 0.2mM de dntp's, 20 pM de cada oligonucleótido, 1 µL de buffer 10X, 1.5mM de MgCl₂, 1U de Taq Polimerasa Recombinante y H₂O MQ para completar un volumen de 10µL. La amplificación fue

realizada en un termociclador Rapid Cycler de Idaho Technology, y las condiciones fueron las siguientes:

Tabla 2.2 Condiciones para la amplificación de CYP1B1*3

<i>No. ciclos</i>	<i>Etapa</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
1	Desnaturalización	5 min	94° C
40	Desnaturalización	40 seg	94° C
	Alineamiento	40 seg	59° C
	Extensión	40seg	72° C
1	Extensión Final	5 min	72° C

El producto de PCR corresponde a un fragmento de 650 pb, y se visualizó en gel de agarosa al 1%, por tinción de bromuro de etidio 10mg/mL en el buffer TBE 0.5X.

Para identificar el polimorfismo *3 se utilizó la enzima de restricción *Eco57I*, esta enzima reconoce el sitio 5'...C T G A A G...3' que se pierde en el gen CYP1B1 por la transversión C→G en la posición 4326 del exón 3.

Las condiciones de restricción utilizadas fueron las siguientes: 0.6µL de buffer G 10x, 0.2µL SAM, 0.6µL de *Eco 57I*, 3.1 µL de producto de PCR y 5.5µL de agua. Se digiere a 37°C toda la noche, y se corre en gel de agarosa al 2%.

Los alelos se determinaron de la siguiente manera: dos fragmentos de 310 y 340pb para el alelo Leu (CTG), y un fragmento de 650pb para el alelo Val (GTG). En la Figura 2 se observan los diferentes genotipos (Líneas 1, 3 y 4 corresponden al wild type (Leu/Leu), las líneas 2, 6 y 7 al heterócigo (Leu/Val) y la línea 5 al homócigo mutante (Val/Val)).

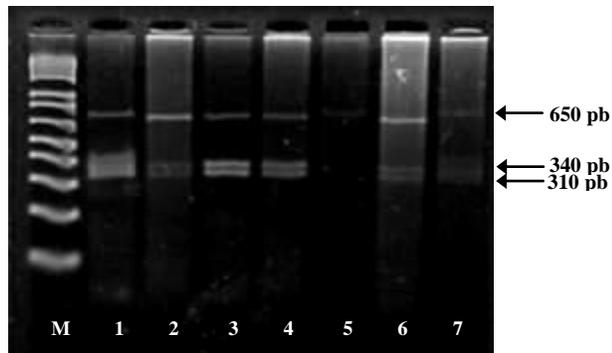


Figura 2.2 Análisis de RFLP's para CYP1B1*3.

Obtención de frecuencias genotípicas y alélicas

Para obtener las frecuencias genotípicas y alélicas de ambos genes, se utilizaron las siguientes fórmulas:

Frecuencias genotípicas

$$P = N_{AA} * 100 / N \text{ total}$$

$$H = N_{Aa} * 100 / N \text{ total}$$

$$Q = N_{aa} * 100 / N \text{ total}$$

Frecuencias alélicas

$$\text{Alelo A} = 2P + 1/2H / \text{total alelos}$$

$$\text{Alelo a} = 1 - P$$

Análisis estadísticos

Para determinar si el gen CYP1B1 se encontraba bajo el Equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el programa Genepop 4.0.10.

A partir de tablas de contingencia de 2x2 se calcularon OR's (Odds ratio/razón de momios) para medir la fuerza de la asociación entre los genotipos y el riesgo de cáncer; los

intervalos de confianza (IC) fueron del 95%. Se aplicó la prueba exacta de Fisher para determinar la significancia estadística.

Se realizaron análisis estratificados para analizar el posible efecto de otros factores de riesgo.

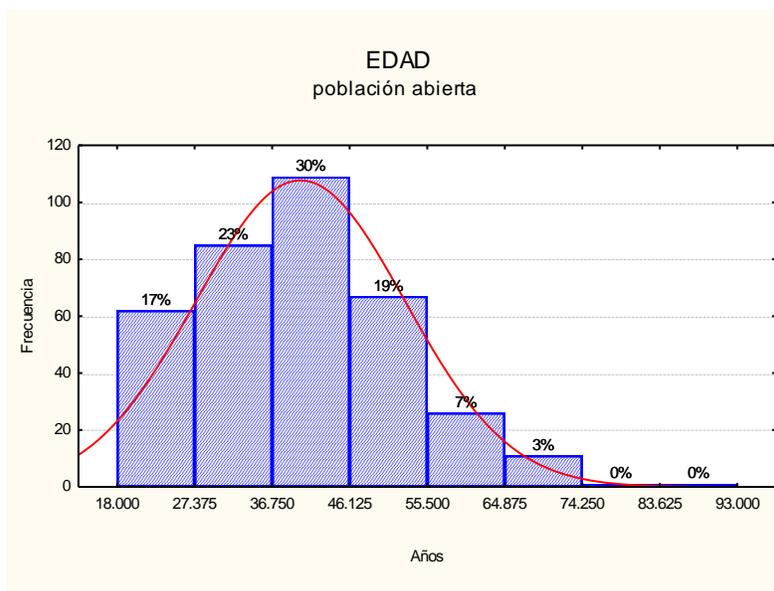
Las pruebas estadísticas se realizaron en los programas GraphPad Prism 5 y STATA versión 10. También se utilizó el programa no paramétrico *Multifactor-Dimensionality Reduction* (MDR) para evaluar la interacción de ambos polimorfismos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población abierta

Características de la población analizada

Se analizaron 382 individuos mexicanos en un rango de edad de 18 a 93 años, la mayoría se distribuye entre los 37 y los 46 años (Gráfica 3.1). El 43.6% corresponde a mujeres y el 56.4% a hombres.



Gráfica 3.1. Categorías de edad en la población abierta

De acuerdo con el origen de los individuos incluidos en este estudio hay una mayor representación de la zona centro-sur del país, principalmente del Distrito Federal y del estado de México, seguido por los estados de Michoacán, Veracruz, Puebla, Guerrero, Jalisco, Guanajuato, Oaxaca e Hidalgo.

Es necesario considerar el linaje del grupo étnico al que pertenece la muestra, pues existen fluctuaciones en las frecuencias de los polimorfismos en una misma población, dependiendo del lugar de origen de los individuos, ya que la exposición ambiental y la susceptibilidad genética es distinta en cada población (Pérez-Morales, 2006; Silva-Zolezzi et al., 2009), esto último debido a los antecedentes propios de cada población, es decir, a

las diferentes historias de mezclas entre nativos americanos con europeos, asiáticos, africanos, etc. y a la dinámica particular de cada población.

Por ejemplo, en los estados del norte del país como Jalisco y Nuevo León, la mezcla se llevó a cabo entre indígenas mexicanas con europeos principalmente, mientras que en estados como Veracruz y Guerrero la mezcla predominante fue con esclavos africanos (Buentello et al, 2003 en Pérez-Morales, 2006). Estas evidencias de diferencias genéticas entre las subpoblaciones mexicanas deben ser consideradas en el diseño y análisis de estudios de asociación de enfermedades complejas, como lo es el cáncer.

Algunos autores han utilizado las variaciones en las frecuencias de los tipos sanguíneos ABO como un indicador de poblaciones mezcladas (Lisker, 1981). En este sentido, Pérez-Morales (2006) analizó la frecuencia del sistema sanguíneo (ABO) en una muestra de población sana (que incluye a los 382 individuos analizados en este estudio) y encontró que ésta correspondía a la población mestiza mexicana reportada por Lisker, 1981. De acuerdo con el análisis anterior y tomando en cuenta que los individuos incluidos en este estudio son mexicanos, al menos por tres generaciones, es probable que la muestra aquí analizada también corresponda a dicha población.

Frecuencias del polimorfismo CYP1B1*3 en población mexicana

Se genotipificó la muestra de población abierta como se describe en materiales y métodos y se obtuvieron las siguientes frecuencias genotípicas: Leu/Leu (0.53), Leu/Val (0.31) y Val/Val (0.16). Las frecuencias alélicas fueron: Leu (0.69) y Val (0.31). Estas se encontraron bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg.

El equilibrio de Hardy-Weinberg enuncia que en una población ideal (diploide, de grandes proporciones, con reproducción sexual y de apareamiento aleatorio), las frecuencias alélicas no cambian en el tiempo y se comportan de acuerdo con la siguiente regla matemática: $p^2+2pq+q^2$. En las poblaciones humanas frecuentemente se cumplen los

supuestos, sin embargo hay algunas excepciones que se dan cuando las poblaciones son aisladas (endogamia), cuando los alelos están sujetos a selección o cuando existen errores en las estimaciones estadísticas de la muestra (Pérez-Morales, 2006). Debido a lo anterior se puede considerar que las frecuencias no han cambiado por algún tiempo y es probable que las diferencias entre los grupos étnicos se deban a la mezcla entre ellos.

La frecuencia del polimorfismo CYP1B1*3 encontrada en población mexicana (0.31) es similar a la reportada en población Latina (0.34) de Estados Unidos, lo cual es lógico si se considera que cerca del 60% del total de la población Latina de este país es de ascendencia mexicana. Por otra parte, dicha frecuencia es algo menor que en población caucásica (0.41-0.43), etíope (0.43) e india (0.49), pero mayor que en población japonesa (0.20), hawaiana (0.20) y china (0.17). La frecuencia del polimorfismo es más alta en afroamericanas (0.69-0.76).

Dada la composición étnica de la población mexicana no resulta raro que este polimorfismo se presente con una frecuencia intermedia entre las reportadas para poblaciones asiática y caucásica, lo anterior de acuerdo con la mezcla entre estos grupos dadas las migraciones históricas que se han documentado en el continente americano; en primer lugar la migración asiática por el estrecho de Behring y posteriormente a la migración europea debida a la conquista del continente americano en el siglo XVI (Garte, 1998; Pérez-Morales, 2006).

Si se compara la frecuencia de este polimorfismo en las diversas poblaciones analizadas, con la tasa de incidencia del cáncer de mama en las mismas, se puede observar que, en general, las poblaciones con una baja frecuencia del polimorfismo (China y Japón) tienen las menores tasas de incidencia y viceversa (excepto en afroamericanas). Esto concuerda con un meta-análisis basado en 13 estudios (Paracchini et al., 2007), cuyos resultados indican que no hay una asociación del polimorfismo CYP1B1*3 con el riesgo de padecer

esta enfermedad en población asiática, pero sí en poblaciones caucásicas; Y que hay una asociación inversa en poblaciones afroamericanas.

Casos y controles

Características de la población analizada

El tamaño de muestra estimado para el estudio de asociación de los polimorfismos CYP1A1*2A y CYP1B1*3 con el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres mexicanas fue de 132 y 144 respectivamente, sin embargo, este número no fue alcanzado debido principalmente a la disponibilidad de muestras sanguíneas de pacientes con cáncer de mama primario, y en segundo lugar, a que algunas de las muestras colectadas se descartaron ya que el expediente respectivo no contaba con la información necesaria, o bien, a que el DNA aislado no amplificó.

En este estudio se incluyeron 86 mujeres con cáncer de mama primario pareadas por edad con 86 mujeres sanas. La edad media fue de 47.44 ± 10.22 años (rango 28-81) y 47.58 ± 10.77 años (rango 27-83) respectivamente.

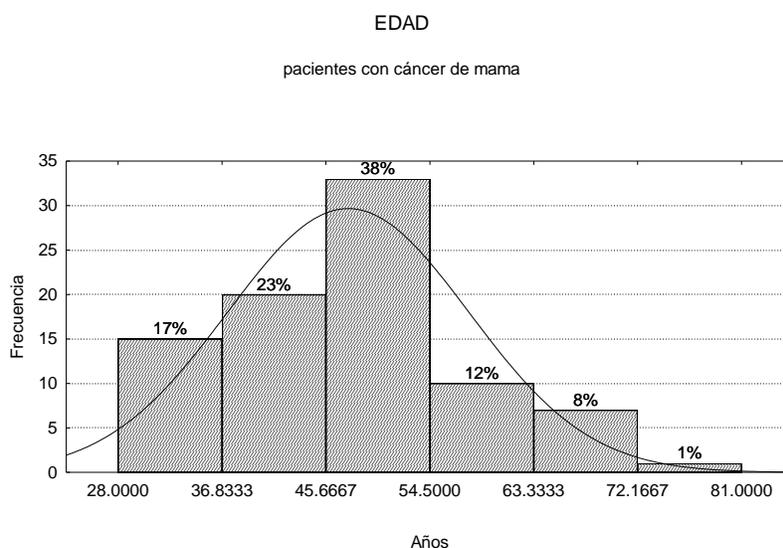
En el 59% de las mujeres con cáncer de mama, éste se presenta antes de los 50 años, siendo el grupo de edad más afectado el de los 46-55 años con una frecuencia de 38%, seguido por el grupo de 37 a 45 años (Gráfica 3.2). El 53.5% de los casos corresponde a mujeres premenopáusicas.

Lo anterior es similar a lo reportado por Rodríguez-Cuevas y colaboradores (2001) en mujeres mexicanas y contrasta con lo observado en mujeres de los Estados Unidos, donde la edad media a la que se presenta esta neoplasia es de 63 años, así como en mujeres de países europeos, donde sólo una cuarta parte de las pacientes son menores de 50 años, y tres cuartas partes son postmenopáusicas.

De acuerdo con la literatura el cáncer de mama familiar se presenta 10 años antes que el cáncer de mama esporádico, y aproximadamente el 60% de estas mujeres son premenopáusicas, sin embargo en este estudio sólo el 9% de las pacientes tiene antecedentes familiares de esta neoplasia (Tabla 3.1).

Aunado a lo anterior hay evidencia de que la edad de la menopausia es un rasgo étnico, lo que implica la influencia de diversos factores genéticos y ambientales. Se ha observado que las mujeres afroamericanas y latinas experimentan una menopausia más temprana que las mujeres caucásicas (Gold et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente, los factores de riesgo para el cáncer de mama difieren entre mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas. Del mismo modo, algunas características como la presencia de receptores hormonales positivos en células tumorales, son más frecuentes en mujeres postmenopáusicas que en mujeres premenopáusicas. Esto resulta un factor pronóstico particularmente importante para determinar el tratamiento de la enfermedad.



Gráfica 3.2. Categorías de edad en pacientes con cáncer de mama

En la Tabla 3.1 se compara la distribución de casos y controles según determinadas características consideradas como factores de riesgo; se observan diferencias entre ambos grupos en lo que respecta al consumo de anticonceptivos y alcohol.

Debido a que el cáncer de mama se atribuye principalmente a la acción de los estrógenos es muy importante tomar en cuenta este factor. Cabe resaltar que mientras que en los controles el 45% corresponde a mujeres que han tomado anticonceptivos hormonales sólo el 28% de los casos menciona haberlos tomado. Esto puede deberse a un nivel socioeconómico mayor entre los controles, pues se ha visto que éste influye en el estilo de vida cambiando patrones reproductivos e incrementando el uso de anticonceptivos, o bien, a que la susceptibilidad genética individual juega un papel importante en el desarrollo del cáncer, esto se pone de manifiesto en un mayor porcentaje (72%) de mujeres que no consumen anticonceptivos y que sin embargo desarrollan cáncer de mama.

En cuanto al consumo de alcohol cabe mencionar que aunque el 43% de los controles acepta tomar alcohol ocasionalmente, en comparación con el 4% de los casos, se considera que sólo el consumo diario (1 a 2 copas) aumenta modestamente el riesgo de padecer cáncer de mama (Hulka y Moorman, 2001), por lo que las diferencias de este estudio, debidas a un consumo ocasional (1 vez al mes, sólo en eventos sociales) resultan irrelevantes.

Tabla 3.1. Distribución de factores de riesgo entre casos y controles

	Casos n (%)	Controles n (%)	P
Edad			
<40	21 (24.42)	21 (24.42)	0.978
40-55	50 (58.14)	51 (59.30)	
>55	15 (17.44)	14 (16.28)	
IMC			
< ó =25	32 (37.21)	28 (32.56)	0.145
26-30	30 (34.88)	42 (48.84)	
>30	24 (27.91)	16 (18.60)	
Menarca			
<12	18 (20.93)	17 (19.77)	0.182
12-14	52 (60.47)	61 (70.93)	
>14	16 (18.60)	8 (9.30)	
Estado menopáusico			
Premenopáusicas	46 (53.49)	53 (61.63)	0.280
Posmenopáusicas	40 (46.51)	33 (38.37)	
Edad de la menopausia			
<45 años	9 (10.47)	9 (10.47)	0.284
45-55 años	28 (32.56)	24 (27.91)	
>55 años	3 (3.49)	0 (0.00)	
Paridad			
> 5 hijos	4 (4.65)	6 (6.98)	0.722
1-5 hijos	62 (72.09)	62 (72.09)	
nulípara	19 (22.09)	18 (20.93)	
Edad al 1er Embarazo			
<20 años	17 (19.77)	14 (16.28)	0.752
20-30 años	43 (50.00)	43 (50.00)	
>30 años	7 (8.4)	11 (12.79)	
Anticonceptivos			
Nunca	62 (72.09)	47 (54.65)	0.059
<5años	17 (19.77)	27 (31.40)	
>5años	7 (8.14)	12 (13.95)	
THR			
No	83 (96.51)	77 (89.53)	0.1317
Si	3 (3.49)	9 (10.47)	
Historia familiar de CaMa			
Sin antecedentes	78 (90.70)	73 (84.88)	0.230
Parientes 2º grado	2 (2.33)	7 (8.14)	
Parientes 1er grado	6 (6.98)	6 (6.98)	
Alcohol			
Nunca	82 (95.35)	39 (45.35)	0.000
Ocasional	3 (3.49)	37 (43.02)	
Frecuente	1 (1.16)	10 (11.63)	
Tabaquismo			
Nunca	76 (88.37)	71 (82.56)	0.295
Ocasional	3 (3.49)	8 (9.30)	
Frecuente	7 (8.14)	7 (8.14)	

* Fisher's exact test

Frecuencias de los polimorfismos

Se identificaron los genotipos para ambos grupos y los resultados obtenidos fueron los siguientes: 30% de los casos presenta los genotipos de riesgo CC (CYP1A1*2A) y el 12% el Val/Val (CYP1B1*3) y alrededor del 35% son heterocigos (Tablas 3.2 y 3.3).

Aunque un porcentaje mayor (30%) de los pacientes son homocigos mutantes (CC) para el polimorfismo CYP1A1*2A comparado con los controles (20%), y pareciera haber un ligero incremento en el riesgo debido a este genotipo (Tabla 3.2), el análisis estadístico no permite encontrar ninguna asociación significativa entre este polimorfismo y el riesgo de padecer cáncer de mama.

Tabla 3.2. Asociación de CYP1A1*2A con el riesgo de padecer cáncer de mama

Genotipo CYP1A1*2A	Casos (n=86)	Controles (n=86)	OR (IC 95%)	P
Todas las mujeres				
TT	31 (36.05)	32 (37.21)	1	
TC	29 (33.72)	37 (43.02)	0.81 (0.405-1.62)	0.5986
CC	26 (30.23)	17 (19.77)	1.58 (0.719-3.47)	0.3219
Mujeres premenopáusicas				
TT	19 (46.34)	19 (35.85)	1	
TC	15 (36.59)	24 (45.28)	0.63 (0.253-1.55)	0.3626
CC	7 (17.07)	10 (18.87)	0.70 (0.220-2.23)	0.5742
Mujeres postmenopáusicas				
TT	12 (26.67)	13 (39.39)	1	
TC	14 (31.11)	13 (39.39)	1.17 (0.393-3.47)	1.0000
CC	19 (42.22)	7 (21.22)	2.94 (0.913-9.47)	0.0889

Sin embargo el estatus menopáusico parece modificar dicha asociación, pues cuando se estratifica en mujeres pre y postmenopáusicas, se observa un claro aumento del riesgo debido al polimorfismo CYP1A1*2A (genotipo CC) en mujeres postmenopáusicas (OR: 2.94; IC 95%: 0.913-9.47; $P= 0.0889$), este es marginalmente significativo, lo que sugiere que de aumentarse el tamaño de muestra muy probablemente se encuentren diferencias significativas.

Lo anterior concuerda con lo encontrado por Huang et al. (1999b) y Shen et al. (2006) quienes encontraron un OR de 2.97 (IC 95%: 1.03-8.72) y de 2.22 (IC 95%: 1.26-3.85) en mujeres chinas postmenopáusicas y mayores de 45 años respectivamente. Esto puede deberse al efecto acumulativo de la exposición a distintos factores ambientales que hacen que el avance de la edad sea un factor de riesgo importante para presentar cualquier tipo de cáncer.

En cuanto al polimorfismo CYP1B1*3 este parece tener un efecto protector, particularmente en mujeres postmenopáusicas (OR: 0.41; IC 95%: 0.156-1.09; $P=0.0911$) portadoras del genotipo Leu/Val (Tabla 3.3). Esto difiere de lo reportado en la literatura para las distintas poblaciones analizadas. No obstante, hay que recordar que el tamaño de muestra quedó por debajo del tamaño mínimo necesario para detectar una asociación significativa entre el polimorfismo y el riesgo de padecer cáncer de mama.

Tabla 3.3. Asociación de CYP1B1*3 con el riesgo de padecer cáncer de mama

Genotipo CYP1B1*3	Casos (n=86)	Controles (n=86)	OR (IC 95%)	P
Todas las mujeres				
<i>Leu/Leu</i>	45 (52.33)	37 (43.02)	1	
<i>Leu/Val</i>	31 (36.05)	35 (40.70)	0.73 (0.380-1.40)	0.4086
<i>Val/Val</i>	10 (11.63)	14 (16.28)	0.59 (0.234-1.48)	0.3532
Mujeres premenopáusicas				
<i>Leu/Leu</i>	19 (46.34)	24 (45.28)	1	
<i>Leu/Val</i>	17 (41.46)	18 (33.96)	1.19 (0.487-2.92)	0.8200
<i>Val/Val</i>	5 (12.20)	11 (20.76)	0.57 (0.170-1.94)	0.5520
Mujeres postmenopáusicas				
<i>Leu/Leu</i>	26 (57.78)	13 (39.39)	1	
<i>Leu/Val</i>	14 (31.11)	17 (51.52)	0.41 (0.156-1.09)	0.0911
<i>Val/Val</i>	5 (11.11)	3 (9.09)	0.83 (0.172-4.04)	1.0000

Cuando se evalúa el efecto aditivo de ambos polimorfismos sobre el riesgo de padecer cáncer de mama (Tabla 3.4) se pone de manifiesto que las combinaciones genotípicas cobran importancia, pues en el caso de la combinación de ambos homocigos mutantes

(CC+ Val/Val), ésta muestra un OR (1.41) ligeramente menor al encontrado para el homócigo CC (OR=1.58) del polimorfismo CYP1A1*2A.

Tabla 3.4 Efecto combinado de los genotipos de CYP1A1*2A y CYP1B1*3

	Casos (%)	Controles (%)	OR (IC 95%)	P
TT+ Leu/Leu	17 (19.77)	16 (18.60)	1	
Combinaciones*	66 (76.74)	68 (79.07)	0.91 (0.426-1.96)	0.8480
CC+ Val/Val	3 (3.49)	2 (2.33)	1.41 (0.208-9.59)	1.0000

* con 1 a 3 alelos de riesgo

Lo anterior se hace más evidente en la figura 3.3, ésta se obtuvo utilizando el modelo no paramétrico MDR que no asume un modelo aditivo de riesgo, es decir, no asigna valores de riesgo de acuerdo con el genotipo, sino que compara los valores observados en casos (barras de la izquierda) y en controles (barras de la derecha) y muestra su distribución en celdas de acuerdo con la combinación de genotipos (0=wild type; 1=heterócigo; 2= homócigo mutante). Los patrones de las celdas de alto y bajo riesgo difieren en cada una de las diferentes dimensiones multilocus, lo cual es una evidencia de epistasis (interacción gen-gen).

Particularmente se puede observar que la combinación de los heterócigos de ambos polimorfismos resulta en un bajo riesgo de padecer cáncer de mama. En la fila 2 del CYP1A1 todas las celdas son de alto riesgo, de manera análoga a lo que ocurre en la columna 0 del CYP1B, esto último sugiere que en nuestra población el alelo de riesgo (polimorfismo CYP1B1*3) es el silvestre (Leu) y no el homócigo mutante (Val), esto se asemeja a un par de estudios en población china (Zheng et al.,2000; Jiao et al., 2010) y a uno en población caucásica (Listgarten et al., 2004), sin embargo el tamaño de muestra de este estudio no permite encontrar ninguna asociación significativa, por lo que estas interpretaciones deben tomarse con reserva.

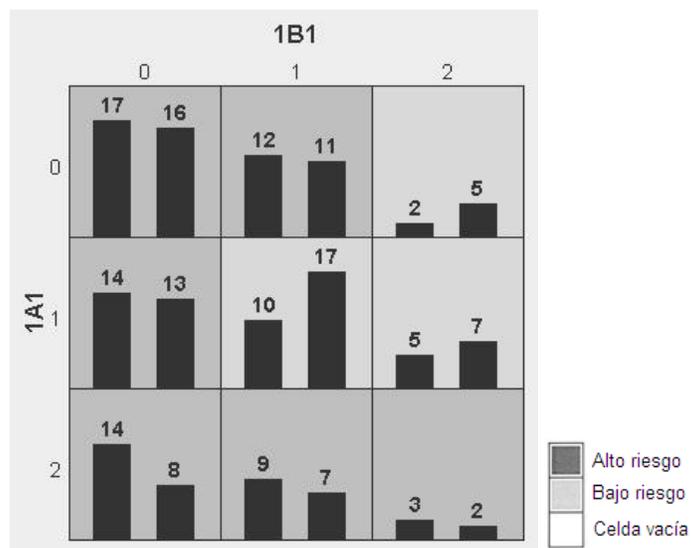


Figura 3.3 Combinaciones genotípicas asociadas con un riesgo alto o bajo de cáncer de mama esporádico. Distribución de los casos (barras de la izquierda) y de los controles (barras de la derecha) por celda, para cada combinación genotípica (0=wild type; 1=heterócigo; 2= Homócigo mutante).



Figura 3.4 Interacción gráfica entre los polimorfismo CY1A1*2A y CYP1B1*3

Por otro lado, el color azul del dendrograma de la figura 3.4 muestra redundancia entre ambas variantes polimórficas. Es normal que haya superposición parcial de funciones (redundancia) entre miembros de una familia tan importante como la de los CYPs, que opera sobre una compleja variedad de moléculas endógenas (esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, etc) y exógenas (fármacos, carcinógenos químicos, mutágenos y contaminantes ambientales).

En la mayoría de las especies de mamíferos, la hidroxilación aromática del E₂ se produce principalmente en el carbono 2 por acción del CYP1A1 y en menor medida en el carbono 4, tanto por la acción del CYP1B1 como por la del CYP1A1. Esta falta de especificidad del CYP1A1, y probablemente de otros CYPs, permite una alternancia en las vías metabólicas de los estrógenos, impidiendo que su metabolismo quede truncado.

También se analizó el estatus del RE en las pacientes con cáncer de mama para determinar si se relacionaba con el genotipo y/o con el estado menopáusico (Tablas 3.5 y 3.6). No se encontró ninguna correlación.

Tabla 3.5. Análisis de genotipos y el estatus del RE en pacientes mexicanas con cáncer de mama

Genotipo	RE + (n=39)	RE – (n=41)	P
<i>CYP1A1*2A</i>			
TT	13 (33.3%)	17 (41.5%)	0.4952
TC y CC	26 (66.7%)	24 (58.5%)	
<i>CYP1B1*3</i>			
Leu/Leu	17 (43.6%)	24 (58.5%)	0.2632
Leu/Val; Val/Val	22 (56.4%)	17 (41.5%)	

Tabla 3.6. Estado menopáusico y estatus del RE en pacientes mexicanas con cáncer de mama

Estado menopáusico	RE + (n=39)	RE – (n=43)	P
Premenopáusicas	16 (41.03%)	23 (58.97%)	0.2778
Postmenopáusicas	23 (53.49%)	20 (46.51%)	

En la mayoría de los casos de cáncer de mama que se presentan en mujeres premenopáusicas, éstas son negativas para el RE, lo contrario ocurre en las pacientes posmenopáusicas, que son en su mayoría positivas para el RE. Como se discutió

anteriormente, la presencia de receptores hormonales positivos en células tumorales, ocurre diferencialmente entre las mujeres pre y postmenopáusicas y da como resultado diferentes características de la enfermedad.

Finalmente, algunas limitaciones de este estudio deben tenerse en cuenta al interpretar los resultados. En primer lugar, el tamaño de la muestra de este estudio fue relativamente pequeño, lo que impide que algunos efectos observados de los polimorfismos genéticos alcancen significancia estadística, y en segundo lugar la confiabilidad de algunas variantes empleadas es dudosa.

IV. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, la frecuencia del polimorfismo CYP1B1*3 en población abierta fue de 0.31. Esta frecuencia es similar a la reportada en población Latina, e intermedia entre las reportadas para poblaciones asiática y caucásica.

El tamaño de muestra resulta insuficiente para realizar alguna asociación entre los polimorfismos de riesgo con la susceptibilidad a padecer cáncer de mama, sin embargo el polimorfismo CYP1A1*2A se asocia con un aumento marginalmente significativo del riesgo de padecer cáncer de mama, particularmente en mujeres postmenopáusicas con el genotipo CC lo que sugiere que este polimorfismo puede jugar un papel importante en la etiología del cáncer de mama en nuestra población. Contrariamente el polimorfismo CYP1B1*3 parece tener un efecto protector particularmente en mujeres postmenopáusicas portadoras del genotipo Leu/Val.

V. PERSPECTIVAS

Debido a que las enfermedades que involucran la interacción genotipo-medio ambiente han incrementado su incidencia en los últimos años y a que los factores determinantes en el desarrollo de la enfermedad son: la exposición, el estilo de vida y la carga genética, resulta importante la identificación de variantes genéticas vinculadas con un mayor riesgo a presentar este tipo de enfermedades. Tal es el caso de las variantes enzimáticas CYP1A*2A y CYP1B1*3 que juegan un papel muy importante en el metabolismo primario de los estrógenos y se han propuesto como posibles biomarcadores de susceptibilidad genética a cáncer de mama.

Esta investigación pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios que incluyan un mayor número de pacientes y de otros marcadores en el desarrollo de la enfermedad, como pueden ser genes que participan en la desintoxicación de los metabolitos carcinogénicos del metabolismo de los estrógenos como la catecol *O*-metiltransferasa (COMT) y las glutatión *S*-transferasas (GSTs). Además sería importante evaluar genes de la síntesis de estrógenos, particularmente la aromatasa (CYP19).

El análisis genómico del cáncer de mama puede contribuir al desarrollo de nuevas herramientas de predicción de riesgo y respuesta terapéutica, así como al desarrollo de nuevos fármacos.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MEXICO, D. F.

DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN
Investigador Asociado "C"
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Estimada Dra. Rubio:

La Comisión de Bioética para Investigaciones en Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas revisó el proyecto de investigación "GENES DE LA VÍA CATECOL INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO DEL ESTRADIOL Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA INICIACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA" que nos ha enviado para su evaluación. De acuerdo a nuestro Código Ético para el Personal Académico, este proyecto cae dentro de la categoría de los proyectos que no requieren de una revisión exhaustiva por no implicar riesgo alguno para los participantes. Por lo anterior esta Comisión emite un dictamen **aprobatorio**.

ATENTAMENTE,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, a 1 de octubre de 2010.
POR LA COMISIÓN

DR. SIMÓN KAWA

C.c.p. Archivo



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MUJERES MEXICANAS SANAS (CONTROLES)

Fecha: _____

Nombre: _____

Fecha de nacimiento _____

Edad: _____ Estatura: _____ Peso: _____

Lugar de nacimiento: _____ Lugar de residencia: _____

¿A qué edad comenzó la menarca (menstruación)? _____

Si es el caso ¿A qué edad empezó la menopausia? _____

¿Cuántos embarazos ha tenido? _____

¿A qué edad tuvo cada uno de ellos? _____

¿Ha utilizado anticonceptivos hormonales? _____

¿Por cuánto tiempo?: _____

¿Qué tipo de anticonceptivos hormonales utilizó (inyectado, oral, parche)?

¿Ha tomado terapia hormonal de reemplazo? _____

¿Por cuánto tiempo? _____

¿Sus padres son mexicanos por nacimiento? _____

¿En qué estado de la república nacieron?:

Padre: _____ Madre: _____

¿Sus abuelos son mexicanos por nacimiento?: _____

¿En qué estado de la república nacieron?

Abuelo paterno: _____ Abuelo materno: _____

Abuela paterno: _____ Abuela materno: _____

¿Consume bebidas alcohólicas?: _____

¿Con qué frecuencia?

- a) Una vez a la semana
- b) Una vez al mes
- c) Sólo en eventos sociales
- d) Comúnmente hasta la embriaguez
- e) Otra: _____

¿En qué consiste su dieta alimenticia? (Favor de enumerarlos en orden de consumo)

- a) Verduras
- b) Frutas
- c) Cereales
- d) Carne roja
- e) Carne blanca
- f) Comida chatarra

¿Fuma? _____ ¿Con que frecuencia? _____

¿Cuántos cigarros al día? _____

¿Es fumador pasivo? _____

¿Cuál es su ocupación actual? _____

¿Ha estado expuesto a disolventes, pinturas, barnices, gasolina, thinner: _____ durante cuánto tiempo? _____

¿Actualmente está tomando medicamentos ó vitaminas? _____

¿Cuál(es)? _____

¿Tiene antecedentes familiares de diabetes (indicar quién, padres, abuelos, hermanos, etc.)
? _____

¿Tiene antecedentes familiares de presión alta (indicar quién, padres, abuelos, hermanos,
etc.)?: _____

¿Tiene antecedentes familiares de cáncer (indicar quién ó quiénes)?

¿Qué tipo de tumor? _____

Gracias por su colaboración

11

Hoja de Información para el paciente

Nombre del proyecto

"Asociación del polimorfismo de Her2Neu (Ile655Va) con las características clínicas y la sensibilidad al tratamiento neoadyuvante del cáncer de mama localmente"

Investigador Principal: Dra. Alma Magdalena Astorga Ramos.

Institución: Instituto Nacional de Cancerología

Domicilio: Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Del. Tlalpan, C. P. 14080
México D. F. Tel. 56 28 04 00



Una parte de este estudio comprende la recolección de una muestra sanguínea de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado para investigación de polimorfismo de Her2 Neu. Si usted está de acuerdo, su médico le solicitará que proporcione una muestra de sangre (10ml).

No se le solicitará tener otra muestra sanguínea. Antes de decidir si usted desea participar en este estudio, es importante que usted entienda porqué se realizará la investigación, cómo se utilizará su información personal y qué comprenderá el estudio. Por favor, tómese su tiempo para leer la siguiente información cuidadosamente y discutirla con su médico de cabecera, si así lo desea.

Una vez que su médico le explique el estudio y usted decida participar, se le pedirá que firme este formulario. Si usted decide no tomar parte, el tratamiento estándar que usted reciba no se verá afectado de ninguna manera.

Antes de decidir si usted desea participar en este estudio, es importante que usted entienda porqué se realizará la investigación, cómo se utilizará su información personal y qué comprenderá el estudio. Por favor, tómese su tiempo para leer la siguiente información cuidadosamente y discutirla con su médico de cabecera, si así lo desea. Una vez que su médico le explique el estudio y usted decida participar, se le pedirá que firme este formulario. Si usted decide no tomar parte, el tratamiento estándar que usted reciba no se verá afectado de ninguna manera.

¿Cuáles son los antecedentes y el propósito del estudio? El investigador principal del estudio desearía realizar algunas pruebas de investigación en muestra sanguínea de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (no operables al momento del diagnóstico sin enfermedad diseminada a otros órganos) de su tumor para aprender más acerca de cómo funciona el tratamiento. Todas las muestras sanguíneas extraídas de las pacientes, se guardarán en congelación a 70°C y se usarán solamente con propósitos de investigación y desarrollo para conocer más acerca de esta enfermedad. Las muestras sanguíneas no se utilizarán para examinar

cambios en los genes que pueden traspasarse en las familias, ni se utilizarán para investigar genéticos que pronostican el riesgo de desarrollar enfermedad o si pueden beneficiarse de recibir cierto tipo de tratamiento.

¿Qué me sucederá si participo?

Su médico le solicitará que proporcione una muestra sanguínea. Esta muestra sanguínea puede tomarse antes o después de haber recibido el tratamiento con quimioterapia.

Su muestra sanguínea se almacenará con muestras similares en el laboratorio de Carcinogénesis en el Instituto Nacional de Cancerología.

Las muestras para estos estudios de biomarcadores pueden conservarse por hasta 15 años después de completar el estudio.

Algunas de las pruebas realizadas en sus muestras pueden ser hechas varios meses o aún años después de que usted finalice su tratamiento de estudio, a medida que se disponga de nuevas técnicas y herramientas de investigación.

Los resultados de las pruebas de investigación en sus muestras pueden también compararse y combinarse con resultados de otros estudios de investigación. Además, los resultados de las pruebas de investigación en sus muestras pueden compararse con su información médica recolectada, pero solamente cuando esta información pueda ayudarnos a ver cómo funciona el tratamiento del estudio. Los resultados de estas pruebas no afectarán la forma en que su médico maneja su atención.

¿Cuáles son los posibles beneficios por participar?

No hay un beneficio directo para usted por participar en este estudio. No obstante, esta investigación puede contribuir a nuestra comprensión del cáncer y puede finalmente llevar a mejoras en el tratamiento.

¿Tengo que participar? Su decisión de participar o no es voluntaria. Si usted no desea participar en este estudio no tendrá desventajas en ningún modo, incluyendo el tratamiento médico y la atención que tiene derecho a recibir.

¿Recibiré un pago por participar? No se le pagará por participar en esta investigación.



¿Cómo se utilizarán mis datos personales? El investigador principal utilizará su información médica (datos del estudio) recolectados durante el estudio con el propósito de administrar y conducir el estudio de biomarcadores, investigación y análisis estadístico. Sus datos del estudio no incluyen su nombre o dirección. En su lugar, se asigna un número de código a los datos del estudio.

¿Qué derechos tengo de ver los resultados del estudio?

El propósito de este estudio no es proporcionarle los resultados de las pruebas. Usted tiene derecho de solicitar información acerca de cualquier dato personal que el médico pueda tener acerca de usted. Usted también tiene el derecho de solicitar que cualquier error en sus datos personales sea corregido.

¿Qué derecho tengo con respecto a los resultados del estudio de investigación?

Cualquier información derivada, directa o indirectamente de este estudio, así como también cualquier prueba diagnóstica o medicamento desarrollado directa o indirectamente como resultado de este estudio, no es propiedad suya. No obstante, firmando este formulario en el que consiente en proporcionar una muestra de tumor, usted no renuncia a ningún derecho que tendría de otro modo como participante en la investigación.

Tenga en cuenta que los resultados del estudio pueden publicarse en la literatura médica, pero su identidad no será revelada.

¿A quién debo contactar si necesito más información o ayuda?

Dra. Alma Magdalena Astorga Ramos

No de teléfono: 56 28 04 00 extensión 421 lunes y viernes.

Dirección: Instituto Nacional de Cancerología

Av. San Fernando # 22

Col. Sección XVI

Tlalpan, CP 14080 México DF.

Si usted tiene alguna pregunta sobre sus derechos como sujeto de investigación, usted puede ponerse en contacto con el Comité de Ética:

Dr. Juan Zinser Sierra

No. de teléfono: 56 280400 ext 338



He recibido información verbal sobre el presente estudio y he leído la información por escrito anexa. Me dieron la oportunidad de discutir el estudio y hacer preguntas.

Estoy de acuerdo en participar en el estudio y estoy consciente que mi participación es por completo voluntaria.

Esta información y formulario de consentimiento han sido aprobados por un Comité de Ética.

INFORMACION Y CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE PARA TOMA DE MUESTRA

Yo, _____ (nombre del paciente), he leído y entiendo toda la información de este consentimiento informado. He tenido la oportunidad de discutirla y formular preguntas. Todas mis dudas fueron respondidas a mi satisfacción. Yo consiento voluntariamente en participar en este estudio de investigación. Yo entiendo que recibiré una copia de este consentimiento informado.

Yo autorizo la recolección, uso y revelación de mi información médica en conformidad con este formulario. También consiento en que mi muestra sanguínea se almacene y use para investigación de polimorfismos o biomarcadores con el fin de encontrar una forma de pronosticar qué pacientes responden al tratamiento del cáncer de mama.

Firma del paciente

Fecha de la firma

Firma de la persona que conduce

Fecha de la firma

la explicación del consentimiento informado



VII. LITERATURA CITADA

- 1) Aklillu, E., Oscarson, M., Hidestrand, M., Leidvik, B., Otter, C., Ingelman-Sundberg, M., et al. 2002. Functional analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population. *Molecular pharmacology*, 61(3), 586-94.
- 2) Bailey, L. R., Roodi, N., Dupont, W. D., & Parl, F. F. 1998 a. Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer research*, 58(22), 5038-41.
- 3) Bailey, L. R., Roodi, N., Verrier, C. S., Yee, C. J., Dupont, W. D., Parl, F. F., et al. 1998b. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. *Cancer research*, 58(1), 65-70.
- 4) Bartsch, H., Nair, J., & Owen, R. W. 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 20 (12), 2209-18.
- 5) Brandan M. y Villaseñor Y. 2006. Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. *Cancerología* 1: 147-162.
- 6) Brockmüller J, Cascorbi I, Henning S, Meisel C, and Roots I. 2000. Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology*. 61: 212-227.
- 7) Buentello ML, Peñaloza ER, Loeza F, Salamanca GF, Cerda FR. 2003. Genetic structure of seven Mexican indigenous populations based on five polymarker loci. *American Journal of Human Biology*. 15: 23-28.
- 8) Calderón-Garcidueñas, A. L., Parás-Barrientos, F. U., Cárdenas-Ibarra, L., González-Guerrero, J. F., Villarreal-Ríos, E., Staines-Boone, T., et al. 2000. Risk factors of breast cancer in Mexican women. *Salud pública de México*, 42(1), 26-33.
- 9) Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., & Roy, D. 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 6805(27), 75-93.

- 10) Cotran R., Kumar V., Collins T. 1999. Pathologic Basis of disease. 6th Ed; p 1107.
- 11) da Fonte de Amorim, L., Rossini, A., Mendonça, G., Lotsch, P., de Almeida Simão, T., de Moura Gallo, C., et al. 2002. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer letters*, 181(2), 179-86.
- 12) De Créé, C., Van Kranenburg, G., Geurten, P., Fujimori, Y., & Keizer, H. a. 1997. 4-Hydroxycatecholesterol metabolism responses to exercise and training: possible implications for menstrual cycle irregularities and breast cancer. *Fertility and sterility*, 67(3), 505-16.
- 13) De Vivo, I., Hankinson, S. E., Li, L., Colditz, G. a., & Hunter, D. J. 2002. Association of CYP1B1 polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 11(5), 489-92.
- 14) Diergaarde, B., Potter, J. D., Jupe, E. R., Manjeshwar, S., Shimasaki, C. D., Pugh, T. W., et al. 2008. Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism, estrogen plus progestin hormone therapy use, and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(7), 1751-9.
- 15) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- 16) Garte, S. 1998. The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, 19(8), 1329-32.
- 17) Geneser, F. 2000. Histología. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Cap.23 Glándulas mamarias. pp. 679-685.
- 18) Gold, E. B., Bromberger, J., Crawford, S., Samuels, S., Greendale, G. a, Harlow, S. D., et al. (2001). Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *American journal of epidemiology*, 153(9), 865-74.

- 19) Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine N Engl J Med.* 346(5):340-52.
- 20) Guengerich FP. 1987. *Mammalian Cytochromes P450*. Vol 1. Boca Raton, Florida. USA. CRC Press.
- 21) Hanna, I. H., Dawling, S., Roodi, N., Guengerich, F. P., & Parl, F. F. 2000. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. *Cancer research*, 60(13), 3440-4.
- 22) Henderson, B. E., Ross, R. K., Judd, H. L., Krailo, M. D., & Pike, M. C. 1985. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*, 56(5), 1206-8.
- 23) Hidalgo-Miranda A. y Jiménez-Sánchez G. 2009. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Pública .México.* 51 (2): S197-S207.
- 24) Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, et al. 1996. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos*; 24: 899–905.
- 25) Huang, C. S., Chern, H. D., Chang, K. J., Cheng, C. W., Hsu, S. M., Shen, C. Y., et al. 1999a. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer research*, 59(19), 4870-5.
- 26) Huang, C., Shen, C., Chang, K., Hsu, S., & Chern, H. 1999b. Cytochrome P4501A1 polymorphism as a susceptibility factor for breast cancer in postmenopausal Chinese women in Taiwan. *British Journal of Cancer*, 80, 1838-1843.
- 27) Hulka, B. S. & Moorman, P. G. 2001. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*, 61(1-2), 203-13.
- 28) INEGI (2010) Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (datos nacionales).

- 29) INMEGEN. 2010. Glosario de Términos [consultado el 9 agosto 2010]. Disponible en:http://www.inmegen.gob.mx/index.php?option=com_content&task=category§ionid=20&id=59&Itemid=42
- 30) International Agency for Research on Cancer. 1987. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC, Lyon, France, Suppl 7, pp 280–285.
- 31) International Agency for Research on Cancer. 1999. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Hormonal Contraception and Postmenopausal Hormone Therapy. IARC, Lyon, France, vol 72.
- 32) International Agency for Research on Cancer. 2007. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Combined Estrogen-Progestogen Contraceptives and Combined Estrogen-Progestogen Menopausal Therapy. IARC, Lyon, France, vol 91.
- 33) Jiao, H., Liu, C., Guo, W., Peng, L., Chen, Y., & Martin, F. L. (2010). Association of CYP1B1 Polymorphisms with Breast Cancer: A Case-Control Study in the Han Population in Ningxia Hui Autonomous Region, P. R. China. *Biomarker insights*, 5, 21-7.
- 34) Kato, I., Cichon, M., Yee, C. L., Land, S., & Korczak, J. F. (2009). African American-preponderant single nucleotide polymorphisms (SNPs) and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology*, 33(1), 24-30.
- 35) Kocabaş, N. A., Sardaş, S., Sardas, S., Karakaya, A. E., & Karakaya, A. E. 2005. Polymorphisms related to estrogen and xenobiotic metabolism in healthy Turkish women. *Archives of medical research*, 36(1), 19-23.
- 36) Kristensen, V. N., & Borresen-Dale, a. L. 2000. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutation research*, 462(2-3), 323-33.
- 37) Kumar, V., Singh, S., Ahmed, R. S., Banerjee, B. D., Ahmed, T., Pasha, S. T., et al. 2009. Frequency of common CYP1B1 polymorphic variations in Delhi population of Northern India. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 392-396.

- 38) Lahiri K, Nurnberger Jr JI. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids Research* 19: 5444.
- 39) Lambe M, Hsieh C, Trichopoulos D, Ekblom A, Pavia M, Adami H. 1994. Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *New Engl J Med* 331: 5–9.
- 40) Le Marchand, L., Donlon, T., Kolonel, L. N., Henderson, B. E., & Wilkens, L. R. 2005. Estrogen metabolism-related genes and breast cancer risk: the multiethnic cohort study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(8), 1998-2003.
- 41) Liehr, J.G. Fang, W.F. Sirbasku, D.A. Ari-Ulubelen, A. 1986. Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters, *J. Steroid Biochem.* 24: 353–356.
- 42) Liehr, J. G. 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine reviews*, 21(1), 40-54.
- 43) Lisker R. 1981. Estructura genética de la población Mexicana: Aspectos médicos y antropológicos. México: Salvat Mexicana de Ediciones.
- 44) Listgarten, J., Damaraju, S., Poulin, B., Cook, L., Dufour, J., Driga, A., et al. (2004). Predictive models for breast cancer susceptibility from multiple single nucleotide polymorphisms. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(8), 2725-37.
- 45) López-Ríos, O., Lazcano-Ponce, E., Tovar-Guzmán, V., Hernández-Ávila, M. 1997. La epidemia de cáncer de mama en México. ¿Consecuencia de la transición demográfica?. *Salud Pública de México* 39 (4).
- 46) Martínez Tlahuel, J. 2007. Cáncer de mama. Boletín de Práctica Médica Efectiva. INSP.
- 47) McKay JA, Melvin WT, Ah-See AK, Ewen SW, Greenlee WF, Marcus CB, Burke MD, and Murray GI. 1995. Expression of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer. *FEBS Lett* 374:270–272.

- 48) Masson, L.F., L. Sharp, S. C. Cotton, and J. Little. 2005. Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*. (10) 161: 901–915.
- 49) McPherson, K., Steel, C. M., Dixon, J. M. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7261), 624-8.
- 50) Mitrunen, K., & Hirvonen, A. 2003. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation research*, 544(1), 9-41.
- 51) Miyoshi, Y., & Noguchi, S. 2003. Polymorphisms of estrogen synthesizing and metabolizing genes and breast cancer risk in Japanese women. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie*, 57(10), 471-81.
- 52) Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, and Melvin WT. 1997. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57:3026–3031.
- 53) Newcomb P, Storeer B, Longnecker M, et al. 1994. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *New Engl J Med* 330:81–7.
- 54) Okobia, M. N., Bunker, C. H., Garte, S. J., Zmuda, J. M., Ezeome, E. R., Anyanwu, S. N., et al. (2009). Cytochrome P450 1B1 Val432Leu polymorphism and breast cancer risk in Nigerian women: a case control study. *Infectious agents and cancer*, 4 Suppl 1, S12.
- 55) Palacio-Mejía, L., Lazcano-Ponce, E., Hernández-Avila, M. 2009. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública de México*. 51 (2).
- 56) Paracchini V, Pedotti P, Raimondi S, Garte S, Bradlow HL, Sepkovic DW, et al. A common CYP1B1 polymorphism is associated with 2-OHE1/16-OHE1 urinary estrone ratio. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:702–6.

- 57) Paracchini, V., Raimondi, S., Gram, I. T., Kang, D., Kocabas, N. a, Kristensen, V. N., et al. (2007). Meta- and pooled analyses of the cytochrome P-450 1B1 Val432Leu polymorphism and breast cancer: a HuGE-GSEC review. *American journal of epidemiology*, 165(2), 115-25.
- 58) Pérez-Morales, R. 2006. Frecuencia del polimorfismo CYP1A1*2C Y GSTM1*0 en población mexicana y su posible asociación con la susceptibilidad a padecer cáncer pulmonar. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 65 p.
- 59) Pérez-Morales, R. 2010. *Identificación de marcadores de susceptibilidad genética individual a cáncer pulmonar*. Tesis de Doctorado (no publicada), Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- 60) Petersen, D. D., Mckinney, C. E., Smith, H. H., Balejt, A. E., Mcbridet, W., Nebert, D. W., et al. 1991. Human CYPIA I Gene : Cosegregation of the Enzyme Inducibility Phenotype and an RFLP, 720-725.
- 61) Reding, K. W., Weiss, N. S., Chen, C., Li, C. I., Carlson, C. S., Wilkerson, H., et al. 2009. Genetic polymorphisms in the catechol estrogen metabolism pathway and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(5), 1461-7.
- 62) RHNM. 2002. Compendio: mortalidad y morbilidad 2001 [base de datos en Internet]. Secretaría de Salud, Epidemiología. 2001 [consultado el 15 marzo 2010]. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>.
- 63) Randolph, J. F. 2004. Change in Estradiol and Follicle-Stimulating Hormone across the Early Menopausal Transition: Effects of Ethnicity and Age. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(4), 1555-1561.

- 64) Riancho Moral, J.A. y González Macías, J. 2004. Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral. Cap.8 Hormonas Sexuales. Jarpyo Editores. Madrid. pp. 41-44.
- 65) Rodríguez-Cuevas, S., Macías, C. G., Franceschi, D., Labastida, S. 2001. Breast carcinoma presents a decade earlier in Mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer*, 91 (4), 863-8.
- 66) Russo, J., Y.F. Hu, X. Yang, I.H. Russo. 2000. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 27: 17–37.
- 67) Secretaría de Salud. 2002. Compendio de anatomía patológica de la glándula mamaria.
- 68) Shen, Y., Li, D., Wu, J., Zhang, Z., & Gao, E. (2006). Joint effects of the CYP1A1 MspI, ERalpha PvuII, and ERalpha XbaI polymorphisms on the risk of breast cancer: results from a population-based case-control study in Shanghai, China. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(2), 342-7.
- 69) Shimada, T., Watanabe, J., Kawajiri, K., Sutter, T. R., Guengerich, F. P., Gillam, E. M., et al. (1999). Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis*, 20(8), 1607-1613.
- 70) Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J., Fernandez-Lopez, J. C., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., et al. 2009. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8611-6.
- 71) Taioli, E., Trachman, J., Chen, X., Toniolo, P., & Garte, S. J. (1995). A CYP1A1 Restriction Fragment Length Polymorphism Cancer in African-American Women Is Associated with Breast. *Cancer research*, 55(17), 3757-3758.
- 72) Taioli, E. H.L. Bradlow, S.V. Garbers, D.W. Sepkovic, M.P. Osborne, L. Trachman, S. Ganguly, S.J. Garte. 1999. Role of estradiol metabolism and CYP1A1 polymorphisms in breast cancer, *Cancer Detec. Prev.* 23: 232–237.

- 73) Tang YM, Green BL, Chen GF, Thompson PA, Lang NP, Shinde A, Lin DX, Tan W, Lyn-Cook BD, Hammons GJ, and Kadlubar FF. 2000. Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls. *Pharmacogenetics* 10:761–766.
- 74) Thompson, P. A., & Ambrosone, C. 2000. Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in human breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (27), 125-34.
- 75) Torrades, S. 2003. El origen genético del cáncer de mama. *Genética* 22 (6): 108-112.
- 76) Weber, B. L., & Nathanson, K. L. 2000. Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 36(10), 1193-9.
- 77) Yager, J. D. 2000. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 27(27), 67-73.
- 78) Zheng, W., Xie, D. W., Jin, F., Cheng, J. R., Dai, Q., Wen, W. Q., et al. (2000). Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 9(2), 147-50.