



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA

**LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A PM_{2.5} SE ASOCIA
CON TUMORES DE MAYOR TAMAÑO Y CON EL
FENOTIPO TRIPLE NEGATIVO EN PACIENTES
CON CÁNCER DE MAMA**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. LEONORA VALDEZ ROJAS

Diddier Prada Ortega, MD, PhD.
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Paula A. Cabrera Galeana
Tutor de tesis

Ciudad de México, agosto 2018





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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

**LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A PM_{2.5} SE ASOCIA CON TUMORES DE MAYOR
TAMAÑO Y CON EL FENOTIPO TRIPLE NEGATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER
DE MAMA**

**PRESIDENTE: Dr. Diddier Prada Ortega
Director de Tesis
Instituto Nacional de Cancerología**

**SECRETARIO: Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia
Subdirectora de Educación Médica
Instituto Nacional de Cancerología**

**PRIMER VOCAL: Dra. Paula Anel Cabrera Galeana
Instituto Nacional de Cancerología**

**Dra. Leonora Valdez Rojas
Médico Residente de Tercer Grado de Oncología Médica
Autor
Instituto Nacional de Cancerología**

Título: LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A PM_{2.5} SE ASOCIA CON TUMORES DE MAYOR TAMAÑO Y CON EL FENOTIPO TRIPLE NEGATIVO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Investigador Principal: Leonora Valdez-Rojas*.

Director de Proyecto: Diddier Giovanni Prada Ortega

Colaboradores: Luis Alonso Herrera Montalvo**, Diddier Prada Ortega**, Paula Cabrera Galeana**.

Dirección: Instituto Nacional de Cancerología, San Fernando 22, Sección XVI, Tlalpan, CP 14080, Ciudad de México

***Residente responsable:** Leonora Valdez-Rojas, Residente de tercer año de Oncología Médica, Instituto Nacional de Cancerología-UNAM.

****Tutores responsables:** 1. Luis Alonso Herrera Montalvo, Director de Investigación; 2. Diddier Prada Ortega, Investigador en Ciencias Médicas “D”. Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM – Instituto Nacional de Cancerología, México; Paula Cabrera Galeana, Médico Adscrito al Departamento de Tumores Mamarios, Instituto Nacional de Cancerología.

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología, Unidad Periférica del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Didier Giovanni Prada Ortega.

Agradecimientos

A todas las excelentes personas de la Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Nacional de Cancerología que hicieron posible este proyecto.

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por la motivación y retroalimentación justa para lograr este proyecto; a mis tutores de tesis, Dr. Didier Giovanni Prada Ortega y Dra. Paula Cabrera Galeana por su guía y apoyo.

Al grupo de Oncología Médica que forjaron mi espíritu y compartieron su experiencia sin recato.

A mi familia que ha entregado su amor absoluto en mi formación profesional y no profesional.

Finalmente a mis amigos que son mi familia elegida y el resto de personas que me han marcado con creces (saben quiénes son ustedes) que no caben en estos cortos renglones.

Gracias.

ÍNDICE

Resumen	7-8
Antecedentes y marco de referencia	10-14
- Epidemiología del cáncer de mama	10
- Cáncer de mama triple negativo	10-11
- Partículas suspendidas $\leq 2.5\mu\text{m}$ [PM _{2.5}] y su asociación con cáncer	11-12
- 5-hidroximetilación de citosinas en el DNA	13-14
Planteamiento del problema	15
Pregunta de investigación	15
- Objetivos	15
Diseño y metodología	16-18
- Población y muestra	16
- Criterios de inclusión/no-inclusión/eliminación	16
- Medición de exposición a PM _{2.5}	16
- Análisis histopatológico	17
- Inmunohistoquímica para el marcador de proliferación celular Ki67	17-18
- Análisis estadístico	18
Resultados	19-25
- Medición de los niveles de exposición a PM _{2.5}	19
- Características generales de las pacientes	19-21
- Asociación de la exposición crónica a PM _{2.5} y las características clínicas de pacientes con cáncer de mama	22
- Asociación de la exposición crónica a PM _{2.5} y las características patológicas de pacientes con cáncer de mama	23-24
- Asociación de la exposición crónica a PM _{2.5} y los niveles de 5-hidroximetilcitosina de pacientes con cáncer de mama	24-25
Discusión	26-27

Conclusiones	27
Abreviaturas	28-29
Referencias	30-33

1. RESUMEN

Título: La exposición crónica a PM_{2.5} se asocia con tumores de mayor tamaño y con el fenotipo triple negativo en pacientes con cáncer de mama.

Antecedentes: Investigaciones previas han sugerido un incremento en la mortalidad por cáncer en general y de mama asociado a una mayor exposición a contaminación del aire (partículas suspendidas [PM] $\leq 2.5\mu\text{m}$ [PM_{2.5}]); sin embargo, los mecanismos subyacentes son desconocidos. La exposición crónica a PM_{2.5} se ha asociado también con un incremento en el riesgo de cáncer de pulmón, pero no es claro si existe un efecto en otras neoplasias, tanto para el riesgo de cáncer como sobre el tumor, una vez que se ha establecido. Nuestro estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de la exposición crónica a PM_{2.5} sobre ciertas características clínicas, patológicas y moleculares en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

Métodos: Llevamos a cabo un análisis en pacientes con cáncer de mama, residentes de la Ciudad de México y área metropolitana, tratadas de diciembre 2012 a junio de 2015 (n=151). Determinamos la exposición a PM_{2.5} mediante *Aerosol Optical Depth* usando un modelo de cuadrículas (*grids*) de 1 x 1 km² y se obtuvo la exposición diaria durante un año antes del diagnóstico y posteriormente, la exposición promedio anual. Evaluamos la asociación potencial entre la exposición y variables clínicas, patológicas y moleculares disponibles mediante regresiones lineares, logísticas y modelos mixtos, dependiendo de la variable analizada.

Resultados: Las pacientes incluídas presentaron una media de edad al diagnóstico de 51.8 años (desviación estándar [DE]: 11.0 años), la mayoría tuvieron sobrepeso u obesidad (70%) y se incluyeron pacientes en todas las etapas clínicas. La exposición a PM_{2.5} como promedio anual fue de 23.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (DE: 1.90) y presentó una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk, $p=0.11$). Encontramos una correlación positiva entre los niveles de PM_{2.5} y el tamaño tumoral ($r=0.216$, $p=0.008$), la cual confirmamos en modelos lineales multivariados (β : 0.216, intervalo de confianza del 95% [IC95%]: 0.033, 0.512, $p=0.027$). También encontramos que las pacientes con fenotipo triple negativo estuvieron expuestas a mayores concentraciones de PM_{2.5} ($p=0.015$, Prueba de Wilcox), lo que se

confirmó en modelos de regresión logística multivariada (β : 0.347, IC95%: 0.054-0.639, $p=0.020$). Finalmente, exploramos la posible asociación entre exposición crónica a $PM_{2.5}$ y niveles de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC, $n=112$) en un subgrupo de pacientes con niveles de 5-hmC en la biopsia inicial; encontramos una correlación negativa ($r=-0.28$, $p=0.02$), que no fue estadísticamente significativa en modelos lineales multivariados (β : -0.083, IC95%: -0.169, 0.003, $p=0.062$). No se observó una asociación entre la exposición y la supervivencia libre de enfermedad ($p=0.743$) o la supervivencia global ($p=0.519$).

Conclusiones: Este es el primer reporte a nivel mundial, que sea de nuestro conocimiento, que indica que puede haber un efecto adverso entre la exposición crónica a $PM_{2.5}$ durante un año previo al diagnóstico de cáncer de mama, sobre ciertas características clínicas y patológicas, incluyendo un mayor tamaño tumoral, fenotipo triple negativo y menores niveles de 5-hmC al momento del diagnóstico.

2. ANTECEDENTES Y MARCO DE REFERENCIA

2.1. *Epidemiología del cáncer de mama*

El cáncer de mama es la malignidad más común en mujeres, con cerca de 1.7 millones de casos diagnosticados en el 2012, representando el 25% de todos los cánceres en mujeres.¹ En países en desarrollo, la incidencia del cáncer de mama se ha incrementado por cambios en factores reproductivos, estilo de vida y aumento de la expectativa de vida. En promedio, 1 de cada 8 mujeres será diagnosticada con cáncer de mama a lo largo de su vida.² Se estima que este incremento alcanzará un 55% de aumento en incidencia y 58% en mortalidad en menos de 20 años.³

Desde el 2006 el cáncer de mama es la principal causa de mortalidad relacionada a cáncer en mujeres mexicanas, con un incremento anual de 5.9% en incidencia, superando así, a la del cáncer cervicouterino.³ Según cifras del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), para el 2012 se registró una incidencia del 11.64 casos por cada 100,000 mujeres de entre 25 y 44 años, por lo que corresponde a la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres de 30 a 54 años de edad, afectando a todos los grupos socioeconómicos.³

2.2. *Cáncer de mama triple negativo*

Los cánceres de mama triple negativo se definen como tumores que carecen de la expresión de receptores de estrógenos, receptores de progesterona y HER2.⁴ Los cánceres de mama basal-like constituyen uno de los cinco subtipos intrínsecos del cáncer de mama, cuya existencia fue revelada por estudios de perfiles de expresión génica. Este subgrupo se caracteriza por la ausencia o niveles bajos de expresión de receptores de estrógenos, ausencia de sobreexpresión de HER2 y expresión de genes usualmente encontrados en células basales o mioepiteliales del tejido mamario normal. Muchos cánceres cumplen las definiciones de cáncer de mama triple negativo y basal-like.⁵ Debido a que la mayoría de los cánceres basal-like son triples negativos y la mayoría de los cánceres triple negativo (aproximadamente el 80%) también son basal-

like, se ha sugerido que son sinónimos; sin embargo, información clínica, de microarrays e inmunohistoquímica, demuestran que no es así.⁶

El cáncer de mama triple negativo representa alrededor del 15% de todos los cánceres de mama, confiriendo un peor pronóstico en comparación con los subtipos luminales y con sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), ya que no pueden ser tratadas con terapia endócrina o anti HER2.⁶ Generalmente son tumores de alto grado y, tanto el triple negativo, como el basal-like, ocurren con mayor frecuencia en mujeres de raza negra e hispana, de edad joven (menores de 40 años). El *BRCA1* es un gen de susceptibilidad importante en cáncer de mama, ya que más del 75% de las mujeres con una mutación en este gen tienen un fenotipo triple negativo, basal-like o ambos.⁷

Los factores de riesgo para cáncer de mama triple negativo y basal-like son diferentes a aquellos asociados a otros tipos de cáncer de mama. Por ejemplo, en contraste con los tumores luminal A, el riesgo de cáncer de mama basal-like incrementa con la multiparidad y el aumento de la relación de la circunferencia muñeca-cadera.⁷

Los tumores triple negativo y basal-like tienden a ser de mayor tamaño en comparación con los otros subtipos de cáncer de mama.⁸ Por otro lado, son más propensos a ocasionar metástasis viscerales, principalmente al pulmón y cerebro.⁹

2.3. Partículas suspendidas $\leq 2.5\mu\text{m}$ [$\text{PM}_{2.5}$] y su asociación con cáncer

Las emisiones originadas por el transporte y la generación de energía son las principales fuentes de hidrocarburos carcinogénicos y metales pesados las partículas suspendidas (PM). La exposición crónica a PM se ha asociado con mortalidad cardiovascular y enfermedades respiratorias.¹⁰

La evidencia acerca de su efecto sobre la incidencia y mortalidad por cáncer es escasa, aunque existen múltiples estudios internacionales que han comprobado su asociación con diversos tipos de cáncer, principalmente de pulmón y mama, por lo que las partículas suspendidas han sido clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como carcinogénicos del grupo 1 (carcinogénicos para humanos).^{10, 11}

En un metaanálisis prospectivo de 17 estudios de cohorte de 9 países europeos, se encontró una asociación significativa entre los niveles elevados de PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ y un

riesgo elevado de cáncer de pulmón. El estudio concluyó que la contaminación del aire por PM contribuye a la incidencia de cáncer de pulmón en Europa.¹²

Las concentraciones globales de PM_{2.5} incrementaron 0.55 µg/m³/año (2.1%/año) de 1998 al 2012.¹³ Asimismo, la incidencia de cáncer de mama incrementó a nivel mundial en los últimos 20 años, por lo que existen hipótesis de que dicha elevación pudiese estar ligada al aumento de las concentraciones de PM. Un estudio llevado a cabo en California encontró que la exposición a altas concentraciones de PM₁₀ y PM_{2.5} se asoció significativamente con mortalidad temprana en mujeres con cáncer de mama.¹⁴

Wong y colaboradores demostraron una fuerte asociación entre la exposición crónica a PM_{2.5} y la mortalidad por cáncer en general (HR, 1.22), principalmente cáncer de pulmón y mama (HR 1.80).¹⁰

Un estudio japonés encontró que los niveles de PM_{2.5} se asociaron con mortalidad por cáncer de mama, endometrio y ovario, posterior a un ajuste por tabaquismo, densidad de la población y factores hormono-relacionados.¹⁵

Por otro lado, Nie y colaboradores llevaron a cabo un estudio de cohorte en el 2007 en el oeste del estado de Nueva York, encontrando que una alta exposición a emisiones por tránsito al momento de la menarca, se asocia con un aumento del riesgo de cáncer de mama en la premenopausia (OR 2.05) y una alta exposición al momento del primer parto incrementa el riesgo en la postmenopausia (OR 2.57).¹⁶

Más recientemente, en un estudio realizado en Milán, Italia, se encontró que el riesgo de mortalidad por cáncer de mama es significativamente mayor en mujeres con alta exposición a PM_{2.5} (HR 1.82).¹⁷

A pesar de las múltiples publicaciones a nivel internacional acerca de la asociación de exposición a PM_{2.5} y el cáncer de mama, se desconoce si ésta se relaciona con características clínicas y patológicas en este grupo de pacientes. Por este motivo, nuestro estudio tuvo como objetivo determinar la posible asociación entre la exposición crónica a PM_{2.5} y las características clínicas y patológicas en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012 al 2015.

2.4. 5-hidroximetilación de citosinas en el DNA

En el cáncer, la metilación de 5-metilcitosina (5mC) en el DNA representa una prominente y muy estudiada marca epigenética. En cáncer, a menudo se puede observar

un evento de hipometilación global (pérdida de citosinas metiladas), sobre todo en regiones repetitivas de DNA así como hipermetilación de promotores (aumento en la metilación de las citosinas localizadas en las regiones promotoras) en regiones densamente pobladas de dinucleótidos CpG, llamadas islas CpG, especialmente de genes supresores de tumor.¹⁸ Otra marca epigenética relacionada con la 5mC y recientemente asociada con cáncer y con otros procesos fisiológicos y fisiopatológicos en humanos es la 5-hidroximetilación de citosinas (5hmC). Antes del año 2009, la 5-metilcitosina (5-mC) se creía que era la única modificación en las citosinas con significancia biológica en el DNA de los mamíferos. Con el descubrimiento de las enzimas TET, las cuales convierten la 5-mC en 5-hmC, se despertó un gran interés en la función de esta marca (Mariani, 2013). Esta marca epigenética es generada por la oxidación de la 5mC y se ha reportado que desempeña un papel crítico durante la diferenciación de células madre pluripotenciales y de células progenitoras¹⁹. La 5hmC se ha postulado como un intermediario de la desmetilación de la 5mC. Este proceso de oxidación es llevado a cabo por un grupo de enzimas conocidas como *ten-eleven translocation* (TET1, TET2 y TET3) que catalizan la oxidación de la 5mC a 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina y 5-carboxilcitosina; mismos que son intermediarios en las reacciones bioquímicas de la desmetilación^{19, 20}. En estudios recientes se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de 5hmC, mutaciones de las enzimas TET 1-3 así como datos que sugieren su contribución en el proceso de carcinogénesis en neoplasias hematológicas^{21,22} y sólidas incluyendo cerebro, pulmón, riñón e hígado²³. También se ha descrito que los niveles de 5hmC son menores en tejidos tumorales de próstata, mama y colon en comparación con tejidos normales²⁴.

La razón por la que los niveles de 5hmC son bajos en el DNA genómico de tumores malignos queda poco claro. No obstante, en un estudio reciente publicado por Tsai y colaboradores en muestras de pacientes con cáncer de mama²⁵ se ha sugerido que existe una asociación entre los niveles de 5hmC y la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia enfermedad-específica en estas pacientes, particularmente en aquellas con fenotipo triple-negativos, es decir aquellos sin presencia de receptores hormonales ni HER2+.²⁵

Por otra parte, además de su implicación en la carcinogénesis, Lian y colaboradores, han reportado que los niveles bajos de 5hmC tienen valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con melanoma²⁶.

3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial. Se han descrito diversos factores de riesgo y pronósticos para esta enfermedad. Durante los últimos años la urbanización ha ocasionado un incremento importante en las emisiones de partículas suspendidas, las cuales ya se han clasificado como carcinogénicas del grupo 1 según la OMS.

Se han realizado múltiples estudios a nivel internacional, en los que se comprueba la asociación de PM_{2.5} con la incidencia y mortalidad de algunos tipos de cáncer, incluyendo el de pulmón y mama. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito su asociación con características clínico patológicas en pacientes con cáncer de mama.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La exposición crónica a PM_{2.5} se asocia con las características clínicas, patológicas y moleculares de las pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología durante el periodo 2012-2015?

4.1. *Objetivo primario:*

- Determinar si existe asociación entre la exposición crónica a PM_{2.5} y las características clínicas, patológicas y moleculares de las pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología durante el periodo 2012-2015

5. DISEÑO Y METODOLOGÍA

5.1. *Población y Muestra*

Se trata de un estudio retrospectivo, en el cual se han colectado más de 100 variables clínicas, incluyendo características sociodemográficas, clínicas, terapéuticas, histopatológicas y de respuesta al tratamiento. Para el presente proyecto se revisaron los expedientes clínicos de pacientes con cáncer de mama con confirmación histológica (N=151), que no hubieran recibido tratamiento oncológico previo, tomando en cuenta los siguientes criterios:

5.1.1 *Criterios de inclusión:*

1. Mujeres de 18 años de edad o más.
2. Adenocarcinoma de mama confirmado histológicamente.
3. Etapas clínicas I a IV.
4. Tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología.
5. Residentes de la Ciudad de México y zonas conurbadas durante al menos un año previo al diagnóstico.

5.1.2 *Criterios de no-inclusión:*

1. Pacientes con reporte histopatológico de tumor mamario diferente a adenocarcinoma.

5.1.3 *Criterios de eliminación:*

1. Pacientes que rechazaron tratamiento oncológico.
2. Pacientes tratadas en otra institución.
3. Pacientes con expediente clínico incompleto.
4. Pacientes que no residían en la Ciudad de México y zonas conurbadas.

5.2. *Medición de exposición a PM_{2.5}*

Determinamos la exposición a PM_{2.5} mediante *Aerosol Optical Depth* usando un modelo de cuadrículas (*grids*) de 1 x 1 km² y se obtuvo la exposición diaria durante un año antes del diagnóstico y posteriormente, la exposición anual promedio

5.3. Análisis histopatológico

Llevamos a cabo una caracterización histológica detallada en las muestras de biopsia inicial evaluando tipo histológico, grado histológico (formación de túbulos, pleomorfismo nuclear, índice mitótico), grado nuclear, células inflamatorias, presencia o ausencia de componente de carcinoma in situ, invasión linfovascular, invasión perineural. Posteriormente y en las muestras quirúrgicas, si el tumor residual estaba presente, se realizó una caracterización histológica detallada igual a la de la biopsia inicial añadiendo cantidad de tumor residual expresado en porcentaje, tamaño del tumor, lecho quirúrgico, estadio nodal. Para la determinación de respuesta patológica completa, se consideró además el número de ganglios extirpados, el número de ganglios metastásicos y la respuesta patológica según Miller y Payne (grado 1: ausencia de respuesta; grado 2: reducción menor [$\leq 30\%$]; grado 3: algo de reducción [$30-90\%$]; grado 4: reducción marcada [$> 90\%$]; grado 5: ausencia de cáncer infiltrante residual aunque puede haber carcinoma in situ).

5.4 Inmunohistoquímica para el marcador de proliferación celular Ki67

Para la inmunohistoquímica de las biopsias iniciales, el tejido fue fijado en formalina al 10% amortiguada y sometido a procesamiento estándar para inclusión en parafina. Se evaluó cada caso de forma independiente y se seleccionaron focos de 5 mm o de 2.5 mm y que tuvieran al menos 50 células neoplásicas a magnificación 400X, excluyendo áreas de necrosis, estroma sin tumor e infiltrado inflamatorio denso. Se llevó a cabo recuperación antigénica para el anticuerpo Ki67. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada en solución de peróxido de hidrógeno-metanol al 0,5% y se incubó el tejido durante la noche con el siguiente anticuerpo primario: anti-Ki-67 (RTU; clon MIB-1; Dako 10 North America, CA, USA). Para la evaluación visual de la inmunomarcación, la proporción de células positivas del marcador de proliferación se obtuvo a partir de la medición de evaluadores expertos (patólogos del servicio de patología mamaria del INCan). Se determinó la proporción de células positivas visualmente contando aproximadamente 50 células tumorales en 400X de magnificación.

La intensidad se obtuvo sobre la base de recomendaciones de Dowsett y colaboradores. El porcentaje de núcleos positivos en relación con el número total de núcleos de células malignas se expresó como índice de proliferación celular.

5.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis en la muestra total (N=151), así como análisis particulares por fenotipo (Receptores hormonales positivos [RE/RP(+)] y negativos [RE/RP(-)], Luminal A, Luminal B, Her2+ y Triple Negativos [RE/RP(-), Her2(-)]. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para comparación de medianas y ANOVA de Kruskal-Wallis para evaluar la asociación entre los niveles de exposición a PM_{2.5} y las variables categóricas como el tipo histológico, categorías de obesidad según el índice de masa corporal, etc. Para evaluar la relación entre los niveles de PM_{2.5} y las variables continuas (como por ejemplo, los niveles de Ki67), se utilizó la correlación de Pearson. También, se llevó a cabo análisis multivariable mediante regresión logística usando modelos mixtos para determinar los predictores independientes de los niveles de PM_{2.5}, incluyendo la edad (variable continua), niveles de Ki67 (variable continua), estatus socioeconómico (variable categórica), etc. Se consideró positivo un valor alfa de 2 colas de 0.05.

6. RESULTADOS

6.1 *Medición de los niveles de exposición a PM_{2.5}*

Mediante el test de Shapiro-Wilk se mostró una distribución normal de la exposición a PM_{2.5} en la población de pacientes estudiadas ($p=0.1118$) (**figura 1**).

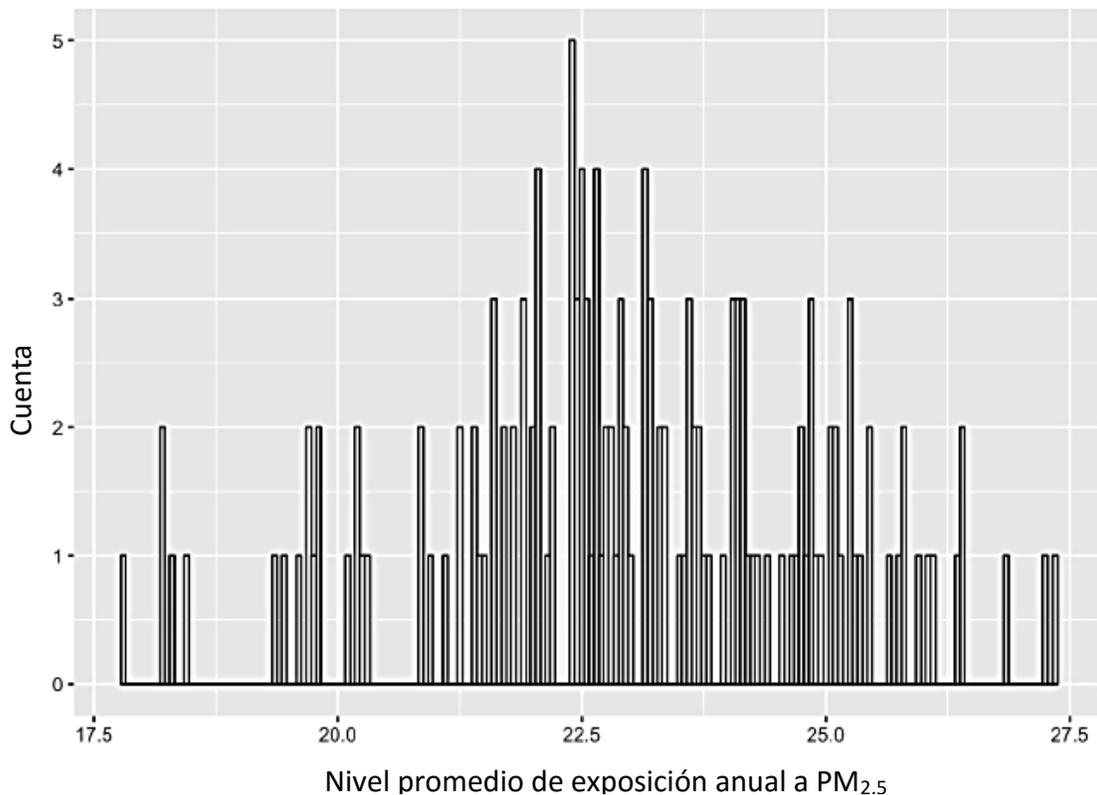


Figura 1. Distribución de la exposición a PM_{2.5} en pacientes mexicanas con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012 al 2015 ($p=0.1118$).

6.2 *Características generales de las pacientes*

En el periodo de 2012 a 2015 se reclutaron 151 pacientes mexicanas con diagnóstico de cáncer de mama, residentes de la Ciudad de México y zonas conurbadas, con exposición a largo plazo (1 año antes del diagnóstico de cáncer de mama) a PM_{2.5}.

En la **tabla 1** se resumen las características demográficas, clínicas e histopatológicas de las pacientes incluidas en el análisis final.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología – México, 2012-2015 (N=151).

Variable	Media	Desviación estándar
Edad	51.8	11.0
Edad de menarca	12.5	2.3
Índice de masa corporal, kg/m ²	29.0	5.9
Tamaño del tumor, cm	6.4	3.0
Scarff-Bloom-Richardson	7.3	1.5
Ki67, %	37.0	25.4
PM _{2.5} , mcg/m ³	23.0	1.9
Variable	N	%
Comorbilidades		
Diabetes Mellitus	21	13.9
Hipertensión arterial sistémica	39	25.8
Fumadoras	44	24.4
Menopáusicas	90	59.6
Grado Histológico		
Bajo-intermedio	70	46.4
Alto	81	53.6
Tipo histológico		
Carcinoma ductal infiltrante	142	94.0
Carcinoma lobulillar infiltrante	8	5.3
Carcinoma mixto	1	0.7
Inmunofenotipo		
Luminal A	35	23.1
Luminal B	81	53.7
Triple negativo	19	12.6
HER2 positivo	16	10.6
Estadio clínico		
IA	2	1.3
IIA	5	3.3
IIB	16	10.7
IIIA	58	38.7
IIIB	32	21.3
IIIC	8	4.7
IV	30	20.0
Esquemas de quimioterapia neoadyuvante		
FAC	20	20.0
T-FAC	68	68.0
AC-T	1	1.0

TCH	1	1.0
TCis-ACis	6	6.0
Capecitabine	1	1.0
T-AC	3	3.0
Desenlace clínico		
pCR	27	27.0
Recurrencia de la enfermedad	16	17.2
Muerte	19	12.5

PM_{2.5}: Partículas con diámetro menor de 2.5µm. Bajo-intermedio: SBR ≤7; alto: SBR ≥8. FAC: Fluorouracilo, Adriamicina, Ciclofosfamida; T-FAC, Paclitaxel-Fluorouracilo, Adriamicina, Ciclofosfamida; AC-T: Adriamicina, Ciclofosfamida-Paclitaxel; TCH: Docetaxel, Carboplatino, Trastuzumab; Tcis-Acis: Paclitaxel, Cisplatino-Adriamicina, Cisplatino; T-AC: Paclitaxel-Adriamicina, Ciclofosfamida. pCR: Respuesta patológica completa.

La edad promedio de las pacientes fue de 51.8 años (desviación estándar [DE]: 11.0 años). Se encontró una alta frecuencia de sobrepeso y obesidad, con un índice de masa corporal promedio de 29.0. Por otra parte, la frecuencia de comorbilidades fue de 13.9% para DM2 y 25.8% para hipertensión arterial sistémica. El porcentaje de mujeres fumadoras fue del 24.4% y el 59.6% eran menopáusicas. En relación a las características clínicas oncológicas, encontramos que la media del tamaño tumoral fue de 6.4cm. El estadio clínico más frecuente fue el IIIA con 38.7% de los casos, seguido del IIIB con 21.3% y IIB con 10.7%; el estadio menos frecuente fue el IA con solo 1.3% de los casos.

El tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante en el 94% de las pacientes. Los fenotipos luminal A, luminal B, HER2 enriquecido y triple negativo se presentaron en un 23.1%, 53.7%, 10.6% y 12.6% respectivamente. El promedio del valor de Ki67 fue de 37% y 53.6% de las pacientes contaban con un alto grado histológico (SBR >7).

100 de las 189 pacientes recibieron tratamiento con quimioterapia neoadyuvante, siendo el esquema T-FAC el más empleado en el 68% de los casos y encontrando respuesta patológica completa en 27 de las 100 pacientes (27%).

Durante el seguimiento observamos recurrencia de la enfermedad en 17.2% pacientes y fallecimiento en el 12.5%.

6.3 Asociación de la exposición crónica a $PM_{2.5}$ y las características clínicas de las pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012-2015

La exposición a largo plazo a $PM_{2.5}$ se correlacionó positivamente con el tamaño tumoral; es decir, a mayor exposición a partículas, mayor tamaño tumoral ($p=0.0076$, $r=0.216$), lo cual se traduce en que por cada 2 desviaciones estándar de incremento de exposición a partículas, aumenta 0.8cm el tamaño tumoral (**figura 2**).

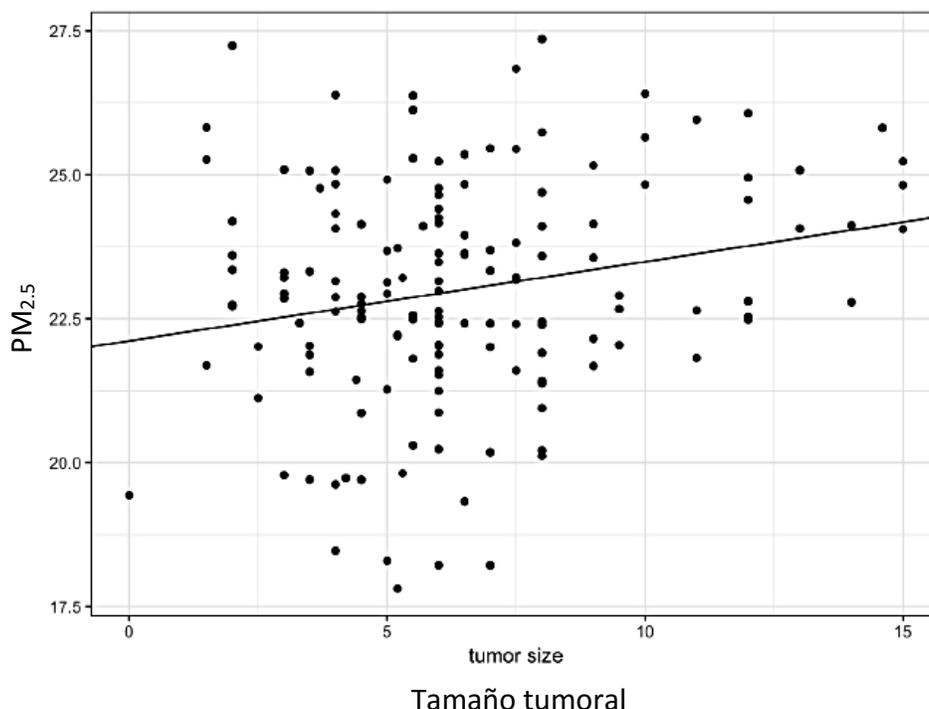


Figura 2. Correlación entre la exposición a $PM_{2.5}$ y el tamaño tumoral en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012 al 2015.

Se realizó un análisis multivariable de regresión lineal para la asociación de exposición a largo plazo a $PM_{2.5}$ y el tamaño tumoral, ajustado por edad, nivel socioeconómico y Ki67 (β : 0.216, intervalo de confianza del 95% [IC95%]: 0.033, 0.512, $p=0.027$), mismo que se muestra en la **tabla 2**.

Tabla 2. Modelo de regresión multivariable para la asociación entre la exposición a largo plazo a $PM_{2.5}$ y el tamaño tumoral en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012-2015, ajustado por Ki67, estatus socioeconómico y edad.

	β	IC 95%	Valor p
Tamaño tumoral ^a	0.216	0.033, 0.512	0.0270
Ki67 ^a	0.033	0.015, 0.050	0.0005
Estatus socioeconómico ^b	0.163	-0.421, 0.747	0.1317
Edad ^a	-0.032	-0.073, 0.009	0.5858

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

a. Como variable continua

b. Como variable categórica

Algunas características clínicas que no se correlacionaron con la exposición a partículas fueron la edad, el índice de masa corporal, el antecedente de tabaquismo y el estatus menopáusico.

6.4 Asociación de la exposición crónica a PM_{2.5} y las características patológicas de las pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012-2015

También encontramos que las pacientes con fenotipo triple negativo estuvieron expuestas a mayores concentraciones de PM_{2.5} ($p=0.015$, Prueba de Wilcoxon) (**figura 3**), lo que se confirmó en modelos de regresión logística multivariada ajustado por edad y antecedentes heredo familiares de cáncer de mama (β : 0.347, IC95%: 0.054-0.639, $p=0.020$) (**tabla 3**).

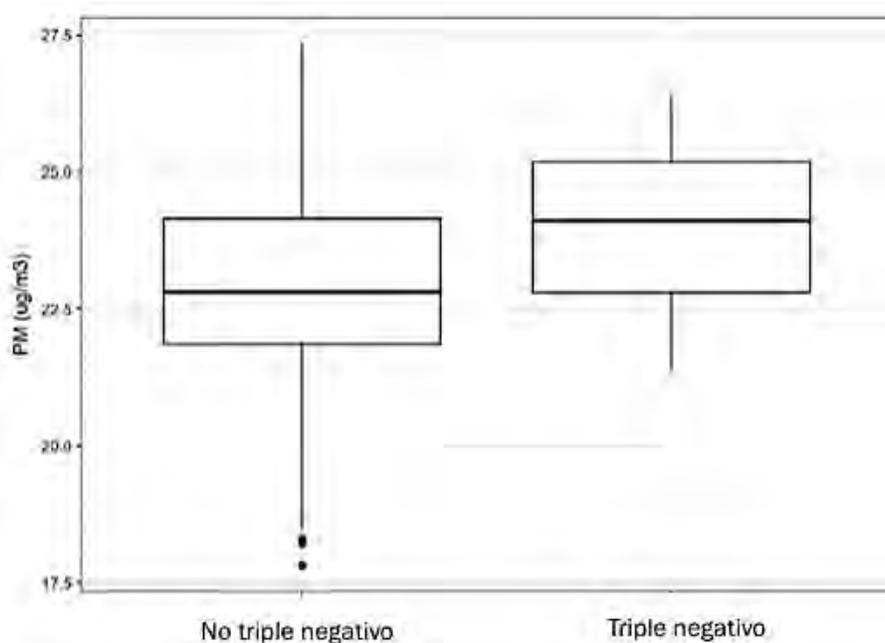


Figura 3. Correlación entre la exposición a PM_{2.5} y el subtipo triple negativo en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012 al 2015 ($p= 0.59$).

Tabla 3. Modelo de regresión multivariable para la asociación entre la exposición a largo plazo a PM_{2.5} y el subtipo triple negativo en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012-2015, ajustado por edad y antecedentes heredo familiares de cáncer de mama.

	β	IC 95%	Valor p
Triple negativo ^a	0.347	0.054, 0.639	0.020
Edad ^b	0.002	-0.043, 0.047	0.920
Antecedentes heredo familiares de cáncer de mama ^a	-1.346	-3.423, 0.731	0.204

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

a. Como variable categórica

b. Como variable continua

6.5 Asociación de la exposición crónica a PM_{2.5} y los niveles de 5 hidroximetilcitosina en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012-2015

Finalmente, exploramos la posible asociación entre exposición crónica a PM_{2.5} y niveles de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC, n=112) en un subgrupo de pacientes con niveles de 5-hmC en la biopsia inicial; encontramos una correlación negativa ($r=-0.28$, $p=0.02$) (**figura 4**), que no fue estadísticamente significativa en modelos lineales multivariados (β : -0.083, IC95%: -0.169, 0.003, $p=0.062$) (**tabla 4**).

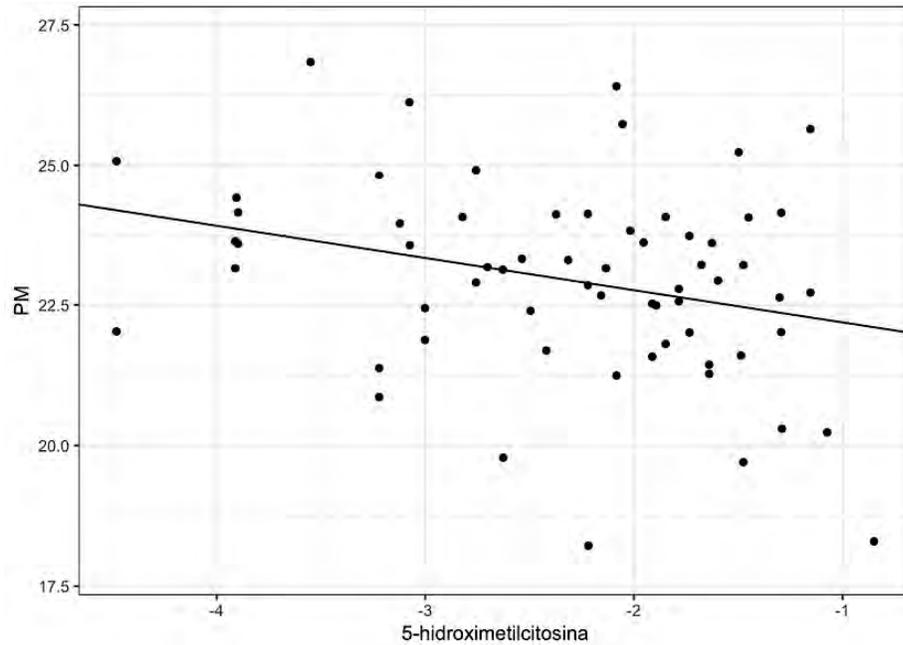


Figura 4. Correlación entre la exposición a $PM_{2.5}$ y los niveles de 5hmC en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012 al 2015 ($p=0.020$, $r=-0.28$).

Tabla 4. Modelo de regresión multivariable para la asociación entre la exposición a largo plazo a $PM_{2.5}$ y los niveles de 5hmC en pacientes con cáncer de mama tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología del 2012-2015, ajustado por edad y Ki67.

	β	IC 95%	Valor p
5 hidroximetilcitosina ^a	-0.083	-0.169, 0.003	0.062
Edad ^a	-0.006	-0.021, 0.009	0.440
Ki67 ^a	-0.006	-0.009, -0.002	0.021

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

a. Como variable continua

7. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos encontrado una asociación entre los niveles de exposición crónica a $PM_{2.5}$ y ciertas características clínico patológicas en pacientes con cáncer de mama. Nuestros resultados sugieren que a mayor exposición a $PM_{2.5}$, mayor tamaño tumoral, menores niveles de 5-hmC y predominio del fenotipo triple negativo. Todas estas son características asociadas a un peor pronóstico en mujeres con cáncer de mama.

En un estudio realizado por Parikh y colaboradores, se encontró que las mujeres residentes del áreas metropolitana de Atlanta tienen una mayor incidencia anual de cáncer de mama en comparación con las residentes del área rural de Georgia (132.6 vs 113.7 por cada 100,000). Las emisiones de hidrocarburos aromáticos policíclicos y $PM_{2.5}$ estuvieron fuertemente asociados con la alta incidencia de cáncer de mama en las áreas metropolitanas, tanto en modelos no ajustados, como ajustados.³⁰

Existen múltiples hipótesis acerca del mecanismo carcinogénico de las partículas suspendidas; desde la liberación de citocinas e inducción de estrés oxidativo, hasta la activación de vías de señalización mediada por desregulación de microRNA, promoción de la angiogénesis mediante sobreexpresión de VEGF y mutaciones de p53.^{31, 32}

La exposición crónica a $PM_{2.5}$ es aquella que dura 6 meses o más, por lo que únicamente incluimos pacientes que hubieran sido residentes de la Ciudad de México y áreas conurbadas durante, al menos, un año previo al diagnóstico de cáncer de mama. Sin embargo, algunos autores mencionan la importancia de realizar estudios de cohorte en mujeres a partir de la menarca y con seguimiento a largo plazo, para poder delimitar la verdadera asociación entre $PM_{2.5}$ y la incidencia y mortalidad por cáncer de mama.

La disminución en los niveles de 5-hmC se ha asociado con una menor supervivencia libre de progresión y global en series retrospectivas de pacientes con cáncer de mama y de esófago.^{25, 27}

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones, siendo una de las más importantes el número de casos incluidos, esto debido a que muchas pacientes tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología no son residentes de la Ciudad de México y áreas conurbadas, por lo que no era posible determinar los niveles de exposición a $PM_{2.5}$.

Por otro lado, se trata de una muestra sumamente heterogénea, ya que se incluyeron pacientes con todas las etapas clínicas y subtipos moleculares, por lo que sería conveniente expandir la muestra y probablemente incluir pacientes únicamente con fenotipo triple negativo para explorar otras posibles asociaciones.

8. CONCLUSIONES

Este es el primer reporte a nivel mundial, que sea de nuestro conocimiento, que indica que puede haber un efecto adverso entre la exposición crónica a $PM_{2.5}$ durante un año previo al diagnóstico de cáncer de mama, sobre ciertas características clínicas y patológicas, incluyendo un mayor tamaño tumoral, fenotipo triple negativo y menores niveles de 5-hMC al momento del diagnóstico.

La importancia de dichos hallazgos es que todas las asociaciones se relacionan con un peor pronóstico en mujeres con cáncer de mama. Es necesario realizar estudios prospectivos en poblaciones más amplias para poder corroborar lo publicado hasta el momento.

9. ABREVIATURAS

5hmC,	5-hidroximetilcitosina
5mC,	5-metilcitosina
AC-T,	Adriamicina/ciclofosfamida-paclitaxel
AOD,	Aerosol optical depth
CDI,	Carcinoma ductal infiltrante
CLI,	Carcinoma lobulillar infiltrante
CMLA,	Cáncer de mama localmente avanzado
FAC,	5-fluorouracilo/adriamicina/ciclofosfamida
FAC-T,	5-fluorouracilo/adriamicina/ciclofosfamida-paclitaxel
HER2,	Human epithelial receptor-2
HR,	Hazard ratio
IC95%,	Intervalos de confianza del 95%
INCan,	Instituto Nacional de Cancerología
IMC,	Índice de masa corporal
OR,	Odds ratio
OMS,	Organización Mundial de la Salud
PM,	Partículas suspendidas
PM_{2.5},	Partículas suspendidas $\leq 2.5\mu\text{m}$
RE,	Receptores de estrógenos
RP,	Receptores de progesterona
pCR,	Respuesta patológica completa
SBR,	Scarff-Bloom-Richardson
T-AC	Paclitaxel-Adriamicina/Ciclofosfamida

T-FAC, Paclitaxel-5-fluorouracilo/adriamicina/ciclofosfamida

TCH, Docetaxel/Carboplatino/Trastuzumab

**TCis-
ACis,** Paclitaxel/Cisplatino-Adriamicina/Cisplatino

TET, Ten-eleven translocation

10. REFERENCIAS

1. Rojas, K. & Stuckey, A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. **59**, 651–672 (2016).
2. Ban, K. A. Epidemiology of Breast Cancer Breast cancer Epidemiology Risk factors. *Surg. Oncol. Clin. NA* **23**, 409–422 (2014).
3. International, T., Epidemiology, C., Soto-perez-de-celis, E. & Chavarri-guerra, Y. National and regional breast cancer incidence and mortality trends in Mexico 2001 – 2011 : Analysis of a population-based database. *Cancer Epidemiol.* **41**, 24–33 (2016).
4. Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A. & Caldas, C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.* **23**, 7350–7360 (2005).
5. Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S. & Ellis, I. O. Basal-like breast cancer: A critical review. *J. Clin. Oncol.* **26**, 2568–2581 (2008).
6. Foulkes, W. D., Smith, I. E. & Reis-Filho, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1938–1948 (2010).
7. Millikan, R. C. *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **109**, 123–139 (2008).
8. Cheang, M. C. U. *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1368–1376 (2008).
9. Dent, R. *et al.* Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **115**, 423–428 (2009).
10. Wong, C. M. *et al.* Cancer Mortality Risks from Long-term Exposure to Ambient Fine Particle. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **25**, 839–845 (2016).
11. Loomis, D. *et al.* The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.* **14**,

- 1262–1263 (2013).
12. Raaschou-Nielsen, O. *et al.* Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet. Oncol.* **14**, 813–822 (2013).
 13. van Donkelaar, A., Martin, R. V, Brauer, M. & Boys, B. L. Use of satellite observations for long-term exposure assessment of global concentrations of fine particulate matter. *Environ. Health Perspect.* **123**, 135–143 (2015).
 14. Hu, H., Dailey, A. B., Kan, H. & Xu, X. The effect of atmospheric particulate matter on survival of breast cancer among US females. *Breast Cancer Res. Treat.* **139**, 217–226 (2013).
 15. Iwai, K., Mizuno, S., Miyasaka, Y. & Mori, T. Correlation between suspended particles in the environmental air and causes of disease among inhabitants: cross-sectional studies using the vital statistics and air pollution data in Japan. *Environ. Res.* **99**, 106–117 (2005).
 16. Nie, J. *et al.* Exposure to traffic emissions throughout life and risk of breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. *Cancer Causes Control* **18**, 947–955 (2007).
 17. Tagliabue, G. *et al.* Atmospheric fine particulate matter and breast cancer mortality: A population-based cohort study. *BMJ Open* **6**, 1–6 (2016).
 18. Esteller, M. Epigenetics in Cancer. (2008).
 19. Dahl, C., Grønbaek, K. & Guldborg, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin. Chim. Acta.* **412**, 831–836 (2011).
 20. Ficiz, G. *et al.* Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**, 398–402 (2011).
 21. Ko, M. *et al.* Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* **468**, 839–843 (2010).
 22. Konstandin, N. *et al.* Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with

- TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia* **25**, 1649–1652 (2011).
23. Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. & Song, H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* **10**, 2662–2668 (2011).
 24. Haffner, M. C. *et al.* Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* **2**, 627–637 (2011).
 25. Tsai, K.-W. *et al.* Reduction of global 5-hydroxymethylcytosine is a poor prognostic factor in breast cancer patients, especially for an ER/PR-negative subtype. *Breast Cancer Res. Treat.* **153**, 219–234 (2015).
 26. Lian, C. G. *et al.* Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* **150**, 1135–1146 (2012).
 27. Shi, X. *et al.* Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Independent Unfavorable Prognostic Factor for Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* **11**, e0153100 (2016).
 28. Reduction of global 5-hydroxymethylcytosine is a poor prognostic factor in breast cancer patients, especially for an ER/PR-negative subtype - [art%3A10.1007%2Fs10549-015-3525-x.pdf](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5105-4_15).
 29. Strand, S. H. *et al.* High levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is an adverse predictor of biochemical recurrence after prostatectomy in ERG-negative prostate cancer. *Clin. Epigenetics* **7**, (2015).
 30. Vijay Parikh, P. & Wei, Y. PAHs and PM 2.5 emissions and female breast cancer incidence in metro Atlanta and rural Georgia. *Int. J. Environ. Heal. Res. Int. J. Environ. Heal. Res. Int. J. Environ. Heal. Res.* **264**, 960–3123 (2016).
 31. Hongying, W. *et al.* The mechanisms for lung cancer risk of PM2.5: Induction of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human non-small cell lung cancer cells. *Environ. Toxicol.* **32**, 2341–2351 (2017).

32. Li, R., Zhou, R. & Zhang, J. Function of PM2.5 in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases. *Oncology Letters* **15**, 7506–7514 (2018).