

Frecuencia de las variantes del gen de aromatasa (TTTA)n en mujeres sanas y con cáncer de mama

Frequency of the variants of aromatase gene (TTTA)n in healthy women and with cancer of breast

Murillo-Ortiz B,¹ Castillo-Valenzuela RC,¹ Arenas-Aranda D,² Hernández-González M,¹ Solorio-Meza S,¹ Martínez-Garza SG.¹

▷ RESUMEN

Se ha considerado la posible función del polimorfismo (TTTA)n del gen CYP19, que contiene un número variable de repeticiones TTTA (7 a 13), en el cáncer de mama. Esta estructura interviene en la biosíntesis de los estrógenos y se ha reportado un incremento del riesgo de padecer cáncer mamario cuando las mujeres presentan > 10 repeticiones alélicas de (TTTA)n.

Objetivo: Analizar la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo de repetición simple (TTTA) del gen CYP19 en mujeres sanas y pacientes con carcinoma mamario.

Material y métodos: Se incluyó a 180 mujeres sanas y 70 con cáncer de mama. Se obtuvo el ADN de los leucocitos para la genotipificación. Las repeticiones de TTTA de CYP19 se determinaron por amplificación con PCR y los productos amplificados se corrieron en gel desnaturalizante de acrilamida.

Resultados: Se incluyó a un total de 250 mujeres de 55 ± 12 años con IMC de $30 \pm 7.1 \text{ kg/m}^2$. Se reconoció una distribución diferente en las frecuencias de los alelos CYP19; en las mujeres sanas, los alelos más frecuentes

▷ ABSTRACT

It has been considered to be the possible role of the (TTTA) n polymorphism of the gene CYP19 in the cancer of breast. They contain a different number of TTTA repetitions (range 7-13) inside the region of codification. It is involved in the synthesis of the estrogens and an increase in the risk has been reported when the patients present >10 repetitions allelic of (TTTA)n.

Objective: *Analyze the frequency of the different genotypes of the polymorphism by simple (TTTA) repetition of the gene CYP19 in healthy women and women with mammary carcinoma.*

Material and methods: *We conducted a study among 180 healthy women and 70 women with breast cancer. The DNA of the leukocytes was obtained for the genotyping TTTA's repetitions of CYP19. They were determined by amplification by PCR, the amplified products moved along in gel of acrilamide.*

Results: *250 women (age 55 ± 12 years) went included. BMI $30 \pm 7.1 \text{ Kg/m}^2$. Found the distribution of the different frequencies of CYP19 allele, in healthy women the allele with 6 (32.7 %) and 7 (21.6 %) repetitions were the most frequent, in women with breast cancer the allele with 6(29%) and 10(26%)repetitions were the most frequent.*

¹Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, UMAE N° 1 Bajío, IMSS. León, Guanajuato. México.

²Unidad de Investigación en Genética Humana, Hospital de Pediatría CMN S XXI, IMSS. México, DF.

Correspondencia: Dra. Blanca Murillo Ortiz. Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica, UMAE No. 1 Bajío, IMSS. Blvd. López Mateos, Esq. Insurgentes s/n, Col. Los Paraíso, León, Guanajuato. Teléfono y Fax: (477) 717-4800 ext. 31472. *Correo electrónico:* bomo907@hotmail.com, blanca.murillo@imss.gob.mx

fueron 6 (32.7%) y 7 (21.6%) y en las mujeres con cáncer las repeticiones alélicas más comunes fueron 6 (29%) y 10 (26%).

Conclusión: Este estudio indica que el número de repeticiones >10 TTTA puede estar relacionado con un mayor incremento del riesgo de padecer cáncer mamario.

Palabras clave: polimorfismo de aromatasa, cáncer de mama, México.

▷ INTRODUCCIÓN

Con base en evidencias experimentales y epidemiológicas, se ha establecido la hipótesis según la cual los estrógenos incrementan el riesgo de padecer cáncer mamario. Los niveles séricos elevados de estrógeno endógeno, en particular de estradiol (E2), se vinculan con este riesgo.¹⁻⁵ En las mujeres, el estradiol proviene de fuentes diferentes antes y después de la menopausia. En mujeres premenopáusicas, el ovario o membrana granulosa de folículos dominantes es la fuente principal de los estrógenos circulantes; después de la menopausia, los estrógenos se producen sobre todo por la conversión de los andrógenos de origen suprarrenal y ovárico, especialmente en la zona reticular de la corteza suprarrenal. Frecuentemente la conversión de andrógeno a estrona ocurre en tejidos periféricos, incluidos piel, músculo, grasa y hueso. El complejo de enzima aromatasa cataliza esta conversión. La aromatasa intratumoral desempeña una función importante en la conversión *in situ* de los andrógenos séricos a estrógenos y sirve como una fuente de estrógenos, en particular en la mujer posmenopáusica con cáncer mamario.⁶

▷ POLIMORFISMO DE AROMATASA

La exposición acumulada a los estrógenos circulantes se considera de gran importancia como factor etiológico del cáncer mamario. Los estrógenos intervienen en el desarrollo y el crecimiento de los tumores de mama. Alrededor de 75% de las pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama tiene carcinomas dependientes de estrógeno.⁷ Uno de los genes que participan es el de la aromatasa, el denominado CYP19, que contiene 10 exones y se localiza en el cromosoma 15q21. La enzima aromatasa tiene la capacidad de metabolizar los andrógenos precursores de estrógenos androstenediona, testosterona y dehidroepiandrosterona para formar estrona, estradiol y estriol.

Conclusions: This study indicates that status of CYP19 > 10 TTTA repeat allele might be related to increased breast cancer risk.

Key words: polymorphism CYP19, breast cancer, Mexico

El gen CYP19 contiene un número variable de repeticiones TTTA (7 a 13) en el intrón 4 dentro de la región de codificación. Algunos estudios⁹⁻¹⁵ han revisado el posible papel del polimorfismo (TTTA)_n del gen CYP19 de la aromatasa en el cáncer de mama y han registrado un incremento del riesgo cuando las pacientes presentan 10 o más repeticiones alélicas de (TTTA)_n.

Sin embargo, no se ha estudiado en las mujeres mexicanas con carcinoma mamario la frecuencia de este polimorfismo; en el presente estudio se describe su distribución y se analiza a un grupo de mujeres sanas para comparar las frecuencias.

▷ SUJETOS Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, comparativo y transversal en el servicio de oncología de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 1 Bajío, IMSS. Se incluyó a 180 mujeres sanas que acudieron como acompañantes al servicio de oncología y 70 mujeres con diagnóstico de cáncer invasor, fuera ductal o lobulillar, de cualquier grado de malignidad de acuerdo con la escala SBR, y cualquier etapa clínica. Se excluyeron los casos en los que no se logró determinar las variantes del genotípico de la enzima aromatasa. Las pacientes recibieron una explicación acerca del estudio y con posterioridad se les solicitó un consentimiento informado. El estudio se efectuó de acuerdo con los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos basados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Obtuvo la aprobación del comité de ética de la UMAE No.1 Bajío, IMSS.

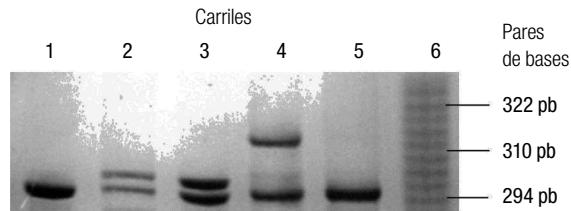
▷ DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN CYP19

Se tomó una muestra de sangre periférica y se realizó la extracción del ADN genómico de leucocitos por procedimiento de fenol-cloroformo. La reacción en cadena de

Tabla 1.
Características clínicas de las mujeres con carcinoma mamario

	Premenopausia	Posmenopausia
	n = 25	n = 45
Edad	46 ± 4.94	65 ± 9.26
Etapa clínica		
I	0%	5%
II	33%	0%
III	50%	0%
IV	17%	25%
Estirpe histopatológica		
Ductal	75.00%	65%
Canalicular	8.30%	25%
Otros	16.70%	10%
Grado de malignidad (SRB)		
I	16.70%	45%
II	33.30%	35%
III	41.70%	15%
Receptor de estrógenos α		
Positivo	88%	92%
Negativo	12%	8%
Receptor de estrógenos β		
Positivo	89%	46%
Negativo	11%	54%
Niveles hormonales		
Estradiol	104.89 ± 67.98	9.89 ± 5.96
Testosterona	0.20 ± 0.13	0.13 ± 0.07
T/estradiol	542.45 ± 10067.58	99.51 ± 87.07
FSH	37.70 ± 27.52	43.90 ± 18.99
IMC		
Normal	25%	5%
Sobrepeso	58%	45%
Obesas	17%	35%
Antecedentes patológicos		
Diabetes	0%	5%
Hipertensión	8.30%	10%
Negados	83.30%	55%
Diabetes/hipertensión	8.30%	25%
Hipotiroidismo	0%	5%

Imagen 1.
Gel de poliacrilamida al 10% con 7M de urea.



Carril 1: homocigoto (TTTA)7 ; carril 2: heterocigoto (TTTA)7/(TTTA)8; carril 3: heterocigoto (TTTA)6/(TTTA)7 ; carril 4: heterocigoto (TTTA)6/(TTTA)10; carril 5: homocigoto (TTTA)6; carril 6: marcador alélico CSF1PO.

la polimerasa se llevó a cabo con la adición de 80 ng de ADN genómico con 100 pmol de cada uno de los iniciadores 5'-GCAGGTACTTAGTTAGCTAC-3' y 5'-TTACAGTGAGCCAAGGTGCT-3', 200 μmol de dNTP, 2 mmol/L, MgCl₂ 2UdS de la enzima Taq DNA polimerasa. La amplificación del DNA se realizó de acuerdo con el siguiente programa: ciclo de desnaturación a 94°C por 1.4 min, desnaturación a 94°C por 1 min y alineación a 60°C por 1 min en 30 ciclos, con etapa final de extensión a 72°C por 10 min.

El producto de la PCR se corrió en un gel de poliacrilamida al 6% con 7.6 mol/L de urea por 3 h a 30 vatios. Se utilizó bromuro de etido para revelar los genotipos del gel de poliacrilamida (**Imagen 1**).

▷ ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características de las pacientes se analizaron con estadística descriptiva. Se utilizó media o mediana y desviación estándar para las variables clínicas y moleculares. También se analizaron relaciones entre el número de repeticiones y la presencia de cáncer mamario.

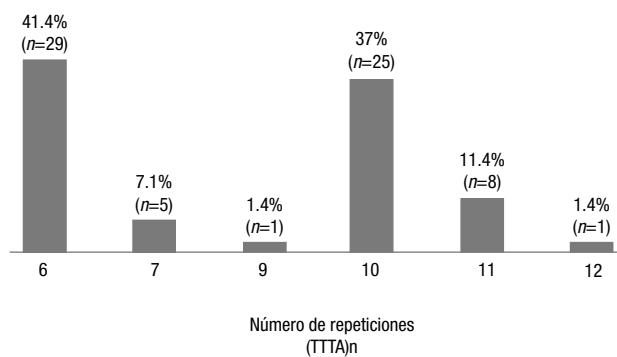
▷ RESULTADOS

Se estudió a un total de 250 mujeres para conocer el número de repeticiones, 180 mujeres sanas y 70 con diagnóstico de carcinoma mamario; el promedio etario fue de 55 ± 12 años y el IMC fue de 30 ± 7.1 kg/m². En la **Tabla 1** se observan las variables clínicas del grupo de mujeres con carcinoma mamario.

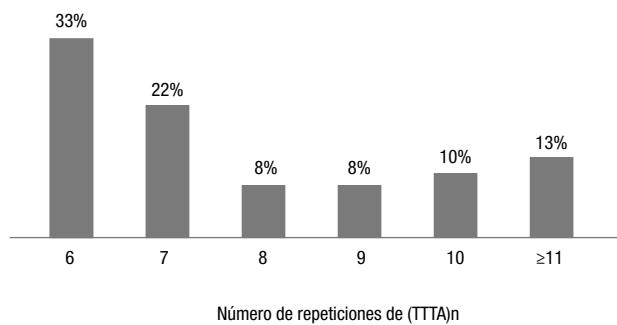
En el grupo de las mujeres con cáncer, las repeticiones más frecuentes fueron 6 (29%) y 10 (26%), como se observa en la **Imagen 2**, mientras que en las mujeres sanas se reconoció que las repeticiones alélicas más frecuentes eran 6 (32.7%) y 7 (21.6%), como se ilustra en la **Imagen 3**. También se advirtió que en las pacientes con cáncer de mama las repeticiones ≥ 10 fueron más frecuentes (35% vs 23% en mujeres sanas; $\chi^2=11.44$, $p=0.0007$), como lo muestra la **Imagen 4**.

Imagen 2.

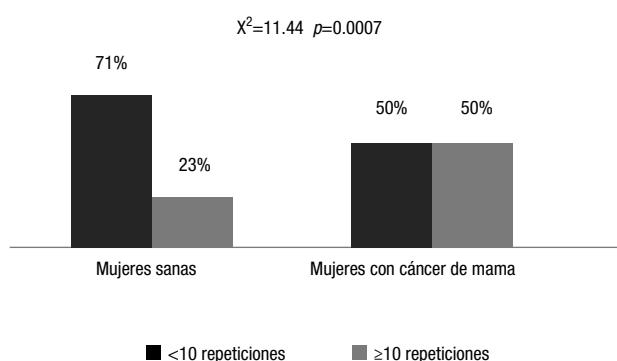
Frecuencias de mujeres con cáncer de mama.

**Imagen 3.**

Frecuencias alélicas de (TTTA)n en mujeres sanas.

**Imagen 4.**

Frecuencia > 10 repeticiones en mujeres con carcinoma mamario en comparación con mujeres sanas.



▷ DISCUSIÓN

La distribución de las variantes del polimorfismo del gen CYP19 (TTTA)n es diferente entre las mujeres mexicanas sanas en comparación con las que padecen carcinoma mamario. Las repeticiones ≥10 de TTTA son más frecuentes

en mujeres con cáncer de mama. Éste es el primer informe realizado en mujeres mexicanas; en otras poblaciones se ha publicado que esta variante se ha relacionado con un mayor riesgo de cáncer mamario.

Kristensen y colaboradores⁹ comunicaron las frecuencias alélicas de este polimorfismo en 182 pacientes con cáncer de mama esporádico, 182 pacientes con cáncer familiar y 252 individuos sanos; en ese protocolo se identificaron 7, 8, 9, 11 y 12 repeticiones alélicas de TTTA. El alelo largo (TTTA) 12 fue significativamente más frecuente en las personas con cáncer respecto de los controles sanos. Esto indica que la posesión de este alelo largo (TTTA) 12 incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama (OR, 2.42). Asimismo, se encontró una frecuencia mayor de este alelo largo (TTTA) 12 en el grupo de pacientes con tumores positivos para receptor de estrógenos y progesterona.

Miyoshi y colaboradores¹⁰ realizaron un estudio de casos y controles para determinar si este polimorfismo se vinculaba con el riesgo de cáncer de mama en mujeres japonesas. Las mujeres homocigotas con 10 o más repeticiones de TTTA mostraron un mayor riesgo de cáncer de mama (OR, 1.8).

Ahsan y colaboradores¹¹ efectuaron el primer estudio familiar para examinar las vinculaciones entre el polimorfismo de repetición de (TTTA) de CYP19 y el riesgo de cáncer de mama. Se estudió a 278 familias que tenían una o más hijas con cáncer de mama (se valoró a un total de 1123 sujetos) y encontraron que las repeticiones alélicas de (TTTA) 11 se relacionaban con un mayor riesgo de cáncer de mama en estas familias.

Por su parte, Han y colaboradores¹² realizaron un estudio de casos y controles para valorar la relación entre el polimorfismo de repetición (TTTA) de CYP19 y el riesgo de cáncer de mama en mujeres chinas. En esta investigación se incluyó a 213 pacientes y 430 controles y fue posible identificar que el alelo con 10 repeticiones de (TTTA) fue más frecuente en los casos que en los controles.

Más aún, Hu y colaboradores¹³ informaron resultados similares. Okobia y colaboradores¹⁴ sometieron a estudio el polimorfismo de repetición de (TTTA) en una población indígena subsahariana. Estos especialistas estudiaron a 250 mujeres con cáncer de mama y 250 mujeres sanas y señalaron que 10 o más repeticiones de (TTTA) se relacionaban con un incremento discreto del riesgo de cáncer de mama en mujeres nigerianas.

Ribeiro y colaboradores¹⁵ investigaron la frecuencia de las repeticiones alélicas de TTTA en una población de América del Sur y analizaron el riesgo para desarrollar cáncer de mama. Dichos investigadores comunicaron

que el alelo con 10 repeticiones de (TTTA) fue tres veces más frecuente en los casos y que mostró una relación positiva ($p = 0.048$) con el desarrollo de cáncer de mama en una población brasileña.

El incremento del riesgo de padecer cáncer mamario por este polimorfismo de repetición debe investigarse en la población mexicana, además de conocer los factores de riesgo ambiental y genéticos, para introducir medidas que reduzcan el incremento del riesgo. La obesidad es un factor preponderante, ya que la actividad de la enzima aromatasa incrementa los niveles circulantes de estradiol a partir de la conversión del tejido adiposo. En este estudio se informó que el 75% de las mujeres premenopáusicas presentaban obesidad o sobrepeso y 80% de las posmenopáusicas. Este polimorfismo de repetición aumenta la actividad de la enzima aromatasa, por lo que su efecto metabólico en el tejido adiposo se vuelve un factor que puede modificarse mediante medidas preventivas; en consecuencia, analizar el estado nutricio y seguir las recomendaciones dietéticas reducen la obesidad en la población y, en consecuencia, en grado considerable, el riesgo de desarrollar cáncer mamario.

▷ CONCLUSIONES

En este estudio pudo reconocerse que las repeticiones ≥ 10 de TTTA son más frecuentes en las mujeres con cáncer de mama ($p=0.0007$). En la población de mujeres sanas las repeticiones más frecuentes fueron 6 y 7.

▷ AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Estado de Guanajuato el apoyo otorgado

a través del programa de Fondos Mixtos. Apoyo GTO-2005-CO4-18799 IMSS.

Bibliografía

1. Secretaría de Salud. Salud México 2002. Información para la rendición de cuentas. México, DF: Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño, SSA; 2003.
2. Menck HR, Mills PK. The influence of urbanization, age, ethnicity and income on the early diagnosis of breast carcinoma: opportunity for screening improvement. *Cancer* 2001;92(5):1299-1304.
3. Secretaría de Salud. Salud México 2001. Información para la rendición de cuentas. México, DF: Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño, SSA; 2002.
4. Lazcano-Ponce E, Tovar-Guzmán V, Alonso-de P, y cols. Cáncer de mama. Un hilo conductor histórico, presente y futuro. *Salud Pública Mex* 1996; 38:139-152.
5. Simpson ER, Meandro MS, Means GD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endoc Rev* 1994; 15:342-55.
6. Hironobu Sasano, Takashi Suzuki, Taisuke Nakata, Takuuya Moriya. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer* 2006;13:129-136.
7. Chen S Aromatase and breast cancer. *Front Biosci* 1998; 3:d922-933.
8. Sebastián S, Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4600-2.
9. Kristensen VN, Andersen TI, Lindblom A, Erikstein B, Magnus P, Borresen-Dale AL. A rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer. *Pharmacogenetics* 1998;8(1): 43-48.
10. Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, Egawa C, Noguchi S. Breast cancer risk associated with polymorphism in CYP19 in Japanese women. *Int J Cancer* 2000;20;89(4):325-8.
11. Ahsan H, Whittemore AS, Chen Y, Seniu RT, et al. Variants in estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 and breast cancer risk: a family-based genetic association study. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R71-8.
12. Han DF, Zhou X, Hu MB, Xie W, Mao ZF, Chen DE, Liu F, Zheng F. *Chin Med J (Engl)* 2005;20;118(18):1507-16.
13. Hu MB, Xie W, Xiong B, Han DF, et al. Study on the relationship between polymorphisms of genes (CYP17, CYP19 and SULT1A1) and susceptibility to breast cancer in Chinese women *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2006;27(4):351-5.
14. Okobia MN, Bunker CH, Zmuda JM, Ezeome ER, et al. Simple tandem repeat (TTTA)n polymorphism in CYP19 (aromatase) gene and breast cancer risk in Nigerian women. *J Carcinog* 2006;9: 5:12.
15. Ribeiro FS, de Amorim LM, de Almeida Simao T, Mendonca GA, de Moura Gallo CV, Pinto LF. CYP19 (TTTA)n polymorphism and breast cancer risk in Brazilian women. *Toxicol Lett* 2006; 20;164(1):90-5.