



Densidad mamaria y su asociación con el polimorfismo del gen del receptor de estrógenos alfa (RE α) PvuII y XbaI

Blanca Murillo Ortiz,* Elva L Pérez Luque,* Juan Manuel Malacara*

RESUMEN

Objetivo: estudiar la influencia del gen RE α en la densidad mamográfica.

Pacientes y método: se estudiaron 87 mujeres ($49.8 \pm DE 6.12$ años de edad). Se obtuvo el índice de masa corporal (IMC) y una muestra de sangre en ayuno para la determinación de hormonas y extracción del ADN. La genotipificación mediante PCR y las endonucleasas de restricción PvuII y XbaI. La densidad mamográfica fue asignada por el radiólogo con tres categorías: grasa, intermedia y densa.

Resultados: la densidad mamográfica se relacionó de manera significativa con las concentraciones de estradiol ($p=0.04$), estrona ($p=0.04$), y FSH ($p=0.02$). El IMC no se asoció con el genotipo PvuII y XbaI; sin embargo, se vinculó marginalmente con la densidad mamaria ($p=0.06$).

Conclusiones: no se demostró a satisfacción la concomitancia entre las variantes alélicas del genotipo del receptor de estrógenos alfa y la densidad mamaria.

Palabras clave: densidad mamaria, polimorfismo del gen del receptor de estrógenos alfa.

ABSTRACT

Objective: To study the influence of ER- α on mammographic density.

Material and methods: We selected 87 healthy women (age $49.8 \pm S.D. 6.12$ years). We obtained the body mass index (BMI), and a fasting blood sample for hormone determinations and DNA extraction. ER- α genotyping was carried out by PCR and digestion with a PvuII and XbaI restriction endonucleases. Mammographic density was assigned by the radiologist used three categories of fatty, average and dense.

Results: Mammographic density was significantly associated with estradiol ($p=0.04$), estrone ($p=0.04$), and FSH ($p=0.02$). The BMI was not associated with PvuII and XbaI genotypes and marginally with mammographic breast density ($p=0.06$).

Conclusions: We did not observe compelling evidence of an association between variant alleles of genotypes estrogen receptors alpha and breast density.

Key words: mammography breast density, genotypes estrogen receptors alpha.

RÉSUMÉ

Objectif : étudier l'influence du gène RE α dans la densité mammographique.

Patients et méthode : on a étudié 87 femmes (âgées de $49.8 \pm DE 6.12$ ans). On a obtenu l'indice de masse corporelle (IMC) et une prise de sang à jeun pour la détermination d'hormones et l'extraction d'ADN. La génotypification au moyen de la PCR et les endonucléases de restriction PvuII et XbaI. La densité mammographique a été assignée par le radiologue avec trois catégories : graisse, intermédiaire et dense.

Résultats : la densité mammographique a été remarquable aux concentrations d'œstradiol ($p = 0.04$), œstrone ($p = 0.04$) et FSH ($p = 0.02$). L'IMC n'a pas été associé au génotype PvuII et XbaI ; cependant, il a été lié de forme marginale à la densité mammaire ($p = 0.06$).

Conclusions : il n'a pas été démontré à volonté la concomitance entre les variantes alléliques du génotype du récepteur d'œstrogènes alpha et la densité mammaire.

Mots clé : densité mammaire, polymorphisme du gène du récepteur d'œstrogènes alpha.

RESUMO

Objetivo: estudar a influência do gene RE α na densidade mamográfica.

Pacientes e método: estudaram-se 87 mulheres ($49,8 \pm DE 6,12$ anos de idade). Obteve-se o índice de massa corpórea (IMC) e uma mostra de sangue em jejum para a determinação de hormônios e extração do ADN. A genotipificação mediante PCR e as endonucleasas de restrição PvuII e XbaI. O radiólogo assignou a densidade mamográfica com três categorias: gordura intermédia e densa.



Resultados: Relacionou-se significativamente a densidade mamográfica com as concentrações de estradiol ($p=0,04$), estrona ($p=0,04$), e FSH ($p=0,02$). O IMC não se associou com o genótipo PvuII e XbaI; contudo, vinculou-se marginalmente com a densidade mamária ($p=0,06$).

Conclusões: não se demonstrou plenamente a concomitância entre as variantes alélicas do genótipo do receptor de estrogênios alfa e a densidade mamária

Palavras chave: densidade mamária, polimorfismo do gene do receptor de estrogênios alfa.

La mastografía es el método más eficaz para la identificación y diagnóstico del cáncer de mama que, si se realiza con oportunidad e interpreta adecuadamente, permite la detección aproximada del 90% de los casos. Se realiza de manera rutinaria en mujeres a partir de los 40 años de edad y su interpretación incluye diferentes parámetros y signos que podrán interpretarse según el tipo de densidad mamaria.¹ Ésta es resultado del tejido colágeno atravesado por la radiación. El coeficiente de atenuación del tejido colágeno de la glándula mamaria depende del porcentaje de tejido adiposo de la glándula mamaria en estudio. La densidad mamaria disminuye con la edad y con la menopausia; sin embargo, en algunas mujeres menopáusicas se observa una densidad mamaria extremadamente densa.² Esta se debe a que no siempre hay pérdida total de estrógenos. Nuestro grupo reportó, en 1990, que una proporción significativa de mujeres en franca postmenopausia tenía valores de FSH inferiores a 30 UI/L,³ sobre todo las mujeres obesas. Esto significa que el hipoestrogenismo y el hipergonadotropismo no son constantes en la menopausia. Está reportado que la obesidad es uno de los factores que influyen de manera significativa en la densidad del parénquima mamario y existen múltiples pruebas de que las mujeres postmenopáusicas obesas tienen exposición significativa a estrógenos, en consecuencia menor incidencia de osteoporosis y mayor frecuencia de cáncer mamario. En estudios posteriores se confirmó la relación inversa entre el índice de masa corporal y las concentraciones de FSH, y las mayores

concentraciones de estrona o estradiol de las mujeres obesas.⁴

La mujer menopáusica experimenta cambios fisiológicos y biológicos muy variables. Los cambios biológicos se explican por la diversa sensibilidad de los tejidos a los estrógenos. Así, los diferentes síntomas, la pérdida ósea, el riesgo de enfermedad cardiovascular y la densidad mamaria tienen una relación directa con las concentraciones hormonales y la sensibilidad de sus receptores. De los dos tipos de receptores de estrógenos: alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$), el más importante en los tejidos reproductivos es el receptor de estrógenos alfa. El $RE\beta$ participa en la diferenciación y plasticidad del sistema nervioso central. Se han encontrado dos polimorfismos importantes del $RE\alpha$: el PvuII, con sus genotipos PP, Pp y pp y el XbaI con sus genotipos XX, Xx y xx. Están en estudio las diferentes variantes alélicas del receptor de estrógenos alfa para determinar la sensibilidad a los estrógenos. La influencia de los genotipos del $RE\alpha$ se ha estudiado en relación con los episodios que ocurren en la menopausia,⁵ la densidad ósea en la adolescente,⁶ y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en mujeres con enfermedad coronaria.⁷

La densidad mamaria es uno de los predictores independientes de mayor peso para cáncer de mama, y la densidad mamaria correlaciona con el estado de menopausia en la mujer.⁸ Con base en demostraciones clínicas y epidemiológicas las concentraciones hormonales se han correlacionado con cambios en la densidad mamaria. Los autores de este estudio decidimos examinar la variación en la densidad mamaria con respecto a los diferentes genotipos del receptor de estrógenos alfa. Buscamos establecer una asociación entre el polimorfismo del $RE\alpha$ y la densidad mamaria en un estudio transversal.

PACIENTES Y MÉTODO

Se incluyeron 87 mujeres sanas que acudieron a la unidad de detección de cáncer mamario. Se obtu-

* Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Guanajuato.

Correspondencia: Dra. Blanca Murillo Ortiz. Instituto de Investigaciones Médicas. Universidad de Guanajuato, Calle 20 de enero núm. 929, col. Obregón, CP 37320, León, Guanajuato, México. Tel./fax: (52) 477 7168354. E-mail: bom0907@hotmail.com
Recibido: noviembre, 2004. Aceptado: febrero, 2005.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

vieron sus medidas antropométricas, peso, talla para calcular el índice de masa corporal (IMC) y muestras de sangre en ayuno para la determinación de hormonas y extracción de ADN. Las concentraciones séricas de estradiol y estrona se midieron con radioinmunoensayo (Diagnostic Products, Los Angeles CA), la FSH se cuantificó con IRMA (Diagnostic System Laboratories, Weister, Tex.).

La densidad mamaria se evaluó mediante mastografía en la proyección cráneo-caudal⁹ y fue asignada por el radiólogo con el uso de tres categorías: densidad grasa, intermedia y densa (figura 1). Para determinar el polimorfismo del receptor de estrógenos alfa, el ADN se aisló de los leucocitos de sangre periférica mediante un método convencional: Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). La genotipificación del gen RE, PvuII y XbaI se realizó por medio de PCR, en un volumen final de 100 μ L, con 100 ng de ADN genómico, 0.2 mM de cada uno de los dNTP (dATP, dGTP, dTTP, y dCTP), con la siguiente pareja de iniciadores: 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTCCTATTCTCC-3' y 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTA TCTGA-3', a una concentración de 0.2 μ M correspondientes a la parte entre el intrón 1 y el exón 2 del gen RE alfa, 2 mM/L de MgCl₂ y 3.5 U taq polimerasa (Promega, Madison, WI). La reacción de PCR fue de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 40 segundos, y 72°C durante 90 segundos (Peltier Thermocycler: MJ Research, Inc., Water Town, MA).

El fragmento de 143-bp del DNA genómico contenido en la porción del exón 1 (GCG por GCC; codón 87) se amplificó con PCR con el uso de los *primers* descritos.⁷ Los fragmentos de PCR los digirieron las enzimas de restricción PvuII y XbaI y se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio, posteriormente se visualizaron en el "documentador" de imágenes Gel-Doc-BioRad. La ausencia del sitio de restricción PvuII se designó como P que corresponde a un fragmento de 1.3Kb; el sitio de restricción se designó como p formando un patrón de bandas de dos fragmentos de 0.85 kp y 0.45kp, respectivamente. La ausencia del sitio de restricción de XbaI se indica con X, que corresponde igual a un fragmento de 1.3Kp, el sitio de restricción XbaI se señaló con x formando un patrón de dos fragmentos, uno de 0.9kp y otro de 4 kp. Esto generó tres genotipos para PvuII, definidos por las variantes alélicas: PP, Pp y pp, y tres también para el genotipo XbaI: XX, Xx y xx.

Análisis estadístico

Las frecuencias de los genotipos se calcularon en porcentaje y compararon con la proporción Hardy-Weinberg. Las variables se analizaron con análisis de variancia y ji al cuadrado. Los factores concomitantes con la densidad mamaria se examinaron con un análisis de regresión múltiple, los regresores fueron: edad, edad a la menarquia, edad al primer embarazo, estado de menopausia, índice de masa corporal, concentraciones

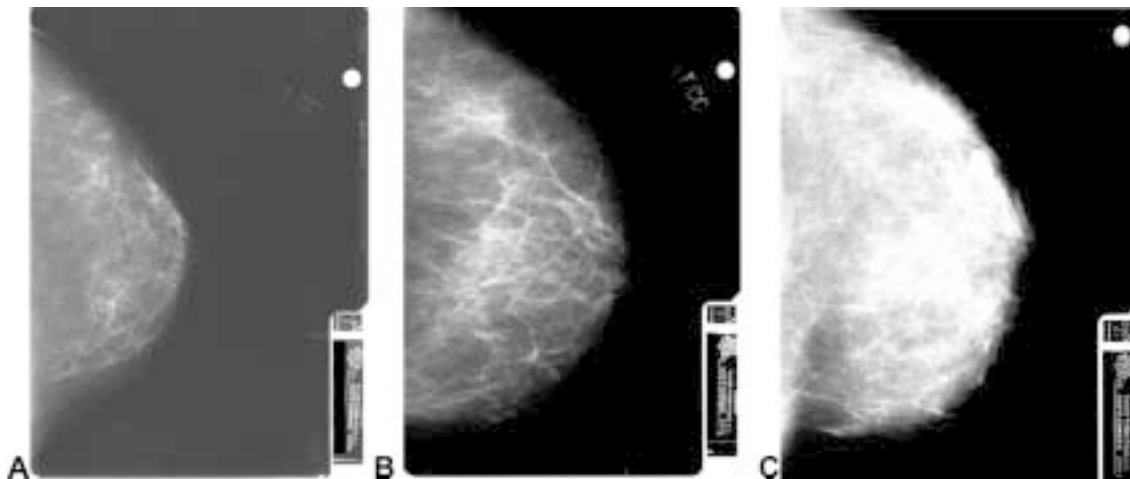


Figura 1. Las tres categorías de densidad mamaria: a) grasa, b) intermedia y c) densa.

séricas de estradiol, estrona, FSH, y el polimorfismo PvuII y XbaI.

Cuadro 1. Variables clínicas

Variable (n=87)	Media (Rango)	Media $\pm$ DE
Edad		49.8 $\pm$ 6.12 años
IMC		27.6 $\pm$ 4.7 kg/m ²
FSH	41.7 (0.6-223 IU/L)	
Estradiol	84.8 (4.9-928 pg/mL)	
Estrona	55.6 (1.2-778 pg/mL)	
Genotipos n (%)		
PP	16 (18.4%)	
Pp	37 (43.7%)	
pp	33 (37.9%)	
XX	8 (9.3%)	
Xx	33 (38.3%)	
xx	45 (52.3%)	
Densidad n (%)		
Grasa	29 (33.7)	
Intermedia	20 (23.2)	
Densa	37 (43.0)	

RESULTADOS

Se incluyeron 87 mujeres sanas. La edad media a la que se realizó la mastografía fue de 49.8 años (DE 6 $\pm$ 12 años). Las variables clínicas se observan en la cuadro 1. La densidad mamográfica se relacionó de manera importante con las concentraciones de estradiol ($r=0.21$, $p=0.04$), estrona ($r=0.21$, $p=0.04$) y negativamente con FSH ($r=-0.24$, $p=0.02$). Con análisis de regresión múltiple

se demostró la importante correlación negativa entre densidad mamaria y concentraciones de FSH ($p=0.02$) y el estado de menopausia ($p=0.02$). Sin embargo, no hubo diferencias entre las concentraciones de estradiol, estrona y FSH de acuerdo con los diferentes polimorfismos, esto pudo no hacerse evidente por el rango de edad de las pacientes. El IMC mostró una relación marginal con la densidad mamaria ($p=0.06$). La densidad mamaria grasa se relaciona con IMC mayor de 30. En cuanto a la relación del IMC con las diferentes variantes alélicas del polimorfismo PvuII ($p=0.59$) y XbaI ($p=0.99$) no se observó significado estadístico. La variante alélica Xx del genotipo XbaI se relacionó con la densidad mamaria grasa ($p=0.05$) (figura 2). En cambio, no se pudo demostrar por completo la asociación entre las variantes alélicas PvuII del receptor de estrógenos y la densidad mamaria.

DISCUSIÓN

En este estudio quedó de manifiesto la asociación significativa entre los diferentes tipos de densidad mamaria y las concentraciones de estradiol, estrona y FSH. La densidad mamaria no se relacionó con la edad, edad a la menarquia, número de embarazos, lactancia, como lo han reportado otros autores.^{8,9} El efecto de la mayor exposición a los estrógenos, como la menarquia temprana, la nuliparidad, la menopausia tardía, se ve reflejado en la densidad mamaria; sin

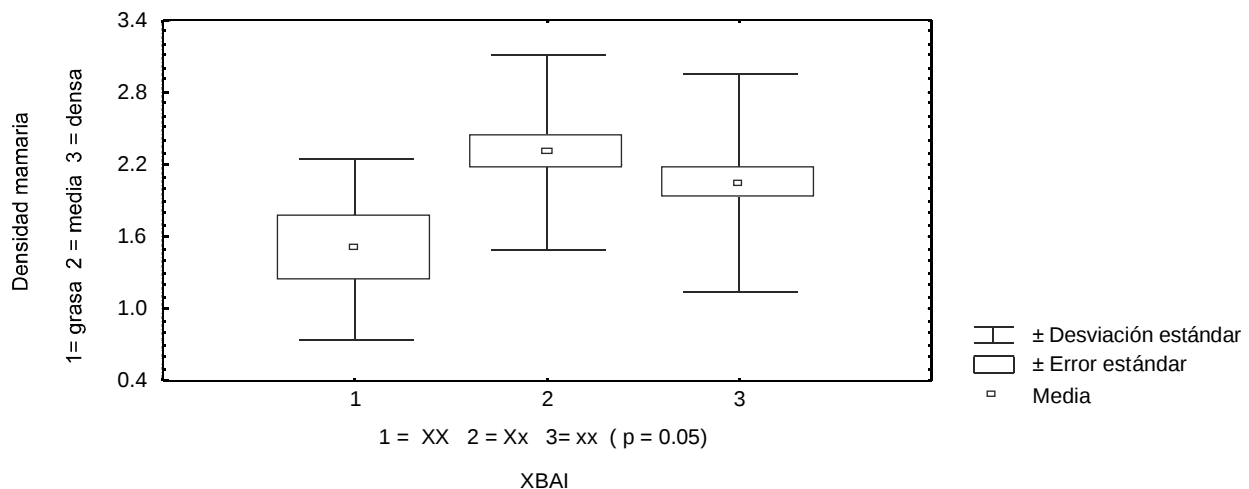


Figura 2. Distribución de la densidad mamaria en los tres genotipos de RE- α . El valor de p de la ANOVA de una vía, evalúa el efecto del genotipo RE- α .

embargo, estas variables no se correlacionaron de manera significativa (datos no reportados). Aunque se han realizado diversos estudios para conocer cuáles son los factores que determinan la densidad mamaria, no se ha establecido si sólo son los factores mencionados que incrementan la exposición a los estrógenos o participan también los factores genéticos. El estudio de las determinantes genéticas implica a los genes que intervienen en la biosíntesis de hormonas esteroides, como el gen de la aromatasa, capaz de metabolizar los andrógenos precursores de estrógenos (androstenediona, testosterona y dihidroepiandrosterona) para formar estrona, estradiol y estríol.¹⁰ No se ha podido establecer asociación significativa entre algún polimorfismo del gen de la aromatasa (CYP19) y la densidad mamaria.⁸ En un estudio efectuado en mujeres caucásicas, el genotipo de la aromatasa (CYP19) y la 17 α deshidroxilasa-liasa (CYP17) no resultaron ser un predictor significativo de la densidad mamaria (Haiman, et al).¹¹

El polimorfismo del receptor de estrógenos alfa se ha asociado en diversos estudios con el IMC, la densidad mineral ósea⁷ y la edad a la menarquia.¹² En este estudio se demostró la relación marginal entre el IMC y la densidad mamaria ($p=0.06$) pero no hubo concomitancia del IMC con las diferentes variantes génicas del receptor de estrógenos alfa.

En un estudio donde se exploró el efecto de las isoflavonas en la densidad mamaria se observó interacción entre el gen de la aromatasa y el receptor de estrógenos alfa. Además, se encontró interacción entre el grupo tratado con el polimorfismo PvuII y los cambios en el porcentaje de la densidad mamaria que se determinaron después del tratamiento.¹³ Nosotros no encontramos correlación entre las pacientes con el polimorfismo PvuII y las diferentes densidades mamográficas pero con las pacientes que presentaban la variante alélica Xx del polimorfismo XbaI hubo correlación marginal con la densidad mamaria grasa ($p=0.05$).

En conclusión, en este estudio se observó la influencia del genotipo Xx del receptor de estrógenos alfa en la densidad mamaria de tipo extremadamente graso. Para conocer su interacción con el riesgo de cáncer mamario es necesario realizar un estudio mayor

para observar los posibles cambios ante la exposición a estrógenos, como ocurre con la terapia de reemplazo hormonal. Esto ofrece nuevas perspectivas para el estudio y manejo de la terapia hormonal de reemplazo y el incremento en la densidad mamaria, y para la mejor comprensión de la regulación de la exposición de los diversos tejidos a los estrógenos, de una manera directa en el órgano diana.

REFERENCIAS

1. Buchanan JB, Weisburg BF, Sandoz JP, et al. Selected prognostic variables for mammographic parenchymal patterns. *Cancer* 1981;47:2135-37.
2. Robert D, Rosenberg MD, William C, Hunt MA, et al. Effects of age, breast density, ethnicity and oestrogen replacement therapy on screening mammographic sensitivity and cancer stage at diagnosis: review of 183,134 screening mammograms in Albuquerque, New Mexico. *Radiology* 1998;209:511-8.
3. Velasco E, Malacara JM, Cervantes F, Díaz de León J, Dávalos G. Gonadotropins and prolactin serum levels during the perimenopausal period: correlation with diverse factors. *Fertil Steril* 1990;53:56-60.
4. Malacara JM. Menopausia: nuevas evidencias, nuevos enigmas. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2003;11(2):61-72.
5. Weel AEAM, Uitterlinden AG, Westendorp ICD, et al. Estrogen receptor polymorphism predicts the onset of natural and surgical menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3146-50.
6. Lorentzon M, Lorentzon R, Bäckström T, Nordström P. Estrogen receptor gene polymorphism, but not estradiol levels, is related to bone density in healthy adolescents boys: A cross sectional and longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4597-601.
7. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996;11:306-11.
8. Haiman CHA, Bernstein L, Van Den Berg D, Ingles D, et al. Genetic determinants of mammographic density. *Breast Cancer Res* 2002;4:5.
9. Ursin G, Astrahan MA, Salane M, Parisky YR, et al. The detection of changes in mammographic densities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:43-47.
10. Melvin M, Grumbach RJ. Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(12):4677-94.
11. Haiman CA, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, et al. A polymorphism in CYP17 and endometrial cancer risk. *Cancer Res* 2001;61:3955-60.
12. Stavrou I, Zois C, Ioannidis JP, Tsatsoulis A. Association of polymorphisms of the oestrogen receptor alpha gene with the age of menarche. *Hum Reprod* 2002;17(4):1101-5.
13. Atkinson CH, Warren RTM, Sala V, Dowsett M, et al. Red clover-derived isoflavones and mammographic breast density: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial [ISRCTN42940165]. *Breast Cancer Research* 2004;6:R170-79.