



Susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama: detección del polimorfismo XbaI

Carlos Alberto Álvarez-Librado,* José Eduardo Quinto-Villalobos,* Eduardo Stalin García-López,* Enoc Mariano Cortés-Malagón,* José Bonilla-Delgado,* Xicoténcatl Jiménez-Villanueva,** Sonia Chávez-Ocaña,* Elvia García-Jiménez,* Mónica Sierra-Martínez,* Gustavo Acosta-Altamirano,*** Octavio Daniel Reyes-Hernández*

RESUMEN

Introducción. El cáncer de mama es un problema de salud pública en México. Una característica de esta enfermedad es que puede ser regulada por hormonas como los estrógenos. Un receptor que participa en la disponibilidad de estos compuestos es el ER_a. El gen del ER_a (ESR1) contiene en su secuencia un polimorfismo (XbaI), el cual está asociado al desarrollo de cáncer de mama. La frecuencia de XbaI ha sido muy poco estudiada en la población mexicana. **Objetivo.** Determinar la frecuencia de XbaI del gen ESR1, por medio de PCR-Tiempo Real, en un grupo de mujeres sanas y otro con cáncer de mama del Hospital Juárez de México (HJM). **Material y métodos.** Se evaluó la frecuencia de XbaI mediante PCR Tiempo-Real en 26 mujeres sanas y 27 con cáncer de mama. **Resultados.** De acuerdo con el análisis estadístico (χ^2) no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$), sin embargo, sí hubo diferencia en comparación con población europea ($p < 0.05$). **Conclusiones.** Esta fue la primera fase para identificar este polimorfismo en pacientes del HJM y se tendrá que aumentar el número de muestra para tener una frecuencia más representativa de la población que asiste al HJM, lo cual contribuirá a entender más sobre la etiología de esta enfermedad.

Palabras clave: Polimorfismo, SNP, XbaI, ESR1, ER_a, cáncer de mama.

ABSTRACT

Introduction. Breast cancer is a priority health in Mexico. This cancer is regulated by hormones as estrogens. ER_a is a ligand dependent receptor involved on estrogen disposition. ESR1, codifying gen of ER_a, contains the SNP XbaI, this polymorphism has been associated to breast cancer development. The XbaI frequency has been poor studied in Mexican population. **Objective.** Determine the XbaI frequency by Real-Time PCR, in a female health group and another female group having breast cancer from Hospital Juárez de México (HJM). **Material and methods.** XbaI was evaluated by Real-Time PCR in 26 health women and 27 breast cancer patients. **Results.** In accordance with statistic analysis (χ^2) a significative difference has not found among both groups ($p > 0.05$), by the other hand a significative difference has observed in comparison with European population ($p < 0.05$). **Conclusions.** This study has been the first attempt to identify this polymorphism in HJM patients and the increase of participants may contribute to obtain a more representative frequency according to HJM Mexican population.

Key words: Polymorphism, SNP, XbaI, ESR1, ER_a, breast cancer.

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos juegan un papel esencial en el desarrollo y progresión del cáncer de mama. Estas hormonas requieren de la participación de diversas enzimas para ejercer sus efectos biológicos. Dentro de las enzimas involucradas en la disponibilidad de hormonas sexuales femeninas se encuentra el receptor para estrógenos alfa (ER_a, por sus siglas

en inglés). Por otra parte, la diversa frecuencia con la cual se presenta el cáncer de mama a nivel mundial ha sido atribuida a diferencias en cuanto a la prevalencia de los factores que determinan la vida media de exposición a estrógenos. Lo anterior puede deberse a la existencia de variaciones genéticas entre las poblaciones, las cuales determinan la susceptibilidad a este tipo de cáncer. Dichas variaciones consisten principalmente en polimorfismos. Un tipo de polimorfismo muy común es el denominado polimorfismo de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) y consiste en un cambio en una sola base dentro de la secuencia de ADN, el cual puede generar modificaciones en los genes, que a su vez pueden dar lugar a alteraciones en

* Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, Unidad de Investigación del Hospital Juárez de México.

** Servicio de Oncología. Hospital Juárez de México.

*** Dirección de Investigación. Hospital Juárez de México.

los niveles de expresión o en la actividad de sus productos. Se han identificado diversos SNPs para el gen ESR1.¹ De hecho, se han propuesto varios SNPs de este gen como marcadores de importancia clínica en el desarrollo de enfermedades en la mujer (dependientes de estrógenos) como: endometriosis,²⁻⁵ osteoporosis⁶⁻⁹ y cáncer de mama.^{10,11} Uno de los SNPs más estudiados y que está asociado al desarrollo de cáncer de mama es *XbaI* (ID rs223493), sustitución A-G (cambio de adenina por guanina). Este polimorfismo recibe su nombre por la enzima de restricción que detecta el cambio de base A-G y genera un corte en la secuencia de ADN y se localiza en el intrón 1 del gen ESR1. Existen, por lo tanto, dos tipos de alelos, el que contiene A y el que presenta G, además la tendencia es que el más frecuente es el alelo portador de la base A y el que ha sido asociado al riesgo a desarrollar cáncer de mama.

Recientes estudios apoyan la hipótesis de que *XbaI* modifica la actividad estrogénica, así como la unión con sus factores transcripcionales.^{12,13} En un estudio en mujeres de Shanghai se determinó la presencia de *XbaI* con una frecuencia de 73.7%,¹⁴ mientras que Jakimiuk y cols.¹⁵ lo encontraron en una población de mujeres polacas con una frecuencia de 76.6%. En ambos trabajos se demostró que *XbaI* juega un papel en la etiología del cáncer de mama.

El cáncer de mama es una amenaza para la salud de la mujer a nivel mundial y es una prioridad en los países en vías de desarrollo. En México, desde 2006, el cáncer de mama es causante de un mayor número de muertes que el cáncer cervicouterino, por lo que representa un problema de salud pública en nuestro país y el lograr determinar un mayor número de marcadores de susceptibilidad para su detección permitirá aplicar una medicina preventiva. *XbaI* es un marcador genético asociado al riesgo de desarrollar cáncer de mama y, a pesar de que ya ha sido observado en diferentes poblaciones en el mundo, en México se sabe muy poco acerca de su frecuencia, a diferencia de otros marcadores de susceptibilidad. El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de *XbaI* del gen ESR1, por medio de PCR-Tiempo Real, en un grupo de mujeres sanas y otro con cáncer de mama del Hospital Juárez de México (HJM), con el propósito de demostrar que la frecuencia de este SNP será diferente entre ambos grupos de pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Se sometió la aprobación de este estudio por el Comité de Ética del HJM. Se incluyó un grupo de mujeres sin cáncer de mama ($n = 26$) y otro de mujeres con cáncer de

mama ($n = 27$) que asistieron al Servicio de Oncología del HJM. Previo a la obtención de las muestras biológicas se solicitó la firma de un consentimiento firmado por cada una de las pacientes.

Extracción e integridad del material biológico

Se extrajo el ADN a partir de biopsias de cáncer de mama mediante las condiciones especificadas del kit comercial NucleoSpin Triprep. Se determinó la concentración e integridad del material genético a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% [Invitrogen], la cual se disolvió por calentamiento en amortiguador 1X TBE (Tris-base 0.05 M [Sigma], ácido bórico 0.05 M [Mallinckrodt] y EDTA 0.5 M) más 10 mg/mL de bromuro de etidio [Sigma]. La electroforesis se llevó a cabo dentro de una cámara horizontal durante 30 min a 100 voltios. El ADN se visualizó mediante el uso de luz UV en un transiluminador.

Genotipificación mediante PCR-Tiempo Real

Para la identificación de *XbaI* se utilizó un termociclador acoplado a un espectrofotómetro StepOne (Applied Biosystems). La amplificación del alelo A y/o del alelo G se llevó a cabo mediante el uso de sondas Taqman y oligonucleótidos específicos. La sonda Taqman, para la detección del alelo A estaba marcada con el fluoroforo VIC, mientras que para el alelo G la sonda Taqman estaba marcada con el fluoroforo FAM.

Las amplificaciones fueron llevadas a cabo usando 5 μ L del reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix®, 0.25 μ L de oligonucleótidos (conteniendo 36 μ M de cada oligonucleótido and 8 μ M de sonda) y 20 μ g de ADN. El volumen de reacción final fue llevado a 20 μ L con agua inyectable. Se llevaron a cabo 40 ciclos de PCR donde los parámetros fueron: desnaturalización inicial a 95 °C 10 min, 15 s a 92 °C, seguido de 1 min a 60 °C. Después de cada amplificación por PCR Tiempo Real se realizó la discriminación alélica para determinar el genotipo de cada paciente.

Análisis estadístico: Determinación de las frecuencias alélicas

Se comparó la frecuencia de *XbaI* entre ambos grupos de estudio y se determinó si existía diferencia estadísticamente significativa mediante la prueba estadística χ^2 . En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.



RESULTADOS

La identificación de XbaI fue llevada a cabo mediante PCR-Tiempo Real (Figura 1).

La frecuencia alélica y genotípica de XbaI en las pacientes estudiadas en este trabajo se muestra en el cuadro 1. En el grupo de controles 18 pacientes fueron homocigotas para el alelo A (A/A), siete heterocigotas (A/G) y sólo una paciente homocigota para el alelo G (G/G). En el grupo de casos 15 mujeres fueron A/A, 11 A/G y sólo una paciente mostró el genotipo G/G. La frecuencia del SNP XbaI no mostró diferencia significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

Al comparar la frecuencia de XbaI con otras poblaciones en el mundo (Cuadro 2) encontramos que es similar a la observada en asiáticas y polacas, pero diferente de la frecuencia encontrada en población europea en general (64.56%).

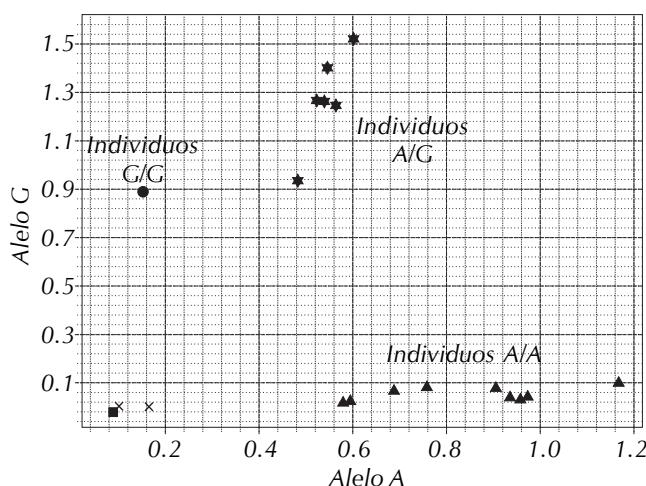


Figura 1. Determinación genotípica de XbaI. Imagen representativa de la distribución genotípica encontrada para XbaI por PCR-Tiempo Real. Los individuos A/A se indican con triángulos, individuos G/G con círculo, A/G se muestran con estrellas y los indeterminados con cruces. Control de no amplificación (NTC, cuadro negro).

Cuadro 1. Rango de edades y genotipos.

Variable	Genotipo	Controles	Casos
Edad (años)			
Rango		18-68	39-76
Media		41	54.18
Alelo XbaI			
	A/A	18	15
	A/G	7	11
	G/G	1	1

Cuadro 2. Frecuencia de XbaI en mujeres mexicanas respecto a otras poblaciones en el mundo.

Población	Individuos (n)	Frecuencia de alelo A (%)	Referencia
China	2235	73.71	14
Polonia	64	76.6	15
Europa*	8617	64.56	16
México	53	79.25	Este estudio

* Casos y controles del Consorcio de la Asociación de Cáncer de Mama (BCAC por sus siglas en inglés).

CONCLUSIONES

La asociación de los polimorfismos genéticos del ESR1 es relevante debido a la participación de este receptor como un regulador de la transcripción y el desarrollo de cáncer de mama. Se han reportado diversos polimorfismos para el gen ESR1, dentro de los cuales se encuentra el XbaI.

Ésta es una primera fase para la evaluación de este polimorfismo en pacientes del HJM y se pretende realizar en un mayor número de mujeres, lo que probablemente contribuya a detectar una diferencia significativa en la frecuencia de XbaI entre casos y controles. Aunado a lo anterior se deberán integrar datos que fortalezcan una asociación con el desarrollo de esta enfermedad, como estilo de vida y ciertos datos demográficos. El lograr definir a este polimorfismo como un marcador de susceptibilidad para desarrollar cáncer de mama contribuirá a entender más sobre la etiología del desarrollo de esta enfermedad.

REFERENCIAS

- National Center for Biotechnology Center. [Accessed November 15, 2009]. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, Dalkalitsis N, Paschopoulos M, Navrozoglou I, et al. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertil Steril* 1999; 72(1): 164-6.
- Kim SH, Choi YM, Jun JK, Kim SH, Kim JG, Moon SY. Estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism is associated with minimal or mild endometriosis. *Fertil Steril* 2005; 84(3): 774-7.
- Weiderpass E, Persson I, Melhus H, Wedrén S, Kindmark A, Baron JA. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* 2000; 21(4): 623-7.
- Xie J, Wang S, He B, Pan Y, Li Y, Zeng Q, et al. Association of estrogen receptor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms with endometriosis in a Chinese population. *Fertil Steril* 2009; 92(1): 54-60.



6. Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, et al. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet* 2000; 9(13): 2043-50.
7. Langdahl BL, Løkke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *J Bone Miner Res* 2000; 15(11): 2222-30.
8. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, et al. GENOMOS Study. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 2004; 292(17): 2105-14.
9. van Meurs JB, Schuit SC, Weel AE, van der Klift M, Bergink AP, Arp PP, et al. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet* 2003; 12(14): 1745-54.
10. Shin A, Kang D, Nishio H, Lee MJ, Park SK, Kim SU, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 80(1): 127-31. [PubMed: 12889606]
11. van Duijnhoven FJ, Bezemer ID, Peeters PH, Roest M, Uitterlinden AG, Grobbee DE, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and mammographic density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(11 Pt 1): 2655-60.
12. Herrington DM, Howard TD, Brosnihan KB, McDonnell DP, Li X, Hawkins GA, et al. Common estrogen receptor polymorphism augments effects of hormone replacement therapy on E-selectin but not C-reactive protein. *Circulation* 2002; 105(16): 1879-82.
13. Schuit SC, de Jong FH, Stolk L, Koek WN, van Meurs JB, Schoofs MW, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(2): 327-34.
14. Cai Q, Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Cheng JR, et al. Genetic polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and risk of breast cancer: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 853-9.
15. Jakimiuk A, Nowicka M, Bogusiewicz M, Adamiak A, Skorupski P, Miotla P, et al. Prevalence of estrogen receptor alpha Pvull and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. *Folia Histochem Cytophisiol* 2007; 45: 331-8.
16. Dunning AM, Healey CS, Baynes C, Maia AT, Scollen S, Vega A, et al. Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1131-9.

Solicitud de sobretiros:

Octavio D. Reyes-Hernández.
Av. Instituto Politécnico Nacional 5160,
Col. Magdalena de la Salinas,
Del. Gustavo A. Madero, C.P. 07760.
Tel.: +52-(55)-5747-7560, Ext. 7330.
Correo electrónico:
maiden_sp@yahoo.com.mx