

El Residente

## INVESTIGACIÓN - ORIGINAL

# Identificación del CYP3A5 en biopsias de pacientes mexicanas con cáncer de mama y su asociación con algunos factores clínico-patológicos

Cindy Rodríguez Bandala, \* Noemí Cárdenas Rodríguez, \*, \*\* Esaú Floriano Sánchez, \* Eleazar Lara Padilla \*

**RESUMEN. Antecedentes:** El cáncer de mama es un problema de salud pública en México y en el mundo. Las enzimas citocromo P450 metabolizan la mayoría de los fármacos antineoplásicos. El tamoxifeno es un modulador selectivo del receptor de estrógenos utilizado en el tratamiento y prevención del cáncer de mama. La conversión de tamoxifeno en el metabolito inactivo N-dimetil-tamoxifeno es efectuada por las enzimas CYP3A4 y CYP3A5. El propósito de esta investigación fue determinar la expresión proteica del CYP3A5 en biopsias de pacientes mexicanas con cáncer de mama. **Metodología:** Los tejidos se obtuvieron de especímenes de mastectomía radical. Para identificar al CYP3A5 se aplicó la técnica de inmunohistoquímica. **Resultados:** El CYP3A5 se identificó en el 100% de las pacientes estudiadas. Se encontró asociado a la edad ( $p = 0.03$ ), al índice de masa corporal ( $p = 0.03$ ), al sedentarismo ( $p = 0.02$ ), grupo sanguíneo (0.03) y al antecedente heredo-familiar de cáncer ( $p = 0.001$ ). El CYP3A5 se asoció con la proteína p53 ( $p = 0.05$ ) y mostró una correlación con el receptor de estrógeno  $r = 0.516$  ( $p = 0.01$ ). **Conclusiones:** El CYP3A5 se expresó en el 100% de las biopsias estudiadas, por lo que la expresión proteica intratumoral de CYP3A5 puede tener influencia sobre la respuesta del tumor hacia los fármacos antineoplásicos.

**Palabras clave:** Citocromo P450, CYP3A5, tamoxifeno. cáncer de mama.

**ABSTRACT. Background:** Breast cancer is a public health problem in Mexico and the whole world. Cytochrome P450 enzymes metabolize almost all the antineoplastic drugs. Tamoxifen is a selective modulator of estrogen receptor used in the treatment and prevention of breast cancer. The conversion of the inactive metabolite (tamoxifen N-dimethyl-tamoxifen) is realized by CYP3A4 and CYP3A5. The purpose of this research was to determine the protein expression of CYP3A5 in biopsies from Mexican patients with breast cancer. **Methodology:** The tissues were obtained from radical mastectomy specimens. To identify the CYP3A5 applied the technique of immunohistochemistry. **Results:** The CYP3A5 was identified in 100% of the patients studied. Was associated with age ( $p = 0.03$ ), body mass index ( $p = 0.03$ ), physical inactivity ( $p = 0.02$ ), blood group

\* Laboratorio de Oncología Molecular y Estrés Oxidante. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.

\*\* Laboratorio de Neuroquímica, Instituto Nacional de Pediatría.

Estos autores contribuyeron de manera equitativa en la realización del presente trabajo.

Dirección para correspondencia:

Esaú Floriano Sánchez

Av. Salvador Díaz Mirón s/n, esq. Plan de San Luis, Col. Casco de Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, 11340, México, D.F.  
Tel. 55 1338 3955. E-mail: floriano\_esa@hotmail.com

Recibido: 15 de noviembre del 2011

Aceptado con modificaciones: 22 de diciembre del 2011

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/elresidente>

(0.03) and family history of inherited-cancer ( $p = 0.001$ ). CYP3A5 was associated with p53 protein ( $p = 0.05$ ) and showed a correlation with estrogen receptor  $r = 0.516$  ( $p = 0.01$ ). **Conclusions:** The CYP3A5 was expressed in 100% of the tissues, the intratumoral proteic expression of CYP3A5 is involved in the tumoral response to anticancer drugs.

**Key words:** Cytochrome P450, CYP3A5, tamoxifen, breast cancer.

## Introducción

El cáncer de mama (CaM) es un problema de salud pública, prioritario por su magnitud y trascendencia, que se relaciona con las transiciones demográfica y epidemiológica del país.<sup>1</sup> Con el envejecimiento de la población y una mayor exposición a los factores de riesgo, esta patología ha cobrado año con año una relevancia mayor en la sociedad y los servicios de salud. En México, el CaM se convirtió en la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y la segunda causa de muerte por todas las enfermedades en mujeres de 30 a 54 años.<sup>2</sup> Los citocromos P450 representan una amplia clase de enzimas que contienen al grupo hemo; su función es catalizar diferentes reacciones del metabolismo de diversos sustratos, tanto endógenos como exógenos;<sup>3</sup> en el cáncer de mama se ha demostrado que participan en el metabolismo de fase I de varios agentes antineoplásicos como el tamoxifeno, el paclitaxel, el docetaxel y el lapatinib.<sup>4,5</sup> Actualmente, el uso de antiestrógenos (tamoxifeno) y los inhibidores de la aromatasas (anastrozol, exemestano, letrozol), están indicados para los tumores localizados de la mama y que son positivos para los receptores de estrógenos.<sup>6</sup> Tamoxifeno (TAM) es un modulador selectivo del receptor de estrógenos que se usa ampliamente para el tratamiento y prevención del cáncer de mama<sup>7</sup> teniendo una eficacia demostrada en la reducción del riesgo de cáncer de mama del 50%.<sup>8</sup> TAM actúa como antiestrogénico en tejido mamario interfiriendo con la actividad de los estrógenos. El tamoxifeno es metabolizado en las células del hígado o en tejidos extrahepáticos; en el hígado es metabolizado en: 4-hidroxi-TAM, N-dimetil-TAM y 4-hidroxi-N-dimetil-TAM. La transformación inicial de tamoxifeno puede producirse mediante dos vías: (i) la conversión de TAM en N-dimetil-TAM metabolizado por

los genes CYP3A4 y CYP3A5, y (ii) la formación de 4-hidroxi-TAM gracias a la participación de CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5.<sup>8</sup> La expresión de los CYP3A, así como su actividad, varía interindividualmente debido a una combinación entre factores genéticos y no genéticos tales como el estado hormonal y la salud del individuo, así como por el impacto de los estímulos ambientales.<sup>9</sup> En la población mexicana se desconoce si se expresa o no en tejido tumoral de la mama. Por lo tanto, el propósito de esta investigación es analizar la expresión proteica de CYP3A5 y su asociación con algunos factores clínico-patológicos en pacientes mexicanas con diagnóstico de CaM.

## Material y métodos

### Obtención de tejidos de CaM

Se realizó un estudio transversal, observacional, analítico, prospectivo. Se emplearon tejidos tumorales obtenidos de mastectomía radical de 24 pacientes mexicanas con diagnóstico histopatológico de CaM. Los tejidos fueron clasificados en los diferentes tipos histológicos por el departamento de Patología de la Clínica de Especialidades de la Mujer de la SEDENA.

### Inmunohistoquímica de biopsias de pacientes con cáncer de mama

Los tejidos se mantuvieron en formol 10% por un tiempo mínimo de 24 horas previa inclusión en parafina. Una vez que se obtuvieron los bloques, se hicieron los cortes y se montaron en portaobjetos impregnados con poli-L-lisina, llevándose a cabo la desparafinación de las laminillas. Posteriormente, se sometieron los tejidos a un tren de hidratación, se aplicaron 25  $\mu$ L de Avidina (Kit DakoCytomation) en cada tejido, se

incubaron a 4 °C por 15 minutos; transcurrido este tiempo, se lavaron con Tris. Posteriormente, se aplicaron 25 µL de biotina (DakocCytomation), se incubaron a 4 °C por 15 minutos, y se lavaron con Tris. Se aplicaron 25 µL de solución de peróxido de hidrogeno 6%, se incubaron a 4 °C por 15 min, se lavaron con Tris y se bloquearon nuevamente con el peróxido de hidrógeno 6%. Posteriormente se aplicó el anticuerpo primario en una dilución 1:100 con solución bloqueadora (Tritón 1%, suero anticaballo 5%, solución de borato 5%), se incubaron a 4 °C por 24 horas, se lavaron dos veces con solución Tris. Se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente a los anticuerpos primarios con una dilución 1:200 en solución bloqueadora, se incubaron a 4 °C por 2 horas, se lavaron dos veces con solución Tris. Posteriormente, se aplicaron 20 µL del complejo AB (Kit DakocCytomation) 1:200 con PBS estéril y se incubaron a 4 °C por 30 min, se lavaron con tres cambios de solución Tris. Se aplicaron 25 µL de la DAB (cromógeno dia minobencidina Kit DakocCytomation -1 mL de buffer más 15 µL de DAB-) en cada uno de los tejidos, luego se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min, evitando la exposición a la luz, se lavaron con agua desionizada para proceder a la tinción con hematoxilina de Meyer durante 5 min. Se lavaron con dos cambios de agua destilada, se colocaron en hidróxido de amonio por 30 s, se lavaron 3 a 5 veces con agua destilada. A continuación, se procedió a la deshidratación de los tejidos. Se aplicó la resina sintética (Golden Bell®) para el montaje. Finalmente, se observaron al microscopio AXIOVERT 200M (Carl Zeiss German) y se tomaron fotografías (cinco por campo) con la cámara AXIOCAM HRC (Carl Zeiss Germany) así como el análisis densitométrico con el software KS-300 Axion Vision versión 3.0 (Carl Zeiss Germany).

### Aspectos éticos

El proyecto fue aceptado por el Comité de Ética de la Clínica de Especialidades de la Mujer de la SEDENA con número de oficio SI-378.

### Análisis estadístico

Se aplicaron medidas de tendencia central, prueba chi cuadrada y prueba exacta de Fisher, así como correlación de Spearman. El software utilizado fue el SPSS para Windows v19.

### Resultados

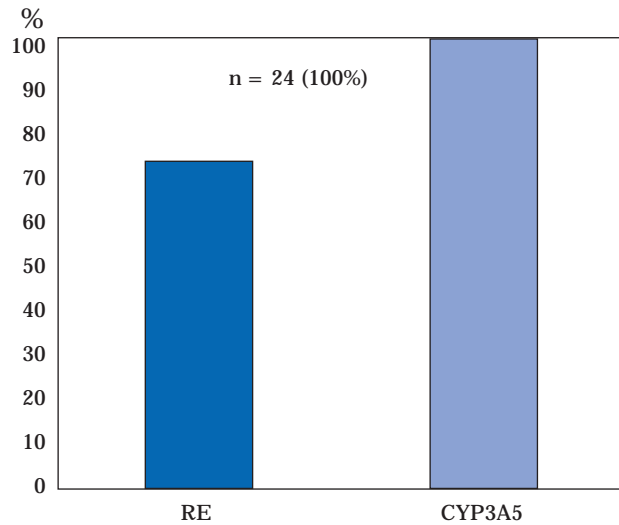
En el *cuadro I* se muestran los porcentajes de identificación de los marcadores histopatológicos estudiados así como del CYP3A5. El receptor de progesterona (RP) se identificó en el 66.7% de las pacientes, la proteína p53 mutada en un 87.5%, la proteína Ki67 en un 95.8%, CD34 en un 100%, el ErBb2 en un 75%, el receptor de estrógeno (RE) en un 75% y el CYP3A5 en un 100%. En la *figura 1* se muestra la gráfica donde se representa la frecuencia del RE y el CYP3A5.

En la *figura 2* se muestra la identificación en el foco tumoral del CYP3A5; la inmunotinción en color más oscuro se observa en el citoplasma de las células indiferenciadas (a). En el *cuadro*

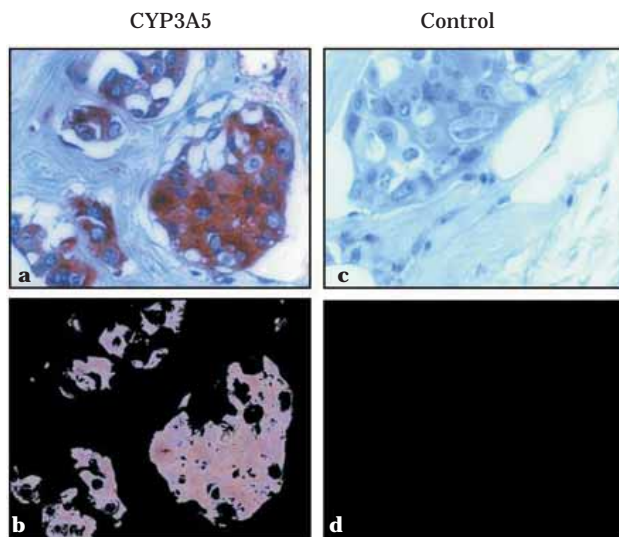
**Cuadro I.** Frecuencias de los marcadores histopatológicos y del CYP3A5.

	Frecuencia	%
CYP3A5		
Sí	24	100.0
No	0	0.0
Receptor estrógeno		
Sí	18	75.0
No	6	25.0
Receptor progesterona		
Sí	16	66.7
No	8	33.3
P53		
Sí	21	87.5
No	3	12.5
Ki67		
Sí	23	95.8
No	1	4.2
CD34		
Sí	24	100.0
No	0	0.0
ErBb2		
Sí	6	75.0
No	18	25.0

II se muestran las medidas de tendencia central del análisis densitométrico del CYP3A5; en cuanto al porcentaje de área marcada se obtuvo una media de 29, un valor mínimo de 1.07 y un valor máximo de 78.27. En cuanto a la densidad, el promedio fue de 93.35, un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 265. En el *cuadro III* se muestra la asociación de factores de ries-



**Figura 1.** Porcentaje de identificación del CYP3A5 y el receptor de Estrógenos (RE).



**Figura 2.** Identificación del CYP3A5. Se puede observar la inmunotinción positiva en color más oscuro en las células indiferenciadas (a) y la fotografía para el análisis densitométrico (b). Control de la técnica (d y c).

go y el CYP3A5; se encontró asociación entre el CYP3A5 y la edad de las pacientes ( $p = 0.03$ ); el índice de masa corporal ( $p = 0.03$ ), el sedentarismo ( $p = 0.02$ ), el grupo sanguíneo ( $p = 0.03$ ), antecedentes heredofamiliares de CaM ( $p = 0.001$ ), presentó una tendencia de asociación con el tipo histológico ( $p = 0.06$ ); sin embargo, con el grado histológico y con el estadio TNM no se encontró asociación. En el *cuadro IV* se muestra la correlación entre el CYP3A5 y el receptor de estrógeno con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.051 ( $p = 0.01$ ). No se encontró correlación con los demás marcadores

**Cuadro II.** Análisis densitométrico del CYP3A5.

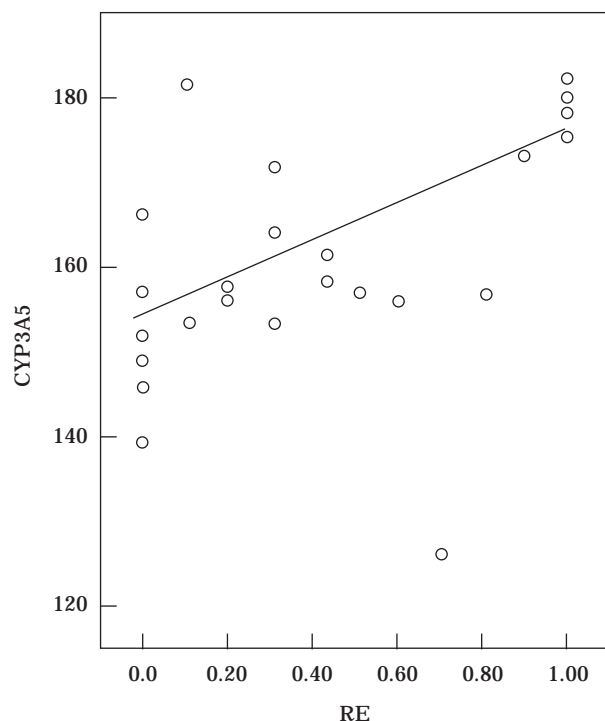
	% Área marcada	Densidad
Media	29.00	93.35
Mediana	26.00	76.56
Mínimo	1.07	0.00
Máximo	78.27	265.00

**Cuadro III.** Asociación de factores de riesgo y los citocromos P450 EN CaM.

	3A5
Edad	0.03 *
Índice de masa corporal (IMC)	0.03*
Sedentarismo	0.02*
Tabaquismo	0.5*
Etilismo	0.5*
Grupo sanguíneo	0.03*
Comorbilidad	0.90*
AHF de CaM	0.001*
Tipo histológico	0.6*
Grado histológico	0.4*
TNM	0.3*
	Valor p*

**Cuadro IV.** Correlación del CYP3A5 y el receptor de estrógeno.

CYP3A5	Coeficiente de Pearson (r)	0.516
	Valor p	0.010
	N	24.000



**Figura 3.** Correlación entre el CYP3A5 y el receptor de estrógenos (RE) y un coeficiente de correlación de Pearson® de 0.51 ( $p = 0.01$ ).

histopatológicos estudiados y mencionados en el *cuadro I*. En la *figura 3* se observa el gráfico donde se muestra la correlación entre el análisis densitométrico del CYP3A5 y el RE.

### Discusión

Debido a su enorme capacidad metabólica para diversos sustratos CYP3A5, en conjunto con CYP3A4 y 3A7, constituye una de las más importantes enzimas metabolizadoras de xenobióticos en humanos. La familia CYP3A se expresa, en forma predominante pero no exclusiva, en el hígado y en el intestino participando en el metabolismo del 45-60% de los fármacos clínicamente usados y de otros compuestos tales como esteroides y algunos carcinógenos.<sup>9</sup> La expresión de los CYP3A, así como su actividad, varía interindividualmente debido a una combinación entre factores genéticos y no genéticos tales como el estado hormonal, la salud del individuo así como por el impacto de los estímulos ambientales.<sup>9</sup> En

el presente trabajo se identificó, por primera vez, la expresión proteica de CYP3A5 en muestras de pacientes con cáncer de mama de una población mexicana así como su asociación con algunos factores clínico-patológicos. Murray et al en 2010 realizaron un perfil de expresión de varios citocromos en cáncer de mama en una población caucásica encontrando un mayor porcentaje de expresión para los CYP 4X1, 2S1, 2U1, 2J, 3A43, 2A y 2B, descubriendo también una fuerte correlación de CYP3A5 con los RE.<sup>10</sup> En el presente estudio se identificó la expresión de CYP3A5 en todos los tumores y una correlación con la expresión de los RE. Varios de los citocromos que se encuentran correlacionados con la expresión de los RE se encuentran involucrados en la vía metabólica o biosintética de los estrógenos. Con respecto a lo anterior, en otro estudio se ha observado que CYP3A5 participa en la oxidación de estrona al metabolizarla como 16 $\alpha$ -hidroxiestrona.<sup>11</sup> En otros estudios se ha demostrado la presencia del mRNA de CYP3A5 en cáncer de mama,<sup>12,13</sup> lo que indica que la presencia de este CYP puede inducir *in situ* la bioactivación de xenobióticos y la generación de metabolitos inactivos de antineoplásicos como el tamoxifeno en el tejido mamario.

En otro estudio se demostró que el tamoxifeno, N-desmetiltamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno y 3-hidroxitamoxifeno inhiben de manera reversible la actividad del cADN de CYP3A5.<sup>14</sup> Lo anterior indica que el tamoxifeno y tres de sus principales metabolitos son inhibidores *in vitro* de la expresión de CYP3A5.<sup>14</sup> En otro estudio realizado en población asiática se observó que pacientes con presencia de polimorfismos de un solo nucleótido en CYP3A4 y 3A5 tratadas con docetaxel presentaron efectos secundarios tales como fiebre y neutropenia.<sup>15</sup> Los estudios anteriores indican que una variación en la estructura o expresión de CYP3A5 puede inducir un cambio en su capacidad metabolizadora de fármacos antineoplásicos y que, a su vez, algunos metabolitos de estos fármacos pueden inhibir su actividad a partir de la modulación de los receptores nucleares de pregnanos (PXR).<sup>16</sup> La expresión de CYP3A5 se encontró también



asociada a la edad, el IMC, el sedentarismo, el grupo sanguíneo y los antecedentes heredo-familiares. Los resultados anteriores indican que la expresión de este CYP es dependiente del estilo de vida, los factores genéticos y el estado metabólico de cada individuo como han reportado varios estudios.<sup>17-19</sup>

## Conclusiones

Los resultados anteriores indican que la expresión proteica del CYP3A5 es dependiente de la variabilidad interindividual y puede tener influencia sobre la respuesta del tumor hacia los fármacos antineoplásicos.

## Bibliografía

- Boyle P, Levin B. World Cancer Report 2008. World Health Organization International. Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in Mexico: A pressing priority. *Reproductive Health Matters* 2008; 16(32): 113-123.
- Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007; 11: 259-273.
- Veronesi U, Surrida S. Breast cancer surgery: a century after Halsted. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 74-77.
- Beaulieu N, Bloom D, Bloom R. Breakaway: The global burden of cancer-challenges and opportunities. The Economist Intelligence Unit, The Economist. 2009.
- Carpenter R, Miller WR. Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93 Suppl 1: S1-5. Review.
- Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998; 339(22): 1609-1618.
- Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Wade JL, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman Y. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. The NSABP Study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA* 2006; 295(21): 2727-2743.
- Wojnowski L, Kamdem LK. Clinical implications of CYP3A polymorphisms. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006; 2(2): 171-82.
- Murray GI, Patimalla S, Stewart KN, Miller ID, Heys SD. Profiling the expression of cytochrome P450 in breast cancer. *Histopathology* 2010; 57(2): 202-11.
- Cribb AE, Knight MJ, Dryer D, Guernsey J, Hender K, Tesch M, Saleh TM. Role of polymorphic human cytochrome P450 enzymes in estrone oxidation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(3): 551-8.
- Iscan M, Klaavuniemi T, Coban T, Kapucuoglu N, Pelkonen O, Raunio H. The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 70(1): 47-54.
- Huang Z, Fasco MJ, Figge HL, Keyomarsi K, Kaminsky LS. Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors. *Drug Metab Dispos* 1996; 24(8): 899-905.
- Zhao XJ, Jones DR, Wang YH, Grimm SW, Hall SD. Reversible and irreversible inhibition of CYP3A enzymes by tamoxifen and metabolites. *Xenobiotica* 2002; 32(10): 863-78.
- Tsai SM, Lin CY, Wu SH, Hou LA, Ma H, Tsai LY, Hou MF. Side effects after docetaxel treatment in Taiwanese breast cancer patients with CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 gene polymorphisms. *Clin Chim Acta* 2009; 40: 4(2):160-5.
- Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 18: 54(10): 1271-94.
- Desta Z, Kreutz Y, Nguyen AT, Li L, Skaar T, Kamdem LK, Henry NL, Hayes DF, Storniolo AM, Stearns V, Hoffmann E, Tyndale RF, Flockhart DA. Plasma letrozole concentrations in postmenopausal women with breast cancer are associated with CYP2A6 genetic variants, body mass index, and age. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90(5): 693-700.
- Solas C, Bourgarel-Rey V, Quaranta S, Rome A, Simon N, Lacarelle B, Andre N. Impact of plasma and intracellular exposure and CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1 genetic polymorphisms on vincristine-induced neurotoxicity. *Guilhaumou R, Cancer Chemother Pharmacol* 2011. DOI: 10.1007/s00280-011-1745-2.
- Sailaja K, Rao DN, Rao DR, Vishnupriya S. Analysis of CYP3A5\*3 and CYP3A5\*6 gene polymorphisms in Indian chronic myeloid leukemia patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(3): 781-4.