



ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
“DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO”  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR DE CYP2D6 Y  
POLIMORFISMO -582C>T DEL GEN *TC21/RRAS2* EN VOLUNTARIOS  
SANOS Y PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**

Trabajo de Grado presentado por el Médico Cirujano Carlos José Gregorio Flores Angulo, ante el Área de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo Sede Aragua, para optar al Título de Magister en Ciencias Biomédicas Mención Bioquímica y Biología Molecular.

Tutora: Dra. Nancy de La Trinidad Moreno de Martínez

Maracay, 23 de enero de 2015



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
"DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO"  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR DE CYP2D6 Y  
POLIMORFISMO -582C>T DEL GEN *TC21/RRAS2* EN VOLUNTARIOS  
SANOS Y PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**

**Por:**

CARLOS JOSÉ GREGORIO FLORES ANGULO,  
MÉDICO CIRUJANO

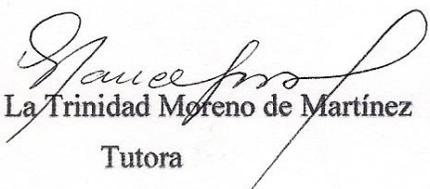
Maracay, 23 de enero de 2015

UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
"DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO"  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**AVAL DEL TUTOR**

Quien suscribe, Nancy de La Trinidad Moreno de Martínez, titular de la cédula de identidad N° V-3.216.508, en mi carácter de Tutora del Trabajo de grado titulado: **DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR DE CYP2D6 Y POLIMORFISMO -582C>T DEL GEN TC21/RRAS2 EN VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**, presentado por el ciudadano Médico Cirujano Carlos José Gregorio Flores Angulo, titular de la cédula de identidad N° V-15.991.697, para optar al título de Magister en Ciencias Biomédicas Mención Bioquímica y Biología Molecular, considero que dicho trabajo reúne los requisitos para ser sometido a la evaluación por el jurado designado para tal efecto.

En Maracay a los 15 días del mes de octubre de 2014.

  
Nancy de La Trinidad Moreno de Martínez

Tutora



*Universidad de Carabobo*  
*Facultad de Ciencias de la Salud*  
*Dirección de Asuntos Estudiantiles*  
*Sede Aragua*



**ACTA DE VEREDICTO**  
**TRABAJO DE ESPECIAL DE GRADO**

Nosotros, miembros del jurado designado para la evaluación del trabajo especial de grado  
Titulado:

**“DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR DE CYP2D6 Y POLIMORFISMO -582C>T DEL  
GEN TC21/RRAS2 EN VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA”**

Presentado por: FLORES ANGULO, CARLOS JOSÉ GREGORIO  
Cédula de Identidad; V-15.991.197

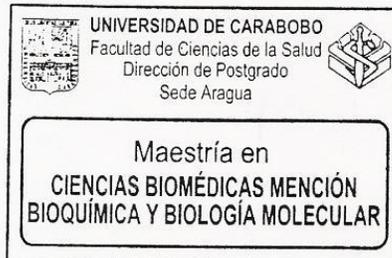
Para optar al Título de: MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MENCIÓN BIOQUÍMICA  
Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Estimamos que el mismo reúne los requisitos por lo cual es: APROBADO, ya que cumple con lo establecido en el Capítulo X, Sección Cuarta en su artículo 129 del Reglamento de los Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, el cual reza: “El trabajo de grado es el resultado del estudio, que demuestra la capacidad crítica, analítica, constructiva en un contexto sistémico y de dominio teórico y metodológico de la investigación aplicada en la respectiva área del conocimiento del cursante, ...”. Asimismo, consideramos que el trabajo hace un aporte significativo para el beneficio de las pacientes con cáncer de mama, por lo cual, se le otorga la Mención Honorífica y la Mención Publicación.

Maracay a los 23 del mes de enero de 2015

Dra. Flor Herrera  
C.I:632.632

Dr. Heriberto Correia  
C.I:7.196.872



Dr. Richard Beylouné  
C.I:13.271.661



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**

*Año Jubilar Marzo 2012 - 2013*

*Dirección de Asuntos Estudiantiles*

*Sede Aragua*

*Rif. 20000041-4*

**ACTA DE DISCUSIÓN  
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 29 literal "N" del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Maestría titulado:

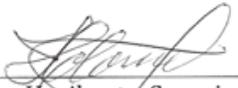
**"DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR DE CYP2D6 Y POLIMORFISMO -582C>T DEL GEN TC21/RRAS2 EN VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA"**

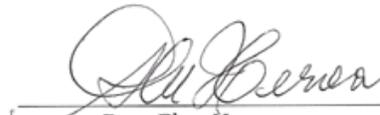
Presentado para optar al grado de **MAGISTER EN CIENCIAS BIOMEDICAS, MENCION BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR** por el aspirante:

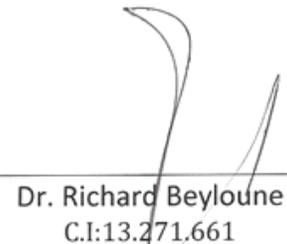
**CARLOS JOSÉ GREGORIO FLORES ANGULO  
C.I. V-15.991.197**

Habiendo examinado el Trabajo presentado, decidimos que el mismo está **APROBADO**.

Maracay a los 23 del mes de enero de 2015

  
Dr. Heriberto Correia  
C.I:7.196.872

  
Dra. Flor Herrera  
C.I:632.632

  
Dr. Richard Beylouné  
C.I:13.271.661



*Gilda Marciano 23.01.15*

*"Democracia y Autonomía, garantía de presente y futuro Universitario"*  
*Final Av. Leonardo Ruiz Pineda - La Morita - Edo. Aragua*  
*Telf. 0243-2710520 - 2713471 ext. 207*

## **DEDICATORIA**

A los pacientes afectados por cáncer de mama, los cuales han motivado, impulsado y mantenido mi entusiasmo por la investigación.

Dedico este manuscrito, por todo el apoyo recibido, a mi familia biológica y académica, especialmente a mi mamá Yajaira Angulo, a mi hermana Yocelin Flores, a la Dra. Nancy Moreno y al Prof. José A Martínez quienes me han transferido generosamente todos sus conocimientos.

## **AGRADECIMIENTO**

Se agradece al personal médico, de enfermería, administrativo del Instituto de Senología de Aragua (ISENA) por la colaboración en la toma de muestras.

Un reconocimiento especial merece el personal de la Sección de Polimorfismos Genómicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y estudiantes de la maestría de Ciencia Biomédicas de la Universidad de Carabobo Sede Aragua, Licencias Teresa Oropeza, Narviz Pulido, Cecilia Villegas y Yuselin Mora por la colaboración prestada durante la realización de algunos ensayos.

A los Drs. Flor Herrera, Heriberto Correia y Francisco Rodríguez por permitir la utilización de varios de los equipos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

Este trabajo recibió financiamiento del Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Innovación de la República Bolivariana de Venezuela a través del Proyecto PEII 2012001248.

## ÍNDICE GENERAL

### CAPÍTULO I

	Pag.
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1-6</b>
1.1 Planteamiento del problema.....	1
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo general.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	5

### CAPÍTULO II

	Pag.
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>7-33</b>
2.1 Cáncer de mama.....	7
2.1.1 Epidemiología del cáncer de mama.....	7
2.1.2 Dependencia estrogénica en el cáncer de mama.....	9
2.1.2.1 Efectos genómicos de los estrógenos.....	11
2.1.2.2 Efectos no genómicos de los estrógenos.....	12
2.2 Terapia endocrina del cáncer de mama.....	13
2.2.1 Cáncer de mama temprano (Estadio I o IIA).....	14
2.2.2 Cáncer de mama localmente avanzado (Estadio IIB o III).....	16
2.2.3 Cáncer de mama metastásico y enfermedad recurrente.....	16
2.2.4 Quimioprevención del cáncer de mama.....	18

2.3 Metabolismo y mecanismo de acción del tamoxifeno.....	19
2.4 Resistencia al tamoxifeno.....	21
2.4.1 Citocromo P450.....	22
2.4.2 Polimorfismos del gen <i>CYP2D6</i> .....	24
2.4.3 Tipos de metabolizadores de acuerdo al genotipo del <i>CYP2D6</i> .....	26
2.4.4 Impacto clínico de los fenotipos metabolizadores de <i>CYP2D6</i> en la respuesta al tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama.....	27
2.4.5 <i>TC21/RRAS2</i> y su participación en la respuesta al tamoxifeno.....	31

### CAPÍTULO III

	Pag.
<b>MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>34-44</b>
3.1 Tipo y diseño de investigación.....	34
3.2 Población y muestra.....	34
3.2.1 Grupo de referencia.....	35
3.2.2 Grupo de enfermos.....	35
3.2.2.1 Identificación de pacientes con características de cáncer de mama hereditario/familiar.....	36
3.3 Extracción de ADN.....	37
3.4 Estandarización de la amplificación de secuencias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	37
3.5 Determinación del genotipo de <i>CYP2D6</i> y <i>TC21</i> .....	40
3.6 Reconstrucción de los haplotipos del gen <i>CYP2D6</i> y determinación del fenotipo metabolizador.....	41

3.7 Análisis combinado de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 y los genotipos de <i>TC21</i> .....	43
3.8 Análisis estadístico.....	43
3.8.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento.....	43
3.8.2 Análisis descriptivo.....	44
3.9 Declaración de conflicto de interés.....	44

## CAPÍTULO IV

	Pag.
<b>RESULTADOS</b> .....	45-63
4.1 Características del grupo de referencia.....	45
4.2 Características clínicas y del tumor de los pacientes.....	45
4.2.1 Frecuencia del cáncer de mama hereditario/familiar.....	49
4.3 Condiciones de amplificación de secuencias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	50
4.4 Frecuencia genotípica del gen <i>CYP2D6</i> y <i>TC21/RRAS2</i> .....	51
4.5 Frecuencia de las variantes alélicas 1846G>A ( <i>CYP2D6</i> *4), 1707delT ( <i>CYP2D6</i> *6) y 100C>T ( <i>CYP2D6</i> *10) del gen <i>CYP2D6</i> y -582C>T de <i>TC21</i> .....	52
4.6 Frecuencia haplotípica y del fenotipo metabolizador de <i>CYP2D6</i> .....	59
4.7 Análisis combinado de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 y los genotipos de <i>TC21</i> .....	59
4.8 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento.....	63

## **CAPÍTULO V**

	Pag.
<i><b>DISCUSIÓN</b></i> .....	64
<b>CONCLUSIONES</b> .....	75
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	76
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	77

## ÍNDICE DE GRÁFICOS, FIGURAS Y TABLAS

### GRÁFICOS

	Pag.
1 Mortalidad por neoplasias malignas en mujeres por grupo etario, Venezuela año 2011.....	8

### FIGURAS

	Pag.
1 Metabolismo del tamoxifeno e interacción con el receptor de estrógenos....	20
2 Citocromo P450.....	23
3 Representación esquemática del gen <i>CYP2D6</i> y ubicación de las variantes 1846G>A ( <i>CYP2D6*4</i> ), 1707delT ( <i>CYP2D6*6</i> ) y 100C>T ( <i>CYP2D6*10</i> )..	24
4 Genealogía del caso 1 sospecho de cáncer de mama hereditario/familiar.....	50
5 Visualización de los genotipos del polimorfismo 1846G>A ( <i>CYP2D6*4</i> ) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%.....	53
6 Visualización de los genotipos del polimorfismo 1707delT ( <i>CYP2D6*6</i> ) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%.....	54
7 Visualización de los genotipos del polimorfismo 100C>T ( <i>CYP2D6*10</i> ) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 11%.....	55
8 Visualización de los genotipos del polimorfismo -582 del gen <i>TC21</i> mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%.....	56

## TABLAS

	Pag.	
1	Iniciadores usados para la amplificación mediante PCR de secuencias del gen <i>CYP2D6</i> y <i>TC21</i> .....	39
2	Fragmentos de restricción esperados en los polimorfismos 1846G>A ( <i>CYP2D6</i> *4), 1707delT ( <i>CYP2D6</i> *6) y 100C>T ( <i>CYP2D6</i> *10) del gen <i>CYP2D6</i> y -582C>T de <i>TC21</i> mediante el Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción.....	41
3	Haplotipos de <i>CYP2D6</i> .....	42
4	Características clínicas de los pacientes.....	46
5	Frecuencia del estadio clínico del cáncer de mama al momento del diagnóstico.....	47
6	Frecuencia del tipo molecular cáncer de mama.....	48
7	Condiciones óptimas de amplificación mediante PCR de las secuencias que contienen a las variantes alélicas <i>CYP2D6</i> *4, <i>CYP2D6</i> *6, <i>CYP2D6</i> *10 y -582C>T de <i>TC21</i> .....	51
8	Frecuencia alélica de los polimorfismos 1846G>A ( <i>CYP2D6</i> *4), 1707delT ( <i>CYP2D6</i> *6), 100C>T ( <i>CYP2D6</i> *10) y -582C>T de <i>TC21</i> obtenida en la muestra de voluntarios aparentemente sanos y pacientes con cáncer de mama.....	57
9	Frecuencia de los alelos *1, *4, *6 y *10 del gen <i>CYP2D6</i> obtenida en la muestra de voluntarios aparentemente sanos evaluados en el presente trabajo y otras poblaciones.....	58
10	Frecuencia haplotípica del <i>CYP2D6</i> en la muestra de voluntarios aparentemente sanos evaluados en el presente trabajo y en diferentes poblaciones.....	60
11	Frecuencia haplotípica y del fenotipo metabolizador de <i>CYP2D6</i> obtenida en la muestra de voluntarios aparentemente sanos y pacientes con cáncer de mama.....	61
12	Frecuencia del fenotipo responder del tamoxifeno obtenido del análisis combinado de los fenotipos metabolizadores de <i>CYP2D6</i> y los genotipos de <i>TC21</i> .....	62

## RESUMEN

### DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO METABOLIZADOR DE CYP2D6 Y POLIMORFISMO -582C>T DEL GEN *TC21/RRAS2* EN VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

**AUTOR:**

CARLOS JOSÉ GREGORIO FLORES ANGULO

**TUTORA:**

DRA. NANCY DE LA TRINIDAD MORENO DE MARTÍNEZ

El cáncer de mama es una enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada del tejido mamario. Dentro de las estrategias terapéuticas indicadas en pacientes con tumores hormonodependientes se encuentra el tamoxifeno con recidivas del 30-50%. Esta situación es explicada, en parte, por la presencia de polimorfismos en genes que codifican proteínas vinculadas con la farmacocinética (*CYP2D6*) y farmacodinamia (*TC21/R-Ras2*). La frecuencia de los diferentes alelos de *CYP2D6* y *TC21/RRAS2* varía significativamente de una población a otra. En virtud que en Venezuela existen escasos datos sobre el estudio de estos genes y por ser el cáncer de mama la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, se planteó como objetivo generar conocimiento sobre las variantes \*4, \*6 y \*10 del gen *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* en una muestra de residentes del Estado Aragua y un grupo de pacientes con cáncer de mama atendidos en el Instituto de Senología de Aragua. Se obtuvo el consentimiento informado y se realizó un análisis descriptivo, clínico y molecular, este último basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada al Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción. El análisis estadístico fue realizado mediante los programas SPSS, PHASE, ARLEQUÍN y POPGENE. Se determinaron las características de las muestras de referencia y pacientes, la frecuencia genotípica y alélica de los genes *CYP2D6* y *TC21/RRAS2*, se infirió el fenotipo metabolizador de *CYP2D6* basado en un análisis haplotípico y el fenotipo responder del tamoxifeno mediante un análisis combinado de *CYP2D6* y *TC21/RRAS*. La distribución de alelos y haplotipos tiene diferencias significativas en relación a otras poblaciones. El 34,5% y 41,7% de los sujetos que componen el grupo de referencia y pacientes, respectivamente, poseen un perfil genético de respondedor bueno al tamoxifeno, mientras que 65,5% y 58,3% en cada grupo tienen características de responder intermedio y malo a dicho fármaco. Los conocimientos generados en esta investigación contribuyen a la formación de bases de datos para el desarrollo de estudios de farmacogenética del tamoxifeno y otros fármacos, con el fin de determinar el impacto clínico de las variantes génicas estudiadas.

Palabras clave: *CYP2D6*, *TC21/RRAS2*, Cáncer de mamá, Tamoxifeno, Maracay y Farmacogenética.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Planteamiento del problema:

El cáncer de mama es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación maligna del tejido mamario como consecuencia de una serie de alteraciones moleculares que originan la extensión y propagación de células con características inmortales y crecimiento descontrolado (Stopeck, 2012).

En Venezuela, el cáncer ocupa el segundo lugar en las causas de muerte (15,61%), siendo el cáncer de mama la primera causa de muerte por cáncer en mujeres (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2014).

Una de las estrategias terapéuticas indicadas en los pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales positivos es la terapia endocrina, aconsejada en pacientes pre- y post-menopáusicas en todos los estadios clínicos de acuerdo a ciertos esquemas (NCCN, 2012; Sausville y Long, 2008). El agente farmacológico de este grupo empleado con más frecuencia es el tamoxifeno, el cual suprime la proliferación celular dependiente del receptor del estrógeno en el cáncer de mama (Lahusen y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2012).

Se ha determinado que en Venezuela el 66,39% de las pacientes con cáncer de mama son tratadas con tamoxifeno (Bergamo y cols., 2011), empero estudios realizados en otras poblaciones han demostrado que el 30 a 50% de los pacientes no responden a esta terapia (Arpino y cols., 2008; Hoskins y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2012). Esta situación puede deberse a la presencia de diversos polimorfismos en los genes que codifican a las enzimas de fase I y II que participan en la activación e inactivación del tamoxifeno, respectivamente (Tan y cols., 2008; Hoskins y cols., 2009); y por condiciones moleculares en la célula diana que la hacen menos sensible

a los antagonistas de los receptores involucrados en el crecimiento (Fernández y cols., 2004).

Una de las enzimas más ampliamente estudiadas es el Citocromo P450 familia 2, subfamilia D e isoforma 6 (CYP2D6) debido a que participa en la generación de los dos metabolitos activos principales del tamoxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno y el 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno, por lo que sus polimorfismos se han vinculado a la variabilidad en la respuesta clínica (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, 2013; Whirl-Carrillo y cols., 2012).

En el gen que codifica la enzima CYP2D6 se han descrito más de 80 polimorfismos (The Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Database, 2014), los cuales se encuentran clasificados en cuatro categorías de acuerdo a la afectación de la actividad enzimática, los que generan una proteína sin función, con actividad disminuida, normal o incrementada (Dorado y cols., 2005). De acuerdo a la combinación de los diferentes alelos del gen *CYP2D6*, la población puede clasificarse en cuatro tipos de metabolizadores: a) Ultrarrápidos; b) Rápidos; c) Intermedios; y d) Lentos o pobres (Brauch y cols., 2009; Swen y cols., 2011).

Los resultados de los estudios clínicos que analizan la relación de los alelos lentos e intermedios con una pobre respuesta terapéutica en comparación con los pacientes con alelos rápidos no son complemente uniformes.

En relación al intervalo libre de enfermedad, se ha demostrado que los pacientes metabolizadores lentos e intermedios tiene mayor recurrencia que los metabolizadores rápidos ( $p < 0,05$ ) (Kiyotani y cols., 2008; Schroth y cols. 2009; Kiyotani y cols., 2010; Thompson y cols., 2011; Teh y cols., 2012), sin embargo otros grupos han encontrado resultados contrarios (Goetz y cols., 2005; Wegman y cols., 2007). En la supervivencia libre de enfermedad también existen datos contradictorios, unos grupos han determinado asociación (Xu y cols., 2008; Sirachainan y cols., 2012; Sukasem y cols., 2012; Ramon y cols., 2010; Schroth y

cols., 2010), mientras que otros no han encontrado diferencias significativas (Goetz y cols., 2005) al comparar a los metabolizadores rápidos con los lentos e intermedios. Resultados similares han sido encontrados por diferentes equipos de investigadores al estudiar la supervivencia global (Goetz y cols., 2005; Nowell y cols., 2005; Bijl y cols., 2009; Schroth y cols., 2010; Lammers y cols., 2010).

La poca uniformidad de los resultados clínicos también se encuentra reflejada en la conducta de diferentes asociaciones, mientras que el *Dutch Pharmacogenetics Working Group* recomiendan el uso del tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama en función del genotipo del *CYP2D6* (Swen y cols., 2011), la *National Comprehensive Cancer Network* y la *American Society of Clinical Oncology* aún no lo han establecido como regla (Visvanathan y cols., 2009; NCCN, 2012). Tales contradicciones pueden deberse al diseño metodológico empleado que no siempre incluye a pacientes con las mismas características, al número de polimorfismos evaluados y a la influencia de otros genes con frecuencias teóricamente diferentes de acuerdo a la población considerada.

Otra molécula asociada a la respuesta al tratamiento con tamoxifeno es la proteína TC21/R-Ras2, cuya expresión puede modificarse por la presencia de polimorfismos ubicados en el promotor del gen *TC21/RRAS2*; así, se ha determinado que la presencia de la variante -582C>T se ha vinculado con sobreexpresión de la proteína lo cual ha sido asociado a resistencia del tratamiento con tamoxifeno en cáncer de mama (Rokavec y cols., 2008; Mendes-Pereira y cols., 2012).

Estudios poblacionales han demostrado que la frecuencia de los polimorfismos del gen *CYP2D6* y *TC21/RRAS2* varía considerablemente de una población a otra (National Center for Biotechnology Information, 2013; Sistonen y cols., 2007). En Venezuela existen pocos datos sobre los polimorfismos de *CYP2D6* (Griman y cols., 2009; Flores-Angulo, 2012) y hasta la fecha no se han reportado estudios que analicen conjuntamente *CYP2D6* con el gen *TC21/RRAS2*.

Debido a la influencia de los polimorfismos de *CYP2D6* y *TC21/RRAS2* sobre el nivel de respuesta clínica evidenciada en los pacientes con cáncer de mama que reciben tamoxifeno y por el hecho que la frecuencia de estos polimorfismos varía significativamente de una población a otra, se torna necesario realizar un estudio descriptivo en una muestra de la población venezolana con la intención de generar datos que permitan el diseño de estudios dirigidos a la personalización del tratamiento del tamoxifeno y otros fármacos. Esta investigación forma parte del proyecto titulado: Cáncer de mama: fenotipo metabolizador (gen:*CYP2D6*) como guía en el tratamiento con tamoxifeno en pacientes (RE+) del Instituto de Senología de Aragua (ISENA), el cual está enmarcado en la línea de investigación sobre Polimorfismos de ADN vinculados a la variabilidad de respuesta a los medicamentos.

## 1.2 Objetivos:

### 1.2.1 Objetivo general:

Generar conocimiento sobre las variantes 1846G>A (*CYP2D6*\*4), 1707delT (*CYP2D6*\*6) y 100C>T (*CYP2D6*\*10) del gen *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* en una muestra de residentes del Estado Aragua y un grupo de pacientes con cáncer de mama atendidos en el Instituto de Senología de Aragua.

### 1.2.2 Objetivos específicos:

- Obtener un banco de ADN genómico en una muestra de individuos aparentemente sanos y pacientes con cáncer de mama residentes en el área metropolitana del Estado Aragua.
- Describir las características clínicas y patológicas de un grupo de pacientes con cáncer de mama.
- Estandarizar la metodología para la detección de las variantes 1846G>A, 1707delT y 100C>T del gen *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada al Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción.
- Determinar la frecuencia genotípica, alélica y haplotípica de los polimorfismos 1846G>A, 1707delT y 100C>T del gen *CYP2D6*.
- Inferir el fenotipo metabolizador de *CYP2D6* a partir de datos haplotípicos.
- Identificar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2*.
- Inferir el fenotipo respondedor (Bueno, intermedio y malo) del tamoxifeno mediante un análisis combinado del fenotipo metabolizador de *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2*.

- Determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento.
- Comparar los datos obtenidos en este estudio con los publicados en otras poblaciones.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Cáncer de mama:

El cáncer de mama es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación maligna del tejido mamario (principalmente células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos) como consecuencia de una serie de alteraciones moleculares (producto de mutaciones somáticas o de línea germinal) que originan la extensión y propagación de células con características inmortales y crecimiento descontrolado (Stopeck, 2012).

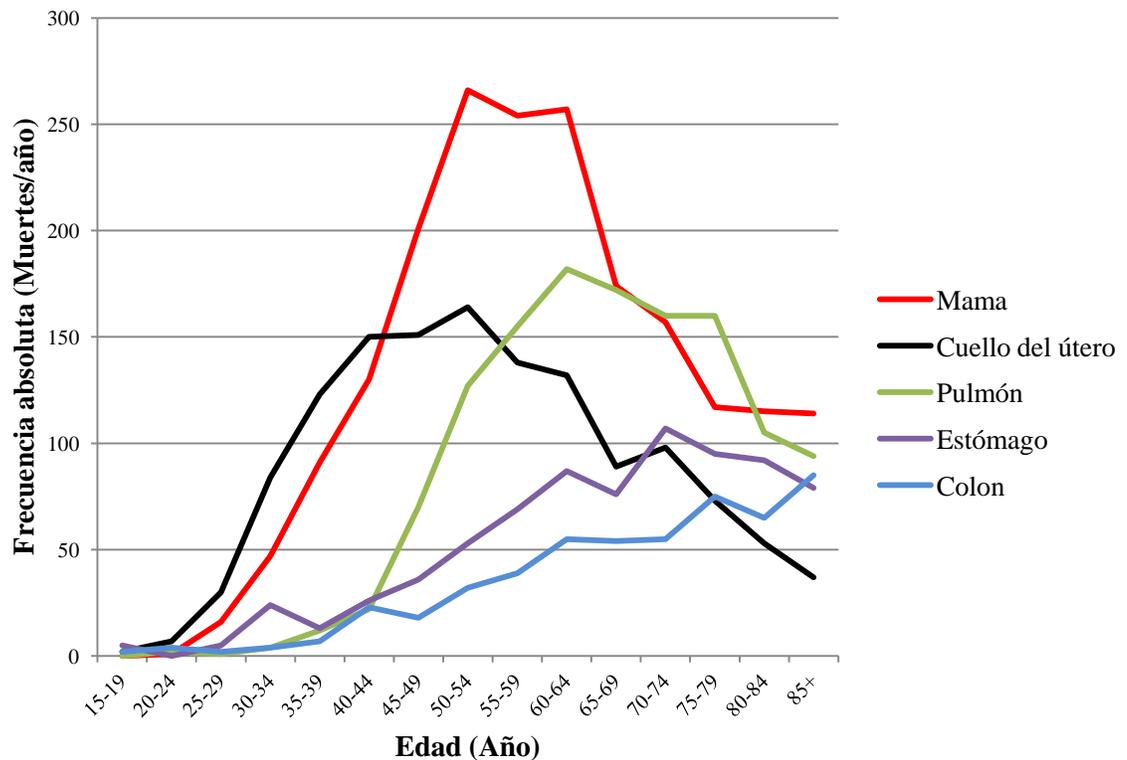
##### 2.1.1 Epidemiología del cáncer de mama:

El cáncer ocupa el segundo lugar en las causas de muerte en Venezuela (15,61%), siendo el cáncer de mama la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, 17,81% de un total de 10.905 muertes por neoplasias malignas en la mujer (Gráfico 1) (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2014). Aunque el cáncer de mama afecta a ambos géneros, más del 99% de los casos son mujeres (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2014).

El *National Cancer Institute* del *National Institutes of Health* de los Estados Unidos de América (American Cancer Society®, 2013) ha considerado a 6 factores de riesgo fuertemente asociados con el desarrollo del cáncer de mama:

- 1) **La edad:** el mayor número de casos es reportado en personas entre los 40-69 años, siendo el pico más alto después de los 50 años;
- 2) **Antecedentes personales de cáncer mama:** Los pacientes que han sufrido cáncer de mama, incluyendo el carcinoma *in situ*, tienen mayor riesgo de presentar cáncer en la mama contralateral;

**Gráfico 1. Mortalidad por neoplasias malignas en mujeres por grupo etario, Venezuela año 2011**



Frecuencia absoluta (muertes/año). Mama (n= 1942); Cuello del útero (n= 1331); Pulmón (n= 1267); Estómago (n= 768); Colon (521) (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2014).

- 3) **La edad en la que ocurrió la menarquia:** las mujeres que han iniciado los ciclos menstruales antes de los 12 años tiene un riesgo ligeramente superior;
- 4) **La edad al nacimiento del primer nacido vivo:** las mujeres que han tenido a su primer hijo a los 20 años o menos tienen menor riesgo, a partir de los 20 años el riesgo aumenta;
- 5) **Número de familiares de primer grado afectados por cáncer de mama:** el riesgo aumenta en mujeres que tienen o han tenido familiares de primer grado

con cáncer de mama por la influencia de la alteración de ciertos genes en el desarrollo de la enfermedad;

- 6) **Biopsias de mama:** el número de biopsias, aunque el resultado sea benigno, aumenta el riesgo de cáncer de mama. Si el resultado de la biopsia es una hiperplasia atípica el riesgo es mayor.

Otros factores de riesgo como la edad de la menopausia, densidad del tejido mamario en la mamografía, uso de anticonceptivos orales, alto consumo de grasas, hábitos alcohólicos, terapia de reemplazo hormonal, sedentarismo, obesidad y exposición a agentes ambientales a pesar que se ha determinado que aumentan el riesgo de cáncer de mama, aun no existen resultados epidemiológicos concluyentes por lo cual no se emplean para el cálculo del riesgo de cáncer de mama (Lippman, 2008; American Cancer Society®, 2013).

### **2.1.2 Dependencia estrogénica en el cáncer de mama:**

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas producidas a partir de los andrógenos mediante una reacción de aromatización catalizada por la aromatasa. En el gen de la aromatasa se han descrito por lo menos 10 promotores que generan enzimas con ligeras diferencias (Bulun y cols., 2003). La aromatasa se encuentra expresada en varios órganos y tejidos como en el ovario, tejido adiposo, placenta, hueso y tejido mamario tanto benigno como maligno (Lønning y cols., 2011).

Se han identificado 9 tipos de estrógenos, sin embargo la estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) y estriol (E3) son los más caracterizados. Estos estrógenos son esenciales para el crecimiento y diferenciación de varios órganos reproductivos y no reproductivos dependiendo del tipo celular, el tipo de receptor de estrógeno, la concentración y el tiempo de exposición (Chang, 2011).

Una vez que los estrógenos han ingresado a la célula estos interactúan con una proteína ubicada principalmente en el núcleo denominada Receptor del Estrógeno (ER por su nombre en inglés *Estrogen Receptor*). Se han caracterizado dos receptores

de estrógenos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ ; existe un tercer receptor identificado que al parecer actúa de manera independiente en la activación del factor de crecimiento epidérmico (Noriega-Reyes y Langley, 2008).

Los ER $\alpha$  y ER $\beta$  son codificados por genes diferentes y también poseen una distribución tisular particular, sin embargo ambos se encuentran conformados por 6 dominios denominados por letras de la A a la F (Noriega-Reyes y Langley, 2008; Kumar y cols., 2011):

- La región A/B se encuentra localizada en el extremo aminoterminal de la proteína, funciona activando la transcripción genética (AF-1 por su nombre en inglés *Activation Function 1*). También posee diversos sitios de fosforilación.
- La región C es la más conservada y corresponde al dominio de unión a ADN, se encuentra compuesto por nueve residuos de cisteínas de los cuales ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn<sup>2+</sup> que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN.
- La región D o región de bisagra aún no se encuentra completamente caracterizada.
- La región E/F o dominio de unión al ligando ubicado en el extremo carboxiterminal, es donde se une el 17 $\beta$ -estradiol y los moduladores selectivos del ER. Además, este dominio también participa en la activación de la transcripción (AF-2 por su nombre en inglés *Activation Function 2*), en la dimerización, interacción con proteínas coactivadoras o corepresoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear.

Aunque los mecanismos moleculares que inducen la carcinogénesis por el estrógeno no se encuentran elucidados totalmente, se han descritos tres de ellos: 1) Estimulación de la proliferación mediada por ER, 2) Efecto genotóxico por los metabolitos y/o especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo del estrógeno por el citocromo P450, y 3) Regulación de la actividad de enzimas o

factores de transcripción inducida por metabolitos oxidativos generados por el metabolismo del estrógeno. Todos estos mecanismos han indicado que los estrógenos y sus metabolitos oxidativos inician la tumorigénesis y/o la promueven (Chang, 2011).

### **2.1.2.1 Efectos genómicos de los estrógenos:**

Cuando los estrógenos, principalmente E2 por ser el más abundante, ingresa al interior celular interactúan con ER induciendo un cambio conformacional que favorece la formación de homodímeros de ER desencadenando una serie de eventos denominados señalización esteroidea iniciada en el núcleo (NISS por su nombre en inglés *nuclear-initiated steroid signaling*) que se caracterizan por aumentar la transcripción de ciertos genes asociados con el crecimiento celular (Arpino y cols., 2008). Estos efectos son conocidos como clásicos cuando los dímeros de ER interactúan directamente con secuencias denominadas elementos de respuesta al estrógeno (EREs por su nombre en inglés *estrogen-responsive elements*) modificando la expresión de diversos genes (Simoncini, 2010). La actividad transcripcional de ER se encuentra potenciada por la unión de proteínas coactivadoras (NCoA1, NCoA2 y NCoA3), las cuales participan en el reclutamiento de histonas acetiltransferasas, que modifican la estructura de la cromatina favoreciendo la transcripción (McKenna y cols., 1999).

También se han descrito una serie de efectos indirectos o no clásicos de ER sobre la transcripción génica las cuales son mediadas por la interacción inicial de ER con otros factores de transcripción tales como Sp-1, AP-1 o GATA1 que pueden unirse a sitios específicos del genoma y regular la transcripción (Safe y Kim, 2008).

El resultado definitivo de los efectos clásicos y no clásicos consisten en promover la proliferación y supervivencia celular mediante la expresión del receptor de IGF-I, ciclina D, factor antiapoptótico Bcl-2, el factor de crecimiento endotelial

vascular proangiogénico, diferentes tipos de HER y ligandos de receptores de factores de crecimiento (Arpino y cols., 2008).

### **2.1.2.2 Efectos no genómicos de los estrógenos:**

Aunque la mayor proporción de ER está distribuido en el núcleo, se ha demostrado que existe una pequeña fracción que se encuentra unido o cerca de la membrana plasmática mediante la interacción con otras moléculas tales como proteínas de membrana (caovelina-1 o flotilina-2), receptores de factores de crecimiento (IGFR, EGFR o HER2) y moléculas adaptadoras (Shc); siendo responsable de un tipo de actividad rápida no genómica que contribuye al crecimiento celular denominado **señalización esteroidea iniciada en la membrana** (MISS por su nombre en inglés *membrane-initiated steroid signaling*) (Hammes y Levin, 2007; Arpino y cols., 2008). Además de esta localización no nuclear, el ER también puede encontrarse en el citoplasma interactuando con otras proteínas como el modulador de la acción no genómica del receptor del estrógeno (MNAR por su nombre en inglés *modulator of nongenomic action of estrogen receptor*) y el producto del gen 1 asociado a metástasis (MTA1 por su nombre en inglés *metastasis-associated gene 1*) (Arpino y cols., 2008).

La cascada de eventos se inicia por la activación directa o indirecta de EGFR, HER2 y IGFR1 mediante ER en presencia o ausencia de su ligando (Chang, 2011; Prossnitz y Barton, 2011). Adicionalmente, ER activa a la proteína Src, una quinasa de tirosina intracelular, la cual cataliza una serie de fosforilaciones sucesivas a varias proteínas que culminan activando a las metaloproteinasas (MMPs por su nombre en inglés *matrix metalloproteinases*) 2 y 9 (Brábek y cols., 2005; Van Slambrouck y cols., 2007; Fox y cols., 2009). Posteriormente las metaloproteinasas liberan al ligando del EGFR del complejo heparina-factor de crecimiento epidérmico para producir la activación de dicho receptor y estimular una cascada de quinasas (Ras/Mek/MAPK y PI3K/AKT) lo cual modifica la actividad genómica mediante la

fosforilación de ER, proteínas coactivadoras y corepresoras (Arpino y cols., 2008; Radisky y Radisky, 2010).

Aunque el factor común de la vía NISS y MISS de ER consiste en modificar la expresión de varios genes asociados con el crecimiento y la supervivencia celular, cada una de estas vías se diferencian en el tipo de genes que regulan. La vía NISS aumenta la expresión del receptor de progesterona (PR por su nombre en inglés *progesterone receptor*), TFF1, GREB1 y PDZK1, mientras que la vía MISS principalmente por hiperactividad de IGF-IR, EGFR y HER2 conduce a una represión de la expresión de PR y a una estimulación de otros genes como *pS2* o IGF-I (Cui y cols., 2005; Thakkar y Mehta, 2011).

Por lo tanto, el nivel de PR es un indicador de la integridad funcional de la vía NISS de ER, sin embargo se ha determinado que la disminución en los niveles de PR no siempre refleja una afectación de ER, pero si es un factor de resistencia al uso de los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (Cui y cols., 2005).

En Venezuela se ha estimado que un poco más del 60% de las pacientes con cáncer de mama tienen receptores hormonales positivos (ER positivo y/o PR positivo), siendo este grupo al que potencialmente se encuentre indicada la terapia endocrina (Uribe y cols., 2010).

## **2.2 Terapia endocrina del cáncer de mama:**

El tratamiento del cáncer de mama se divide en cuatro grupos: quirúrgico, radioterapia y quimioterapia que incluye a la terapia hormonal y blanco dirigida (Sausville y Long, 2008).

La terapia endocrina se encuentra indicada en pacientes con tumores hormonosensibles (ER positivo y/o PR positivo) desde el estadio I al IV y en mujeres pre y postmenopáusicas (NCCN, 2012). Los agentes farmacológicos de la terapia hormonal incluyen a supresores ováricos, moduladores selectivos de los receptores de estrógenos e inhibidores de la aromatasa. El tamoxifeno es un modulador selectivo de

los receptores de estrógenos y se indica sólo o en combinación secuencial con un inhibidor de la aromatasa de acuerdo al estado menopáusico del paciente (NCCN, 2012). Así, en pacientes premenopáusicas el tratamiento más firmemente establecido es el tamoxifeno durante 5-10 años el cual ha mostrado que reduce la recurrencia y mortalidad en las pacientes ER positivo, mientras que en pacientes postmenopáusicas se ha sugerido los siguientes esquemas terapéuticos en pacientes en estado postmenopáusico: Tamoxifeno 20 mg/día durante 10 años; o Tamoxifeno 2-3 años seguido de un inhibidor de la aromatasa por 5 años; o tamoxifeno durante 5 años seguido por un inhibidor de la aromatasa durante otros 5 años (Davies y cols., 2013; Harbeck y cols., 2013; ASCO, 2014).

La *National Comprehensive Cancer Network*® (NCCN) recomienda, previo al análisis del riesgo/beneficio, el uso de la terapia endocrina en las mujeres con receptores hormonales positivos después de la terapia citotóxica, independiente de su estado menopáusico, edad o estatus del HER2. Sin embargo, la selección de la estrategia endocrina más idónea depende del estado menopáusico de la paciente y estadio clínico de la enfermedad (NCCN, 2012).

### **2.2.1 Cáncer de mama temprano (Estadio I o IIA):**

En mujeres premenopáusicas el tratamiento más firmemente establecido es el tamoxifeno durante 5-10 años el cual ha mostrado que reduce la recurrencia y mortalidad en las pacientes ER positivo (Davies y cols., 2013; Harbeck y cols., 2013; ASCO, 2014). Si posterior a los 5 años de tratamiento con tamoxifeno la paciente permanece en estado premenopáusico no se encuentra indicado otro tratamiento endocrino farmacológico. Si la mujer ha pasado al estado postmenopáusico, de manera fisiológica o inducido por la quimioterapia, se encuentra indicado un inhibidor de la aromatasa durante 5 años si ya finalizó el tratamiento con tamoxifeno o cualquiera de los esquemas señalados para este grupo (NCCN, 2012). Debido a que los inhibidores de la aromatasa se encuentran contraindicados en mujeres con ovarios funcionales, debido a su asociación con patología benigna de ovario y por el efecto

rebote que tiene la reducción del estrógeno sobre la gonadotropinas (Winer y cols., 2005; NCCN, 2012), es importante vigilar el estado hormonal de las pacientes, ya que un porcentaje de las pacientes postmenopáusicas inducidas por quimioterapia pueden recuperar la función ovárica (Smith y cols., 2006).

La ablación o supresión ovárica ofrece beneficios a las pacientes en estado premenopáusicas con receptores hormonales positivos, pero su efectividad y la combinación adecuada con agentes citotóxicos o tamoxifeno no se encuentra completamente definida (Pritchard, 2009; Puhalla y cols., 2009; NCCN, 2012). Se ha determinado que el grupo de mujeres que obtienen mayor beneficio de la ablación o supresión ovárica son las mujeres más jóvenes (NCCN, 2012).

En el grupo de pacientes en estado postmenopáusicas la terapia hormonal indicada son los inhibidores de la aromatasa, como monoterapia o combinados de manera secuencial con el tamoxifeno; la monoterapia con tamoxifeno sólo se encuentra indicada en pacientes postmenopáusicas con contraindicaciones para el consumo de inhibidores de la aromatasa (NCCN, 2012).

El estudio de Goss y cols. (2003) y del *Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group* (2005) han determinado que el tratamiento endocrino basado en la combinación de tamoxifeno durante 2-3 años seguido de letrozol hasta completar 5 años en pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama hormosensible reduce significativamente la recurrencia en relación al uso sólo de tamoxifeno. Datos similares han sido reportados por el grupo de Coombes (2004) cuando en la terapia combinada se emplea examestano como inhibidor de la aromatasa. En relación al anastrozol, también existe información que reporta que su uso seguido del tamoxifeno reduce significativamente la recurrencia en relación al uso sólo del tamoxifeno (Boccardo y cols., 2005; Jakesz y cols., 2005; Kaufmann y cols., 2007; Jonat y cols., 2006)

Los datos son menos homogéneos cuando se evalúa la sobrevida total. Los resultados de los trabajos del equipo de Boccardo (2005), Goss (2003) y Jakesz (2005) indican que no hay diferencias significativas con el uso secuencial de tamoxifeno y anastrozol o letrozol en la sobrevida total en relación al tratamiento con tamoxifeno sólo. Sin embargo, el grupo de Coombes (2004) y Kaufmann (2007) han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia total cuando se emplea la terapia secuencial con examestano o anastrozol, en comparación a la monoterapia con tamoxifeno.

### **2.2.2 Cáncer de mama localmente avanzado (Estadios IIB o III):**

En este grupo de pacientes debido a las características del tumor las estrategias quirúrgicas y radioterapéuticas son diferentes que en el cáncer de mama temprano, sin embargo, el tratamiento endocrino a utilizar será el mismo al descrito para el cáncer de mama temprano (NCCN, 2012).

### **2.2.3 Cáncer de mama metastásico (Estadio IV) y enfermedad recurrente:**

El objetivo del tratamiento sistémico del cáncer mama recurrente o estadio IV es prolongar la vida y aumentar la calidad de vida pero no es curativo. Por lo tanto, los tratamientos menos tóxicos, como la terapia endocrina, son los indicados.

Así como en el cáncer de mama temprano, en el cáncer de mama metastásico y en la enfermedad recurrente el tratamiento endocrino depende del estado menopáusico de la paciente. Sin embargo, a diferencia del cáncer de mama temprano en este grupo no existen datos suficientemente sólidos que ayuden a seleccionar la secuencia óptima de la terapia endocrina (NCCN, 2012).

En mujeres premenopáusicas el tratamiento endocrino recomendado es: monoterapia con un antiestrógeno, ablación/supresión ovárica o ablación ovárica más terapia endocrina postmenopáusica (Contreras y Ferri, 2010; NCCN, 2012).

Si la paciente premenopáusicas presenta progresión de su enfermedad se pueden emplear cualquiera de las siguientes estrategias que no hayan sido utilizadas: a) Moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (tamoxifeno o toremifeno); b) Análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (goserelin y leuprolide); c) Ooforectomía quirúrgica o radioterapéutica; d) Progestágenos (acetato de megestrol); e) Andrógenos (fluoximesterona); y f) Dosis altas de estrógeno (etinil estradiol) (NCCN, 2012). Sin embargo, es recomendable que la segunda línea de la terapia en mujeres expuestas a antiestrógenos sea la supresión ovárica quirúrgica o con análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante seguida de una terapia hormonal postmenopáusicas (NCCN, 2012).

En las mujeres postmenopáusicas, la terapia de primera línea que al parecer ofrece mejores beneficios en el cáncer de mama metastásico son los inhibidores de la aromataza en relación al tamoxifeno, pero los resultados no son homogéneos (Nabholtz y cols., 2000; Paridaens y cols., 2008).

También se han evaluado los beneficios de los antagonistas de los receptores de estrógeno comparado con los inhibidores de la aromataza en este grupo de pacientes. El uso de fulvestrant como tratamiento inicial no mejora la evolución de la enfermedad de las pacientes postmenopáusicas en relación al examestano (Chia y cols., 2008), sin embargo se han encontrado beneficios significativos cuando se comparan los resultados del fulvestrant con los del anastrozol (NCCN, 2012). Los beneficios del uso combinado de fulvestrant y anastrozol en relación a la monoterapia con anastrozol como tratamiento de primera línea no son concluyentes y al parecer los beneficios dependen del antecedente de la administración de tamoxifeno, así las pacientes sin exposición a este agente farmacológico tienen mejor respuesta a la terapia combinada (Bergh y cols., 2012; NCCN, 2012).

Si el grupo de pacientes postmenopáusicas presenta progresión de la enfermedad se pueden emplear cualquiera de los siguientes agentes farmacológicos que no hayan sido utilizados previamente: La terapia endocrina en mujeres

postmenopáusicas incluyen: inhibidores no esteroideos de la aromatasas (anastrozol y letrozol); inhibidores esteroideos de la aromatasas (examestano); moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (tamoxifeno o toremifeno); antagonistas de los receptores de estrógeno (fulvestrant); progestágenos (acetato de megestrol); andrógenos (fluoximesterona); y altas dosis de estrógenos (etinil estradiol) (NCCN, 2012). La selección de cualquiera de estos agentes depende de las particularidades de cada paciente, se recomienda como tratamiento de segunda línea un inhibidor de la aromatasas, modulador selectivo de los receptores de estrógeno o un antagonista de los receptores de estrógeno (Buzdar y cols., 2001; NCCN, 2012).

#### **2.2.4 Quimioprevención del cáncer de mama:**

La quimioprevención consiste en el uso de agentes naturales, sintéticos o biológicos que revierten, suprimen o previenen la fase inicial de la carcinogénesis o la progresión de las células premalignas a enfermedad invasiva (Steward y Brown, 2013). En la quimioprevención del cáncer de mama se encuentra indicado un modulador selectivo de los receptores de estrógenos, raloxifeno o tamoxifeno, en mujeres sin cáncer de mama pero con alto riesgo de desarrollarlo (Cuzick y cols., 2013).

Mediante el modelo de Gail es posible identificar a mujeres de alto riesgo de desarrollar cáncer de mama esporádico de acuerdo a la presencia de determinados factores de riesgo (Gail y cols., 1989; <http://www.cancer.gov/bcrisktool/Default.aspx>), considerándose de alto riesgo a aquellos individuos que posean una probabilidad mayor o igual a 1,67% de desarrollar cáncer de mama esporádico en los próximos 5 años (Rockhill y cols., 2001). En este grupo la *Food and Drug Administration* (FDA) ha recomendado el uso del tamoxifeno debido a que disminuye 30-67% la incidencia de cáncer de mama en personas de alto riesgo (Cazzaniga y Bonanni, 2012; Visvanathan y cols., 2013).

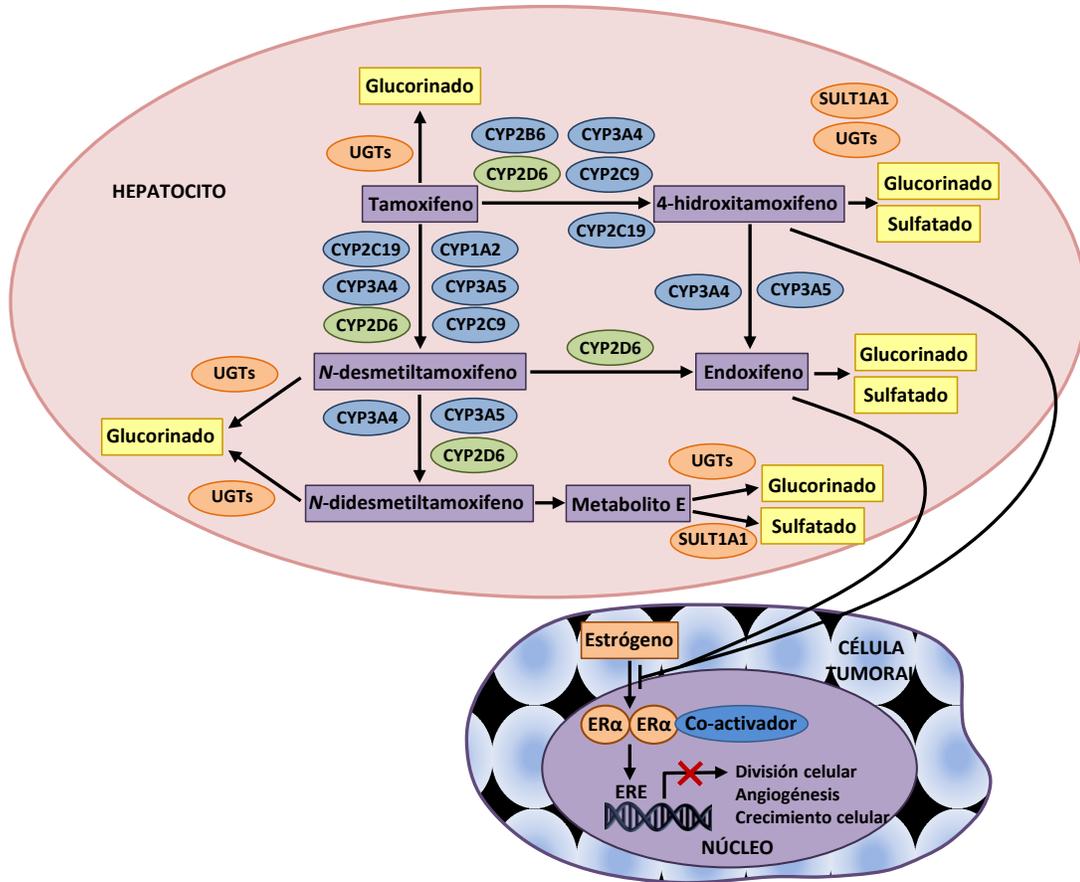
En sujetos con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama hereditario/familiar todavía no existe un consenso sobre el uso del tamoxifeno; sin embargo, existen datos que indican que reduce el riesgo en un 62% en personas con mutaciones en el gen *BRCA2* y en pacientes afectadas por cáncer de mama hereditario/familiar reduce en 45 a 60% el riesgo de cáncer de mama contralateral (King y cols., 2001; NCCN, 2013).

### **2.3 Metabolismo y mecanismo de acción del tamoxifeno:**

El tamoxifeno, un modulador selectivo de los receptores de estrógenos, es un profármaco no esteroideo que compite con los estrógenos por la unión al receptor, suprimiendo la proliferación celular dependiente del ER en el cáncer de mama (Lahusen y cols., 2009). Se ha observado que además de su efecto antagonista también posee un efecto agonista en ciertos tejidos debido a la presencia de una mayor concentración de proteínas coactivadoras (Thakkar y Mehta, 2011). En la figura 1 se encuentra resumido el extenso metabolismo del tamoxifeno, donde participan enzimas de fase I y II (Hoskins y cols., 2009).

Para la activación del tamoxifeno es fundamental que su estructura sea modificada por una serie de enzimas hepáticas de fase I que catalizan reacciones de N-oxidación, N-demetilación e hidroxilación (Brauch y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2012). Los metabolitos principales generados del tamoxifeno son el N-desmetiltamoxifeno y el 4-hidroxitamoxifeno por las enzimas CYP3A4/5 y CYP2D6, respectivamente; aunque el N-desmetiltamoxifeno es el metabolito más abundante (~90%), el 4-hidroxitamoxifeno tiene una potencia 30-100 veces mayor (Tan y cols., 2008; Kiyotani y cols., 2012). A partir del N-desmetiltamoxifeno y por la participación de la enzima CYP2D6 se genera el 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno (endoxifeno) el cual tiene una potencia similar al 4-hidroxitamoxifeno en cuanto a la supresión estrogénica (Johnson y cols., 2004). Por tales motivos, el endoxifeno tiene una concentración 5-10 veces mayor al 4-hidroxitamoxifeno y por lo tanto es considerado el metabolito activo principal (Dezentjé y cols., 2009).

**Figura 1. Metabolismo del tamoxifeno e interacción con el receptor de estrógenos**



La vía principal del metabolismo del tamoxifeno ocurre en el hígado e involucra una serie de reacciones catalizadas por los Citocromos P450 (CYP); la conversión de tamoxifeno a *N*-desmetiltamoxifeno (~92%) es catalizada principalmente por CYP3A4 y CYP3A5, mientras que la formación de 4-Hidroxitamoxifeno (~7%) lo realiza CYP2D6, ambos metabolitos son convertidos en 4-Hidroxi-*N*-desmetiltamoxifeno (endoxifeno). La formación de endoxifeno a partir de *N*-desmetiltamoxifeno es mediado exclusivamente por CYP2D6 y a partir de 4-Hidroxitamoxifeno por CYP3A4 y CYP3A5. El tamoxifeno y sus metabolitos sufren conjugación por las enzimas de fase II, incluyendo glucoronidación y sulfatación. En la célula tumoral, la unión de los estrógenos al receptor de estrógenos (ER) origina la dimerización del ER nuclear; este dímero recluta a proteínas co-activadoras y posteriormente interactúa con secuencias de ADN específicas denominadas Elementos de Respuesta Estrogénica (ERE) y modifica la expresión de ciertos genes vinculados con la división celular, angiogénesis y crecimiento tumoral. Los metabolitos activos del tamoxifeno bloquean dicha vía inhibiendo el crecimiento dependiente de los estrógenos. SULT1A1: Sulfotransferasa 1A1; UGTs: UDP-glucuronosiltransferasas. Imagen modificada del trabajo de Hoskins y cols. (2009).

En la formación de estos metabolitos participan en menor medida otras enzimas de la superfamilia del CYP, como CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2B6 (Brauch y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2012).

Una vez formados los metabolitos activos del tamoxifeno estos interactúan con el dominio de unión a ligando de ER induciendo un cambio conformacional en AF-2, diferente al producido por los estrógenos, lo cual impide la unión de proteínas coactivadoras alterando parcialmente la función de transactivación del receptor debido a que AF-1 no sufre ninguna modificación conformacional (Abdulkareem y Zurmi, 2012).

En la eliminación de los metabolitos generados a partir del tamoxifeno participan las enzimas de fase II localizadas igualmente en el hígado, las cuales se caracterizan por catalizar reacciones de conjugación. La O-glucoronidación del 4-hidroxitamoxifeno es catalizada por las UDP-glucuronosiltransferasas (UGT1A4, 2B15, 1A8) y otras enzimas para producir el 4-hidroxitamoxifeno-O-glucoronido; la O- y N-glucoronidación del endoxifeno es llevada a cabo por UGT1A10/1A8 y UGT1A4, respectivamente (Sun y cols., 2007). Los responsables de la producción de derivados sulfatados son las sulfotransferasas (SULT1E1, 1A1 y 2A1), siendo la SULT1A1 considerada la más importante en la sulfatación del 4-hidroxitamoxifeno y endoxifeno (Falany y cols., 2006; Brauch y cols., 2009).

Se ha determinado que los genes que codifican a las enzimas de la fase I y II son altamente polimórficas, lo cual se ve reflejado en la actividad enzimática y la respuesta terapéutica al tamoxifeno (Tan y cols., 2008).

#### **2.4 Resistencia al tamoxifeno:**

Existen datos que indican que cerca del 30-50% de los pacientes con cáncer de mama, a pesar de la presencia de ER, no responden desde el inicio del tratamiento al tamoxifeno (resistencia primaria) y que aquellos que inicialmente responden pueden

desarrollar igualmente resistencia (resistencia adquirida) (Fernández y cols., 2004; Arpino y cols., 2008; Hoskins y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2012).

Los mecanismos de resistencia son múltiples y depende del estadio clínico de la enfermedad y de trastornos en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los antiestrógenos (Fernández y cols., 2004; Miller, 2013). De esta manera, alteraciones en la producción del metabolito activo del tamoxifeno así como condiciones particulares en la célula diana, como alteraciones en la concentración y conformación de ER, estatus de PR, hiperactivación de otras vías de señalización de factores de crecimiento, etc., pueden condicionar la respuesta terapéutica a dicho fármaco (Dixom, 2014).

Existen datos que han asociado ciertos polimorfismos en el gen que codifica a CYP2D6 y TC21 a una pobre respuesta al tratamiento hormonal en los pacientes con cáncer de mama que reciben terapia hormonal basada en tamoxifeno.

#### **2.4.1 Citocromo P450:**

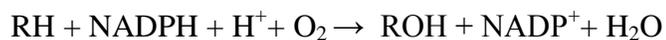
El Citocromo P450 constituye un amplio grupo de monooxigenasas que catalizan varios tipos de reacciones químicas que incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, desulfuraciones, N- y S- oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S- desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones (Coutiño y cols., 2010; Sakaki, 2012). Este tipo de modificaciones cambia dramáticamente las propiedades del compuesto, como la solubilidad, eficacia y toxicidad (Sakaki, 2012).

Su nombre hace referencia a las propiedades químicas de la proteína: citocromo por tratarse de una hemoproteína, la letra P por pigmento y 450 por la inusual absorción de luz a una longitud de onda de 450 nm (Bernhardt, 2006).

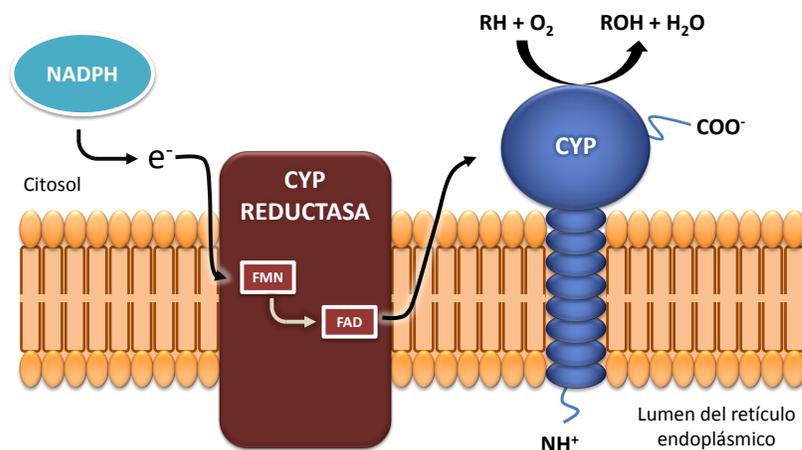
Los genes que codifican a este grupo de proteínas son identificados por la abreviatura CYP seguida por un número arábigo que corresponde a la familia (proteínas con más de 40% de identidad), una letra que designa la subfamilia (más de

55% de identidad) y otro número arábigo que representa al gen ubicado en la subfamilia (Ejemplo: CYP2D6) (Hannemann y cols., 2007).

El mecanismo de oxigenación, de sustratos endógenos y exógenos, comienza con la unión del sustrato seguido de la introducción del primer electrón del NAD(P)H donado por la NADPH-P450 reductasa o el citocromo *b5*. El segundo electrón, derivado del oxígeno, es aceptado por el hierro para producir el anión peróxido férrico. Posteriormente este compuesto es protonado y se forma el complejo hidroperóxido férrico que finalmente ataca al sustrato para generar el sustrato hidroxilado (Bernhardt, 2006; Omura, 2010). La hidroxilación del sustrato orgánico RH (sustrato principal) al producto hidroxilado (ROH) ocurre a expensas de uno de los átomos de una molécula de oxígeno, el otro átomo es reducido a H<sub>2</sub>O. Durante el proceso se generan especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido (O<sup>2•-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Coutiño y cols., 2010), en la reacción química siguiente se resume dicho proceso, el cual está esquematizado en la figura 2.



**Figura 2. Citocromo P450**



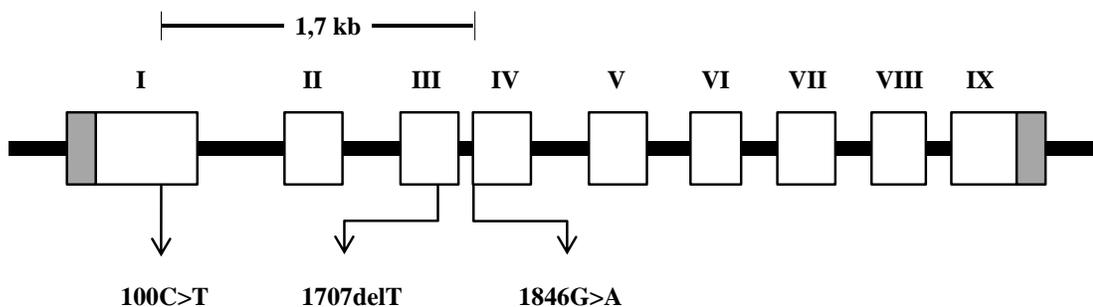
En la figura se ilustra a la proteína CYP ubicada en la membrana del retículo endoplásmico. Asimismo, se muestra la interacción de CYP con la NADPH-P450 reductasa, la cual transfiere el primer electrón para la oxidación del sustrato (RH) (Figura diseñada de datos tomados de Omura, 2010 y Coutiño y cols., 2010).

### 2.4.2 Polimorfismos del gen *CYP2D6*:

La proteína *CYP2D6* es un miembro de la familia 2 del citocromo P450 y constituye la tercera parte de todos los CYPs del humano (Brauch y cols., 2009), es responsable del metabolismo del 20-25% de los fármacos utilizados por el hombre (Dorado y cols., 2005; Goetz y cols., 2008).

El gen que lo codifica se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 22 en la banda 13.2 (22q13.2), está compuesto por 9 exones y codifica un proteína citoplásmica de 497 aminoácidos (55,8 kDa) (Figura 3) (UniProtKB: Q38LG0; Ensembl: ENSG00000100197).

**Figura 3. Representación esquemática del gen *CYP2D6* y ubicación de las variantes 1846G>A (*CYP2D6\*4*), 1707delT (*CYP2D6\*6*) y 100C>T (*CYP2D6\*10*)**



En cuadros blancos se encuentran representados los 9 exones que componen al gen *CYP2D6* y también se encuentra señalado la distancia que separa al polimorfismo 100C>T del 1846G>A (1,7 kb; 1.748 pb).

Se han descrito más de 80 polimorfismos en el gen *CYP2D6* (The Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Database, 2014). Las variantes alélicas de *CYP2D6* pueden ser clasificadas en cuatro categorías de acuerdo a la modificación de

la actividad de la enzima: las que generan una proteína sin función, con actividad disminuida, normal o incrementada (Dorado y cols., 2005).

Los alelos identificados como *CYP2D6*\*1, \*2, \*33 y \*35 son formas alélicas silvestres o salvajes (*wt*, por su nombre en inglés *wild type*), ellos codifican una enzima con actividad normal. En ciertos sujetos, estos alelos pueden encontrarse multiplicados (\*1xN, \*2xN, \*33xN y \*35xN) codificando una mayor cantidad de *CYP2D6* lo cual se refleja en un aumento del metabolismo de sus substratos (Hoskins y cols., 2009).

Los alelos nulos o lentos (*CYP2D6*\*3, \*4, \*5, \*6, \*8, \*11, \*16, \*18, \*21 \*36, \*38, \*40, \*42, \*44, \*56 y \*62) se caracterizan por generar una proteína no funcional (Saxena y cols., 1994; Hoskins y cols., 2009). Dentro de este grupo los alelos de mayor frecuencias en diferentes grupos poblacionales son: \*3, \*4, \*5 y \*6 (Teh y Bertilsson, 2012). Las variantes *CYP2D6*\*3, 4 y 6 generan una proteína truncada por un cambio en el marco abierto de lectura que introduce un codón de parada prematuro (Hanioka y cols., 1990; Saxena y cols., 1994), mientras que el alelo 5 consiste en una delección de todo el gen (Gaedigk y cols., 1991).

Los alelos intermedios (*CYP2D6*\*9, \*10, \*17, \*29, \*41 y \*59), codifican a *CYP2D6* con actividad reducida (Hoskins y cols., 2009). Los polimorfismos más importantes son el *CYP2D6*\*10, \*17 y \*41 (Tan y cols., 2008; Goetz y cols., 2008). La variante 10 consiste en una sustitución de una prolina, ubicada en una región rica en prolina altamente conservada, por una serina (c.100C>T; P34S) que conduce a la formación de una proteína inestable (Johansson y cols., 1994; Zhou, 2009). El alelo 17 corresponde a 4 polimorfismos de un sólo nucleótido, uno de ellos es silencioso y los otros tres conducen a las sustituciones de T107I, R296C y S486T, que generan una proteína con menos afinidad por su substrato (Masimirembwa y cols., 1996; Zhou, 2009). El alelo 41 es una variante de *CYP2D6*\*2 y consiste en una sustitución de G por A en la posición 2988 (2988G>A) que produce un defecto en el corte del intrón 6 (Zhou, 2009).

### 2.4.3 Tipos de metabolizadores de acuerdo al genotipo del *CYP2D6*:

De acuerdo a la combinación de los diferentes alelos del gen *CYP2D6*, la población puede clasificarse en cuatro tipos de metabolizadores: a) Metabolizadores Ultrarrápidos; b) Metabolizadores Rápidos; c) Metabolizadores Intermedios; y d) Metabolizadores Lentos o Pobres (Brauch y cols., 2009; Swen y cols., 2011).

Los metabolizadores ultrarrápidos son definidos como aquellos sujetos que tienen dos o más copias de los alelos \*1, \*2, \*33 o \*35 (Alelo de *CYP2D6xN*) del gen *CYP2D6* en ausencia de alelos lentos e intermedios. La frecuencia de estos metabolizadores es menor a 2,3%, siendo mucho más frecuente en Etiopia (29%) (Schroth y cols., 2009; Ramon y cols., 2010; Teh y Bertilsson, 2012). Se ha encontrado que la concentración del endoxifeno en los metabolizadores ultrarrápidos es de 22,8±11,3 ng/mL (Madlensky y cols., 2011).

Los metabolizadores rápidos se caracterizan por poseer dos copias de los alelos funcionales (\*1, \*2, \*33 y\*35). La frecuencia varía entre 29-72% de acuerdo a la población analizada, siendo más baja la frecuencia de estos metabolizadores en Japón (Goetz y cols., 2005; Kiyotani y cols., 2008; Schroth y cols., 2009; Lammers y cols., 2010; Kiyotani y cols., 2010). La concentración del endoxifeno en los metabolizadores rápidos es de 15,9±9,2 ng/mL (Madlensky y cols., 2011).

Cuando un sujeto posee dos alelos que codifican a *CYP2D6* con actividad disminuida (\*10 o \*41) o cuando se encuentran en combinación con alelos nulos (\*3, \*4, o \*5) se denominan metabolizadores intermedios (Brauch y cols., 2009). Algunos investigadores también consideran que los sujetos con un alelo funcional y otro con actividad reducida o sin actividad son también metabolizadores intermedios (Schroth y cols., 2009). Su frecuencia es variable de acuerdo a la población estudiada (21-70%), reportándose la frecuencia más elevada en la población asiática (Goetz y cols., 2005; Kiyotani y cols., 2008; Schroth y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2010; Lammers y cols., 2010; Ramon y cols., 2010). Aunque la concentración de endoxifeno

reportada ha sido de  $8,1 \pm 4,9$  ng/mL (Madlensky y cols., 2011), se ha determinado que esta varía ampliamente de acuerdo al genotipo del metabolizador; así la concentración plasmática en sujetos con  $*1/*5 = 14,51$  ng/mL,  $*1/*10 = 19,74$  ng/mL,  $*10/*10 = 8,03$  ng/mL y  $*5/*10 = 7,46$  ng/mL (Lim y cols., 2011).

En cuanto a los metabolizadores pobres o lentos, son aquellas personas con dos alelos inactivos. La frecuencia en la población caucásica es de aproximadamente 7-10% y de 0-1% en asiáticos (Goetz y cols., 2005; Schroth y cols., 2009; Lammers y cols., 2010; Ramon y cols., 2010; Teh y Bertilsson, 2012). La concentración plasmática del endoxifeno en este tipo de metabolizadores es de  $5,6 \pm 3,8$  ng/mL (Madlensky y cols., 2011).

Aproximadamente el 98% de los metabolizadores pobres tienen los alelos  $*3$ ,  $*4$ ,  $*5$  y  $*6$  (Sachse y cols., 1998; Gaedigk y cols., 1999). Por tales motivos el análisis de dichos alelos y la duplicación de *CYP2D6* $*1/*2$  permite identificar con 99% de sensibilidad a los metabolizadores lentos y ultrarrápidos en caucásicos europeos y americanos (Dorado y cols., 2005).

#### **2.4.4 Impacto clínico de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 en la respuesta al tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama:**

Se ha demostrado que existe una reducción significativa de la recurrencia y mortalidad de los pacientes pre y postmenopáusicas con tumores hormonosensibles que son tratadas con tamoxifeno (Kiyotani y cols., 2012); en consecuencia el tamoxifeno es considerado como el *gold standard* de la terapia endocrina del cáncer de mama (Ayoub y cols., 2011). La respuesta clínica al tamoxifeno no es uniforme en todos los pacientes, se ha estimado que entre el 30-50% de las pacientes experimentan recaída y/o muerte (Fernández y cols., 2004; Arpino y cols., 2008; Hoskins y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2012).

Esta variabilidad en la respuesta puede deberse a la presencia de múltiples polimorfismos a lo largo de los genes que codifican a las enzimas que participan en el

metabolismo del tamoxifeno, lo cual repercute en un aumento o disminución de la actividad enzimática de acuerdo al tipo de variación (Tan y cols., 2008). La asociación más importante que se ha realizado ha sido con el gen *CYP2D6* (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, 2013; Whirl-Carrillo y cols., 2012), aunque se han desarrollado diversas investigaciones clínicas todavía los resultados no son completamente concluyentes, debido a que un grupo de investigadores apoyan la asociación de los alelos lentos del gen *CYP2D6* con una pobre respuesta terapéutica mientras que otros investigadores no han encontrados tal asociación (Goetz y cols., 2005; Nowell y cols., 2005; Schroth y cols., 2007; Wegman y cols., 2007; Kiyotani y cols., 2008; Xu y cols., 2008; Bijl y cols., 2009; Schroth y cols., 2009; Kiyotani y cols., 2010; Lammers y cols., 2010; Ramon y cols., 2010; Thompson y cols., 2011; Sirachainan y cols., 2012; Sukamen y cols., 2012; Teh y cols., 2012).

A continuación se describen los estudios que analizan la respuesta terapéutica del tamoxifeno en función del genotipo del *CYP2D6* evaluando tres variables: intervalo libre de enfermedad, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia total.

En relación al **intervalo libre de enfermedad**, el cual corresponde al tiempo transcurrido desde el tratamiento radical a la aparición de signos y síntomas relacionados con el cáncer, cualquier recurrencia (local, regional o distante) del cáncer de mama o cáncer de mama contralateral. La asociación de determinado fenotipo metabolizador con el intervalo libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama tratadas con tamoxifeno ha sido positiva y negativa.

En este orden de ideas, el grupo de Kiyotani (2008) encontró diferencias estadísticamente significativas en la respuesta al tamoxifeno entre un grupo de pacientes homocigotos para el alelo *\*10* y silvestre, determinando que aquellas con el genotipo *\*10/\*10* tiene 10 veces más riesgo de recurrencia que el grupo *wt/wt* (HR: 10,04; 95% CI: 1,17-86,27;  $p= 0,036$ ). Este mismo equipo de investigadores realizaron posteriormente un análisis más amplio de los alelos que codifican *CYP2D6*

con baja o ninguna actividad enzimática (\*4, \*5, \*10, \*14, \*21, \*36 y \*41), encontrando que los sujetos con dichos alelos (HR: 9,52; 95% CI: 2,79-32,45) tienen significativamente mayor recurrencia que el grupo de metabolizadores rápidos ( $p < 0,05$ ) (Kiyotani y cols., 2010).

Esta información fue corroborada por Schroth y cols. (2009) (HR: 1,90; 95% CI: 1,10-1,91;  $p = 0,02$ ) y Thompson y cols. (2011) (HR: 1,96; 95% CI: 1,05-3,66,  $p = 0,04$ ), quienes encontraron que los pacientes metabolizadores lentos tienen una recurrencia significativamente mayor que los metabolizadores rápidos. Sin embargo, Goetz y cols. (2005) (HR: 1,85; 95% CI: 0,76-4,52;  $p = 0,176$ ) y Wegman y cols. (2007) (HR: 0,87; 95% CI: 0,38-1,97;  $p = 0,74$ ) no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

El impacto de la presencia de un alelo nulo o intermedio (metabolizadores intermedios) también ha sido estudiado por varios investigadores. Varios de estos grupos han asociado a los metabolizadores intermedios con mayor recurrencia del cáncer de mama, tal es el caso de Schroth y cols. (2009) (HR: 1,40; 95% CI: 1,04-1,90;  $p = 0,03$ ), Kiyotani y cols. (2010) (HR: 4,44; 95% CI: 1,31-15,00;  $p < 0,05$ ) y Teh y cols. (2012) (OR: 13,14; 95% CI: 1,54-109,94;  $p = 0,004$ ).

En cuanto a la **supervivencia libre de enfermedad**, definida como el tiempo desde que se instaura el tratamiento a la documentación de recurrencia o muerte por cualquier causa, se han encontrados estudios como el de Xu y cols. (2008) que han reportado asociación del alelo 10 con la supervivencia libre de enfermedad, determinando que las pacientes con el genotipo \*10\*/10 tienen un tiempo más corto que el grupo de paciente con genotipos *wt/wt* y *wt\*/10* (HR: 4,7; 95% CI: 1,1-20,0;  $p = 0,04$ ).

La influencia del alelo 10 en la respuesta al tratamiento con tamoxifeno también fue estudiada por el grupo de Sirachainan (2012) y Sukasem (2012) quienes han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con

los genotipos *wt/\*10* versus *\*10/\*10* ( $p= 0,036$ ), *wt/wt* versus *wt/\*10* ( $p= 0,008$ ) y otro genotipo versus *\*10/\*10* (HR: 10,52; 95% CI: 1,56-70,79;  $p= 0,005$ ).

El grupo de Ramon y cols. (2010) ha obtenido resultados similares en la supervivencia libre de enfermedad entre los pacientes en estado homocigoto o heterocigoto para ciertos alelos nulos e intermedios (*\*4*, *\*5* y *\*41*) que en aquellos sin dichos alelos ( $p= 0,016$ , análisis univariable).

El equipo de Schroth y cols. (2010) encontró diferencias discretas en la supervivencia libre de enfermedad entre los metabolizadores rápidos y los pobres/intermedios (HR: 1,29; 95% CI: 1,03-1,61;  $p= 0,02$ ). Adicionalmente, Sukasem y cols. (2012) determinaron que los metabolizadores intermedios tienen un tiempo libre de enfermedad significativamente más corto que el grupo de metabolizadores rápidos (HR: 6,85; 95% CI: 1,48-31,69;  $p= 0,005$ ).

Contrario a estos datos se encuentran los publicados por Goetz y cols. (2005), quienes no encontraron diferencias entre los pacientes metabolizadores rápidos/intermedios y los lentos (HR: 1,86; 95% CI: 0,91-3,82;  $p= 0,89$ ). El grupo de Sukasem (2012) tampoco observó diferencias cuando compararon las pacientes en estados heterocigoto para el alelo 10 (*\*10/wt*) y otros genotipos (HR: 1,35; 95% CI: 0,19-9,62;  $p= 0,817$ ).

A diferencia de los dos indicadores de respuesta al tratamiento descritos previamente, la **supervivencia global** que consiste en el tiempo de registro de muertes por cualquier causa después de iniciar el tratamiento, presenta mayor discrepancia en relación a su asociación con alelos nulos e intermedios del gen *CYP2D6* (Goetz y cols., 2005; (Nowell y cols., 2005; Bijl y cols., 2009; Schroth y cols., 2010; Lammers y cols., 2010)

Por una parte, grupos de investigación no han encontrado diferencias desde el punto de vista estadísticos, tal y como ha sido demostrado por Goetz y cols. (2005) (HR: 1,12; 95% CI: 0,50-2,50;  $p= 0,780$ ), Nowell y cols.(2005) (HR: 0,77; 95% CI:

0,32-1,81;  $p=0,26$ ) y Schroth y cols.(2010) (HR: 1,15; 95% CI: 0,88-1,51;  $p= 0,32$ ). Mientras que por otro lado, el trabajo de Lammers y cols. (2010) ha demostrado que en los metabolizadores pobres se registra un mayor número de muertes que en los metabolizadores rápidos/intermedios ( $p= 0,012$ ), así como Bijl y cols. (2009) determinaron que la mortalidad por cáncer de mama es significativamente mayor en pacientes con los genotipos *\*4/\*4* que en aquellas *wt/wt* (HR: 4,1; 95% CI: 1,1-15,9;  $p=0,041$ ).

Basado en un metaanálisis que incluyó a 5020 individuos, la *Royal Dutch Pharmacists Association* y el *Pharmacogenetics Working Group* recomiendan el uso del tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama en función del genotipo del *CYP2D6* (Swen y cols., 2011). Sin embargo, debido a los resultados contradictorios, todavía la *National Comprehensive Cancer Network* y la *American Society of Clinical Oncology* no han considerado el estudio del *CYP2D6* previo al inicio de la terapia endocrina (Visvanathan y cols., 2009; NCCN, 2012).

Las contradicciones observadas pueden deberse al empleo de un diseño metodológico diferente en los estudios que no siempre incluyen a pacientes con las mismas características, al número de polimorfismos evaluados y a la influencia de otros genes con frecuencias teóricamente diferentes de acuerdo a la población considerada (Hertz y cols., 2012).

#### **2.4.5 TC21/RRAS2 y su participación en la respuesta al tamoxifeno:**

La proteína TC21 también denominada R-Ras2 pertenece a la subfamilia R-Ras que incluyen además a las proteínas R-Ras1 y R-Ras3 (M-Ras), los miembros de dicha subfamilia poseen una identidad de aminoácidos de 55-60% con los miembros de otras subfamilias (H-Ras, K-Ras y N-Ras) (Alarcón y Martínez-Martín, 2012). El gen que codifica a R-Ras2 se encuentra ubicado en la banda 15.2 del brazo corto del cromosoma 11 (11p15.2), está compuesto por 6 exones y codifica una proteína de 204 aminoácidos (23,4 kDa) (Ensembl: ENSG00000133818).

Se ha descrito que TC21 se encuentra asociada a la membrana plasmática, posee actividad GTPasa y participa en la transducción de señales, por las vías PI3K/AKT/mTOR y MEK/ERK, de los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa (EGFR/HER2, IGF1-R y FGFR) (Rong y cols., 2002; Miller, 2013; UniProtKB: P62070). El estímulo de estas vías culminan en la activación de múltiples quinasas que catalizan la fosforilación de varias proteínas que participan en la regulación del crecimiento celular, incluyendo a ER y sus proteínas coreguladoras (Osborne y Schiff, 2011). Se ha descrito que la hiperactividad de estas vías de señalización disminuyen la expresión de ER y PR, aumenta la localización extranuclear y la actividad no genómica de ER; además, los cambios conformacionales que ocurren por las modificaciones postraduccionales conducen a la activación de ER independiente de ligando e incrementa el efecto agonista del tamoxifeno sobre ER (Arpino y cols., 2008; Osborne y Schiff, 2011).

Estudios en cultivo celular han indicado que la sobreexpresión de TC21 induce la tumorigénesis y disminuye la sensibilidad a la inhibición del crecimiento celular mediada por TGF- $\beta$  (Erdogan y cols., 2007). Adicionalmente, la expresión de TC21 ha sido asociada con resistencia a la terapia hormonal del cáncer de mama basada en tamoxifeno, cuya sensibilidad se ha restablecido empleando ARN de interferencia (Mendes-Pereira y cols., 2012).

En este orden de ideas, se ha determinado que el polimorfismo -582C>T en el promotor del gen *TC21* modifica la tasa de expresión de TC21, siendo mayor el nivel de expresión en tumores con los genotipos C/T y T/T que con el genotipo C/C encontrándose diferencias estadísticamente (C/C versus C/T,  $p < 0,05$ ; C/T versus T/T,  $p < 0,01$ ; C/C versus T/T,  $p < 0,001$ ); esta variante alélica posiblemente afecta la unión de los factores de transcripción E2F, encontrándose asociado el alelo T a un aumento de la afinidad de estas proteínas al promotor del gen (Rokavec y cols., 2008).

Un análisis ajustado con dos factores pronóstico, tamaño del tumor y estatus de ganglios linfáticos, determinó que la tasa libre de recurrencia era menos favorable para los pacientes con el alelo T del gen *TC21* en relación a los que poseen el genotipo C/C, identificándose un efecto de dosis del alelo T con un riesgo relativo de 1,79 por alelo (CI: 1,08-3,00;  $p= 0,025$ ) (Rokavec y cols., 2008).

Cuando se realiza un análisis combinado de los genotipos de *CYP2D6* y *TC21* es posible aumentar el nivel de predicción de la respuesta al tratamiento con tamoxifeno (Rokavec y cols., 2008). Así, pacientes que tengan los genotipos de *TC21* vinculados a un aumento en la expresión (*TC21*-582C/T o T/T) y genotipos de *CYP2D6* asociados con actividad disminuida (Metabolizadores intermedios y lentos) poseen un tiempo libre de recaída significativamente menos favorable que los sujetos con ambos genes en estado silvestre. De la misma manera, este comportamiento es observado, pero de una forma menos acentuada, en los sujetos con alguno de los dos genes alterados en relación a aquellos que no poseen ninguno de los polimorfismos que afectan la expresión de *TC21* y la actividad de *CYP2D6*. Adicionalmente, se calcula que existe más del 93% de probabilidad a los 5 años de que los pacientes con ambos genes en estado salvaje no experimenten recaídas, en contraste con 70% en sujetos con ambos genes alterados.

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### **3.1 Tipo y diseño de investigación:**

Se realizó una investigación descriptiva donde se analizaron las variantes alélicas 1846G>A (*CYP2D6*\*4; rs3892097), 1707delT (*CYP2D6*\*6; rs5030655) y 100C>T (*CYP2D6*\*10; rs1065852) del gen *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* (rs11023197) mediante un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por su nombre en inglés *Polymerase Chain Reaction*) acoplado al Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP por su nombre en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) en una muestra de sujetos aparentemente sanos y en grupo de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama. Posteriormente se determinó los haplotipos de *CYP2D6* y a partir de estos datos se asignó el fenotipo metabolizador de *CYP2D6*. Finalmente, se realizó un análisis combinado del fenotipo metabolizador de *CYP2D6* con el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* y se identificaron a los sujetos que poseían características de buenos, intermedios y malos respondedores al tamoxifeno.

#### **3.2 Población y muestra:**

La población estuvo constituida por los residentes del área metropolitana del Estado Aragua y pacientes con diagnóstico clínico y anatomopatológico de cáncer de mama atendidos en el Instituto de Senología de Aragua (ISENA).

La muestra estuvo integrada por 192 sujetos de ambos géneros y mayores de edad los cuales se dividieron en dos grupos, referencia y enfermos. A todos los participantes se les solicitó su consentimiento libre e informado para participar en la presente investigación cuyo protocolo fue diseñado siguiendo las pautas nacionales e internacionales que regulan la investigación con humanos; además, fue aprobado por

el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” de la Universidad de Carabobo.

### **3.2.1 Grupo de referencia:**

El grupo de referencia se encontró compuesto por 145 sujetos no relacionados, aparentemente sanos y residentes del área metropolitana del Estado Aragua. Los criterios de inclusión fueron: 1) Sujetos no consanguíneos; 2) Residentes del área metropolitana del Estado Aragua; 3) Mayores de edad (> 18 años); 4) aparentemente sanos y sin síntomas de cáncer de mama y 5) Consintieran de forma verbal y por escrito su participación.

### **3.2.2 Grupo de enfermos:**

En el grupo de enfermos se incluyeron a 47 pacientes con diagnóstico clínico y anatomopatológico de cáncer de mama atendidos en el ISENA. A los participantes se les realizó examen físico con ayuda de un médico oncólogo con la finalidad de determinar el estadio clínico de la enfermedad según el tamaño, estatus ganglionar y metástasis a distancia (TNM) del *American Joint Committee on Cancer* (Singletary y cols., 2002) y se recopiló información contenida en la historia clínica concerniente a las características microscópicas del tumor. Asimismo, se les solicitó información relacionada con el tratamiento de la enfermedad, y antecedentes familiares y personales de cáncer mama. Los criterios de inclusión fueron: 1) Sujetos con diagnóstico clínico y anatomopatológico de cáncer de mama; 2) Se encuentren atendidos en el ISENA; 3) No consanguíneos; 4) Mayores de edad (> 18 años); y 5) Consintieran de forma verbal y por escrito su participación.

El grupo de pacientes fue dividido de acuerdo al estado menopáusico, tamaño del tumor, estatus de ganglios linfáticos, presencia de metástasis distante, estatus de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2. De acuerdo a las características inmunohistoquímicas del tumor los pacientes fueron estratificados en 4 grupos: a) Luminal A: Sujetos con tumores con receptores de estrógenos positivos y/o receptor

de progesterona positivo y HER2 negativo; b) Luminal B: Pacientes con tumores con receptores de estrógenos positivos y/o receptor de progesterona positivo y HER2 positivo; c) HER2: Sujetos con tumores con receptores de estrógenos y progesterona negativo y con HER2 positivo; d) Basal: Pacientes que exhiben ausencia de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2 (Stopeck, 2012; Verma y cols., 2012). Adicionalmente, los pacientes fueron clasificados como receptores hormonales positivos (ER y/o PR positivo) y receptores hormonales negativos (ER y PR negativo).

### **3.2.2.1 Identificación de pacientes con características de cáncer de mama hereditario/familiar:**

Los pacientes incluidos en la investigación fueron clasificados como cáncer de mama hereditario/familiar de acuerdo a los criterios de evaluación del riesgo genético para individuos afectados por cáncer establecido por la *National Comprehensive Cancer Network*® de los Estados Unidos de América (2014). Se considera sujetos con riesgo aquellos que cumplan con uno o más de los siguientes criterios:

- Conocimiento de portar alguna mutación en un gen que confiere susceptibilidad al cáncer de mama.
- Cáncer de mama diagnosticado a temprana edad ( $\leq 40$  años).
- Cáncer de mama con fenotipo triple negativo (Tipo basal) con una edad al diagnóstico de  $\leq 60$  años.
- Dos tumores malignos de mama en el mismo individuo.
- Cáncer de mama a cualquier edad, y:
  - a.  $\geq 1$  familiar de primero, segundo o tercer grado con cáncer de mama diagnosticado a  $\leq 50$  años, o
  - b.  $\geq 1$  familiar de primero, segundo o tercer grado con cáncer de ovario epitelial diagnosticado a cualquier edad, o

- c.  $\geq 2$  familiar de primero, segundo o tercer grado con cáncer mama y/o de páncreas diagnosticado a cualquier edad, o
- d. Originario de una población de alto riesgo.
  - $\geq 1$  familiar de la misma línea con cáncer de mama y  $\geq 1$  cáncer de páncreas, cáncer de próstata agresivo, sarcoma, carcinoma adrenocortical, tumores cerebrales, cáncer de endometrio, leucemia/linfoma, cáncer de tiroides, manifestaciones dermatológicas (Características del síndrome de Cowden) y/o macrocefalia, pólipos en el tubo digestivo y cáncer de estómago.
    - Cáncer de ovario.
    - Cáncer de mama en hombre.

### **3.3 Extracción de ADN:**

A cada participante se le extrajo una muestra de 2 mL de sangre periférica la cual fue almacenada en tubos con el anticoagulante EDTA a 4°C hasta el momento del aislamiento del ADN genómico. Para ello se emplearon 300-400  $\mu$ L de sangre y mediante una modificación del método descrito por Miller y cols. (1988) se aisló el ADN genómico a través del método de precipitación salina. Cada persona fue identificada mediante un código inequívoco.

La cantidad, concentración y el índice  $A_{260}/A_{280}$  fueron determinados por espectrofotometría y la integridad del ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y revelado con bromuro de etidio.

### **3.4 Estandarización de la amplificación de secuencias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa:**

Se amplificaron secuencias específicas que contienen las variantes alélicas 1846G>A (*CYP2D6\*4*), 1707delT (*CYP2D6\*6*) y 100C>T (*CYP2D6\*10*) del gen *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* mediante la PCR.

Para la amplificación del alelo 4 se siguieron las recomendaciones de Hanioka y cols. (1990) y Lemos y cols. (1999), y para el alelo 6 lo descrito en el trabajo Sachse

y cols. (1997). Los oligonucleótidos cebadores empleados para amplificar las secuencias que contienen alelo 10 de *CYP2D6* y al polimorfismo -582C>T del gen *TC21/R-RAS2* fueron diseñados de acuerdo a lo descrito por Grunenwald (2003) empleando los programas FastPCR (Kalendar y cols., 2011), Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2009) y OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, 2013) utilizando la secuencia génica disponible en la base de datos del *European Bioinformatics Institute* (*CYP2D6*: ENSG00000100197; *TC21*: ENSG00000133818). En la Tabla 1 se encuentra resumida la secuencia y las características de los iniciadores.

Las condiciones de cada reacción de amplificación fueron estandarizadas realizando curvas de concentración de los reactivos empleados en la PCR. La primera reacción de PCR se realizó bajo condiciones estándar (Grunenwald, 2003), posteriormente se ajustó la concentración del cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) variando la concentración (1,0- 4,5 mM). Una vez determinada la concentración óptima del  $MgCl_2$ , ésta se mantuvo constante y se ensayaron las concentraciones de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) 75-175  $\mu M$ . Para el ensayo siguiente se mantuvieron fijas las concentraciones óptimas de  $MgCl_2$  y dNTPs y se ensayaron las concentraciones de los oligonucleótidos iniciadores 0,150- 0,250  $\mu M$ . Por último se realizó la curva de ADN genómico molde con 20-40 ng y la ADN polimerasa termoestable (GoTaq®): 0,75- 1,25 U. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu L$  bajo las condiciones recomendadas por el fabricante de la enzima GoTaq® y en cada reacción se colocó un control negativo. La incubación se realizó en un termociclador marca BIO-RAD®, modelo C100™.

El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de amplificación (Desnaturalización 94°C durante 45 s; hibridación de cebadores 60°C por 45 s; extensión 72°C por 1 min). Al final de los 30 ciclos se realizó una extensión final de 7 min a 72°C.

**Tabla 1. Iniciadores usados para la amplificación mediante PCR de secuencias del gen *CYP2D6* y *TC21***

Nombre	Región de interés	Secuencia de los iniciadores (5'→3')	Tm (°C)
<i>CYP2D6</i> *4 (rs3892097)	Sitio de corte y empalme entre el intrón 3 y exón 4	D: GCTTCGCCAACCACTCCG	59,5
		R: AAATCCTGCTCTTCCGAGGC	57,4
<i>CYP2D6</i> *6 (rs5030655)	Exón 3	D:CCTGGGCAAGAAGTCGCTGGAC <u>C</u> CAG	65,3
		R: GAGACTCCTCGGTCTCTCG	56,2
<i>CYP2D6</i> *10 (rs1065852 )	Exón 1	D: AACGCTGGGCTGCACG <u>G</u> TAC	63,1
		R: TGATGGTCCATG <u>I</u> CGGTGAGCA	60,7
<i>TC21</i> (rs11023197)	Promotor	D: CACTGTCACAACCACCAGCCCAT	61,9
		R: GCTCCTCTACGCGTCTCCGCA	63,6

D: Oligonucleótido cebador directo. R: Oligonucleótido cebador reverso; los nucleótidos subrayados corresponden cambios que se han realizado en la secuencia de los oligonucleótidos cebadores para introducir una diana de restricción y/o eliminar la formación de dímeros de iniciadores. Tm: Temperatura de fusión (Por su nombre en inglés *Melting temperatura*). En paréntesis se encuentra el número de acceso del polimorfismo génico descritos en la base de datos de los SPNs del *National Center for Biotechnology Information*.

Los productos de amplificación de *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*10* y *TC21* tienen tamaño esperado de 354, 353, 540 y 507 pb, respectivamente. La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 29:1) teñido con sales de plata.

El proceso de revelado con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) implicó las siguientes etapas: a) Fijación: el gel fue sumergido en solución de ácido acético al 10% durante 20 min; b) Lavado con agua destilada; c) Impregnación: el gel fue colocado durante 15 min en una solución compuesta por  $\text{AgNO}_3$  al 0,1% y formaldehído al 0,06%; d) Segundo lavado con agua destilada; e) Revelado: se incubó el gel hasta la aparición de las bandas con la solución reveladora (NaOH 1,5% y formaldehído 0,06%). Finalmente, se detiene la reacción descartando la solución reveladora y agregando solución de ácido acético al 10% (Benbouza y cols., 2006). La imagen del gel fue captada por un equipo de fotodocumentación marca BIO-RAD<sup>®</sup> modelo GelDoc<sup>™</sup> XR+.

### **3.5 Determinación del genotipo de *CYP2D6* y *TC21*:**

Mediante la técnica de RFLP se determinaron los genotipos de *CYP2D6* y *TC21*. Esta técnica se fundamenta en el reconocimiento diferencial de sitios de restricción en distintas muestras de ADN, debido a que la presencia de un polimorfismo genético puede crear o eliminar una secuencia reconocida por una enzima de restricción, lo cual conduce a la generación de fragmentos de restricción con tamaños específicos cuyo perfil puede evidenciarse mediante electroforesis (Gormus y cols., 2012).

Los fragmentos de restricción esperados para cada genotipo se encuentran resumidos en la Tabla 2. Las condiciones de incubación para la digestión fueron las recomendadas por el fabricante de las enzimas de restricción.

Como puede notarse, en todos los casos los sujetos heterocigotos poseen un perfil de fragmentos de restricción que combina los perfiles de los sujetos con y sin los polimorfismos.

Para la asignación del genotipo se analizó el perfil de los productos de restricción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% y 11% (acrilamida:bisacrilamida 29:1) teñido con sales de plata como ha sido descrito anteriormente.

**Tabla 2. Fragmentos de restricción esperados en los polimorfismos 1846G>A (*CYP2D6\*4*), 1707delT (*CYP2D6\*6*) y 100C>T (*CYP2D6\*10*) del gen *CYP2D6* y -582C>T de *TC21* mediante el Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción**

Variante	Producto PCR (pb)	Enzima de restricción	Alelo silvestre	Alelo polimórfico
<i>CYP2D6*4</i>	354	<i>Bst</i> OI	105, 249	354
<i>CYP2D6*6</i>	353	<i>Bst</i> OI	163, 190	23, 139, 190
<i>CYP2D6*10</i>	540	<i>Kpn</i> I	520, 20	540
-582C> <i>TTC21</i>	507	<i>Rsa</i> I	20, 106, 381	20, 47, 106, 334

### 3.6 Reconstrucción de los haplotipos del gen *CYP2D6* y determinación del fenotipo metabolizador:

A partir de los datos genotípicos obtenidos del análisis molecular de la población, se realizó la reconstrucción de los haplotipos mediante análisis bayesiano

utilizando el programa PHASE Versión 2.1 (Stephens y Donnelly, 2003). En la Tabla 3 se definen los haplotipos esperados, los cuales son denominados como: \*1, \*4, \*4*Bas*, \*6 y \*10 (Fuselli y cols., 2004; Sistonen y cols., 2007); el haplotipo \*1 se encuentra vinculado a un nivel de actividad de CYP2D6 normal (Haplotipo rápido), los haplotipos \*4, \*4*Bas* y \*6 generan a CYP2D6 sin función (Haplotipo lento) y el haplotipo \*10 se asocia con una actividad enzimática disminuida (Haplotipo intermedio).

**Tabla 3. Haplotipos de CYP2D6**

Haplotipo	CYP2D6*10	CYP2D6*6	CYP2D6*4	Actividad enzimática
*1	C	T	G	Normal
*4	T	T	A	Nula
*4 <i>Bas</i>	C	T	A	Nula
*6	C	DelT	G	Nula
*10	T	T	G	Disminuida

Los nombres de los haplotipos son los sugeridos por el *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*, Fuselli *et al* (2004) y Sistonen *et al* (2007).

Mediante los haplotipos de CYP2D6 se infirió el fenotipo metabolizador de los individuos, clasificando a los sujetos en tres grupos: a) Metabolizadores lentos, corresponde a los sujetos que poseen sólo haplotipos lentos en ambas cromosomas, b) Metabolizadores intermedios, presentan al haplotipo intermedio en ambas cromosomas o alguna de las siguientes combinaciones de haplotipos: rápido/intermedio; intermedio/lento o rápido/lento, c) Metabolizadores rápidos, sujetos que no poseen los haplotipos lentos o intermedio.

La asignación del fenotipo metabolizador se realizó a través de una modificación de lo descrito por el grupo de Schroth (2009).

### **3.7 Análisis combinado de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 y los genotipos de TC21:**

Los sujetos estudiados fueron clasificados en 3 grupos de acuerdo a lo descrito por el equipo de Rokavec (2008). El grupo A denominado también *TC21\_wt/CYP2D6\_rápido* se encontró compuesto por sujetos metabolizadores rápidos de CYP2D6 y genotipo *TC21-582C/C*. En el grupo B se incluyeron a sujetos que cumplan cualquiera de las siguientes características: B-1) Individuos con un metabolismo intermedio o lento de CYP2D6 y *TC21-582C/C* (*TC21\_wt/CYP2D6\_afectado*); o B-2) Personas metabolizadoras rápidas de CYP2D6 y con genotipos de *TC21 -582C/T* o *T/T* (*TC21\_mut/CYP2D6\_rápido*). El grupo C se encontró compuesto por sujetos metabolizadores intermedios o lentos y con genotipos de *TC21 -582C/T* o *T/T* (*TC21\_mut/CYP2D6\_afectado*).

En síntesis los grupos A, B y C fueron catalogados como respondedores buenos, intermedios y malos, respectivamente.

### **3.8 Análisis estadístico:**

#### **3.8.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento:**

El equilibrio de Hardy-Weinberg fue determinado a partir de las frecuencias alélicas de las variantes 1846G>A (*CYP2D6\*4*), 1707delT (*CYP2D6\*6*) y 100C>T (*CYP2D6\*10*) del gen *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/R-RAS2* empleando el programa POPGENE Versión 1.31 (Yeh y Boyle, 1997).

El desequilibrio de ligamiento fue evaluado en cada par de polimorfismos empleando los datos haplotípicos de *CYP2D6* mediante el cálculo de dos estadísticos,  $D'$  y  $r^2$ . La diferencia entre la frecuencia de un haplotipo observado y esperado es denominado desequilibrio de ligamiento y es representado por la letra  $D$ , un valor

diferente a 0 indica que existe desequilibrio de ligamiento entre los alelos de los *loci* evaluados. El estadístico  $D'$  es un valor normalizado de  $D$ , expresado en un rango de -1 a 1; el estadístico  $r^2$  es un coeficiente de determinación y evalúa el grado de correlación de los alelos, el valor de  $r^2$  se encuentra entre 0 a 1 (Langae y Shin, 2010).

Para el cálculo de los estadísticos,  $D'$  y  $r^2$  se utilizó el programa Arlequin Versión 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Sólo los sitios polimórficos con una frecuencia alélica mayor al 5% fueron incluidos en el análisis debido a la reducción del poder de detección del desequilibrio de ligamiento observado en situación contraria (Goddard y cols., 2000).

### **3.8.2 Análisis descriptivo:**

Se realizó con el paquete estadístico SPSS 19 (*Statistical Pacckage for the Social Sciences*) (2010).

La prueba de  $X^2$  con la corrección de Yates fue utilizada para el análisis de la distribución de genotipos, alelos, haplotipos y fenotipo metabolizador entre las dos muestras incluidas en este estudio y entre la población de referencia y otras poblaciones reportadas en la literatura. Se estableció un valor de  $p$  menor de 0,05 para que las diferencias sean significativas.

### **3.9 Declaración de conflicto de interés:**

Esta investigación fue conducida en ausencia de cualquier relación comercial y de financiamiento con un algún ente privado que pueda ser interpretado como un posible conflicto de interés.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Características del grupo de referencia:

El grupo de referencia (n= 145) se encontró constituido por 72,4% (n= 105) de mujeres y 27,6% (n= 40) de hombres, todos mayores de edad con una media de 32,5 ± 10,6 años.

#### 4.2 Características clínicas y del tumor de los pacientes:

El grupo de pacientes con cáncer de mama (n= 47) se encontró compuesto 97,9% (n= 46) de mujeres y 2,1% (n= 1) de hombres, la edad promedio fue de 49 ± 12 años.

En relación a las características clínicas, del total de pacientes incluidos en el estudio 44,7% (n= 21) se encontraron en estado premenopáusicos y 53,2% (n= 25) en estado postmenopáusicos antes de iniciar los esquemas de quimioterapia citotóxica, el 2,1% (n= 1) restante corresponde al género masculino. Se evaluaron dos variables clínicas independientes asociadas con el pronóstico de la enfermedad, el tamaño del tumor y el estatus de ganglios linfáticos regionales, determinándose que al momento del diagnóstico el 93,6% (n= 44) de los pacientes poseen tumores con un tamaño mayor a 2 cm, mientras que en 6,4% (n= 3) el tamaño fue menor a 2 cm. En cuanto al estatus de los ganglios linfáticos regionales, se determinó que 29,8% (n= 14) no poseen metástasis ganglionar (N0); 61,7% (n= 29) poseen metástasis en el grupo de ganglios linfáticos axilares ipsilaterales del nivel I y II siendo móviles los ganglios afectados (N1); y el 8,5% (n= 4) poseen metástasis ipsilateral con ganglios fijos en los niveles axilares I y II o mamario interno y/o metástasis ipsilateral en los ganglios linfáticos ubicados en el nivel III (N2 + N3) (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes

Característica	No. de pacientes (n= 47)	%
<b>Edad (Años)</b>	49 ± 12	100
<b>Género:</b>		
Femenino	46	97,9
Masculino	1	2,1
<b>Estado menopáusico:</b>		
Premenopáusico	21	44,7
Postmenopáusico	25	53,2
No aplica	1	2,1
<b>Tamaño del tumor (cm):</b>		
≤2	3	6,4
>2	44	93,6
<b>Estatus de ganglios linfáticos:</b>		
N0	14	29,8
N1	29	61,7
N2 + N3	4	8,5
<b>Metástasis distante:</b>		
Si	6	12,8
No	41	87,2
<b>Estadios clínico:</b>		
Estadio I	3	4,3
Estadio II	20	42,6
Estadio III	19	40,4
Estadio IV	5	12,8
<b>Estatus del receptor de estrógenos:</b>		
Positivo	17	36,2
Negativo	29	61,7
Desconocido	1	2,1
<b>Estatus del receptor de progesterona:</b>		
Positivo	19	40,4
Negativo	27	57,5
Desconocido	1	2,1
<b>Estatus del HER2:</b>		
Positivo	33	70,2
Negativo	13	27,7
Desconocido	1	2,1

En lo que respecta al estadio clínico según la clasificación TNM (Tabla 4 y 5), el 4,3% (n= 2), 42,6% (n= 20), 40,4% (n= 19) y 12,8% (n= 6) de los pacientes fueron diagnosticados en los estadios I, II, III y IV, respectivamente.

**Tabla 5. Frecuencia del estadio clínico del cáncer de mama al momento del diagnóstico**

<b>Estadio</b>	<b>No. de pacientes (n=47)</b>	<b>%</b>
IA	2	4,3
IIA	5	10,6
IIB	15	31,9
IIIA	9	19,1
IIIB	7	14,9
IIIC	3	6,4
IV	6	12,8
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>100,0</b>

Clasificación TNM del *American Joint Committee on Cancer*.

El tipo histológico de los tumores fue evaluado por un médico patólogo, determinando que el tipo más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante, representando el 83% (n= 39) de los casos evaluados, le sigue en frecuencia, con un 10,6% (n= 5) el carcinoma lobulillar infiltrante y el resto a los otros grupos histológicos.

El estatus de los receptores de estrógenos, progesterona y HER2 fue analizado mediante inmunohistoquímica en un laboratorio especializado, determinándose que 36,2% (n= 17) son receptores de estrógenos positivos; 40,4% (n= 19) receptores de progesterona positivo; 70,2% (n= 33) HER2 positivo y 2,1% (n= 1) desconocido. A partir de esta información se realizó una subtipificación molecular de los pacientes de los cuales 10,6% (n= 5) corresponden al tipo Luminal A; 40,4% (n= 19) Luminal B; 29,8% (n= 14) HER2; 17,0% (n= 8) basal y 2,1% (n= 1) desconocido (Tabla 6).

**Tabla 6. Frecuencia del tipo molecular cáncer de mama**

<b>Tipo</b>	<b>No. de pacientes (n= 47)</b>	<b>%</b>
<b>Luminal A</b>	5	10,6
<b>Luminal B</b>	19	40,4
<b>HER2</b>	14	29,8
<b>Basal</b>	8	17
<b>Desconocido</b>	1	2,1

Características moleculares obtenidos del estudio inmunohistoquímico.

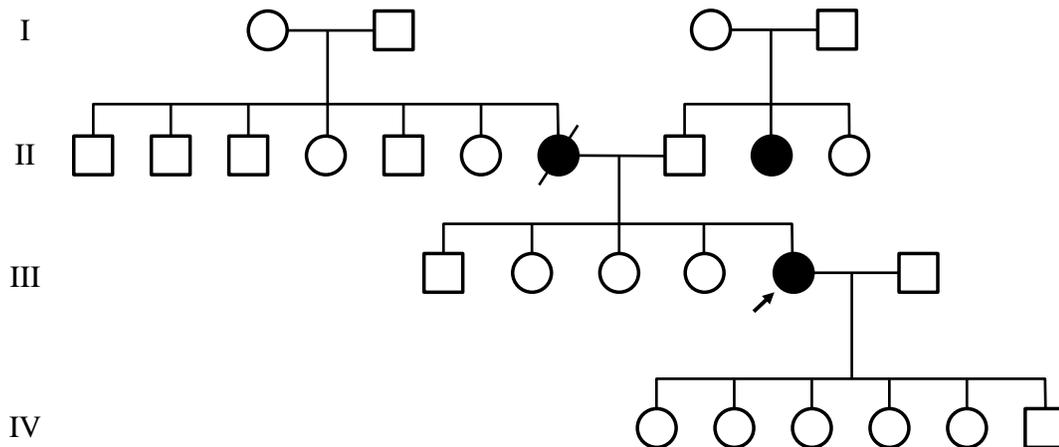
Adicionalmente, se documentó que 51,0% (n= 24) de los pacientes tienen tumores que son receptores hormonales positivos (ER positivos y/o PR positivo); 46,8% (n= 22) son receptores hormonales negativos y se desconoce la situación del 2,1% (n= 1) de los pacientes.

#### **4.2.1 Frecuencia del cáncer de mama hereditario/familiar:**

De los 47 pacientes con cáncer de mama incluidos en la investigación se identificó que el 10,6% (n= 5) poseen características sugestivas de cáncer de mama hereditario/familiar. A continuación se describe cada caso:

- a) Caso 1: Femenina de 56 años de edad, con cáncer de mama inflamatorio, de tipo luminal B en estadio IV. Presenta antecedentes personales de cáncer de mama contralateral (Diagnosticado a los 50 años) y de un familiar de primer grado (madre) y otro de segundo grado (tía paterna) afectada por cáncer de mama (Figura 4).
- b) Caso 2: Masculino de 46 años de edad, con carcinoma ductal infiltrante, de tipo luminal B en estadio IIIA. Sin antecedentes personales ni familiares de cáncer de mama.
- c) Caso 3: Femenina de 27 años de edad, con carcinoma ductal infiltrante, de tipo basal en estadio IIIA. Sin antecedentes personales ni familiares de cáncer de mama.
- d) Caso 4: Femenina de 45 años de edad, con carcinoma ductal infiltrante, de tipo basal en estadio IV. Con antecedentes de cáncer en la línea materna, madre afectada por cáncer de mama y útero, abuela padeció de cáncer de mama y abuelo de cáncer de pulmón; en relación a la línea paterna, padre y abuela afectados por cáncer de laringe.
- e) Caso 5: Femenina de 48 años de edad, con carcinoma ductal infiltrante, de tipo luminal B en estadio IV. Presenta antecedentes personales de cáncer de mama contralateral diagnosticado a los 46 años.

**Figura 4. Genealogía del caso 1 sospecho de cáncer de mama hereditario/familiar**



Señalado con una flecha se encuentra el caso índice que corresponde a una paciente femenina de 56 años de edad, con antecedentes personales de cáncer de mama contralateral diagnosticado a los 50 años, también posee el antecedente de su madre muerta por cáncer de mama. Como puede notarse, en la IV generación existen 6 familiares directos con alto riesgo de cáncer de mama hereditario/familiar.

#### **4.3 Condiciones de amplificación de secuencias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa:**

Las condiciones finales de las reacciones de amplificación de las secuencias que contienen a los polimorfismos 1846G>A (*CYP2D6\*4*), 1707delT (*CYP2D6\*6*) y 100C>T (*CYP2D6\*10*) del gen *CYP2D6* y -582C>T del gen *TC21* se encuentran resumidas en la Tabla 7.

Posterior a la optimización de las cuatro reacciones de PCR se obtuvo un producto único sin bandas inespecíficas, además se probó la reproducibilidad del ensayo en todos los individuos que integran la muestra.

**Tabla 7. Condiciones óptimas de amplificación mediante PCR de las secuencias que contienen a las variantes alélicas *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*10* y -582C>T de *TC21***

Reactivo	<i>CYP2D6*4</i>	<i>CYP2D6*6</i>	<i>CYP2D6*10</i>	<i>TC21</i>
dNTPs (μM)	110	120	120	120
Cebadores(μM)	175	200	200	150
Mg <sup>2+</sup> (mM)	1,75	1,75	1,75	1,75
GoTaq® (UI/25 μL)	0,85	0,80	0,80	0,80
ADN molde (ng/25 μL)	27,5	25	25	20

dNTPs: Desoxirribonucleótidostrifosfatos; Mg<sup>2+</sup>: Magnesio; GoTaq®: ADN polimerasa termoestable marca GoTaq® de Promega.

#### 4.4 Frecuencia genotípica del gen *CYP2D6* y *TC21/RRAS2*:

En relación a la población de referencia (voluntarios sanos), se determinó que el polimorfismo 1846G>A del gen *CYP2D6* en estado heterocigoto y homocigoto se encuentra con una frecuencia de 20,7% (n= 30) y 4,1% (n= 6), respectivamente; la ausencia del polimorfismo cataloga a los sujetos como silvestres para *CYP2D6\*4*, siendo la forma más frecuente, 75,2% (n= 112). En cuanto a los genotipos de *CYP2D6\*6*, sólo se encontró en estado heterocigoto con una frecuencia de 0,7% (n= 1), el resto correspondió al genotipo salvaje (99,3%). La variante *CYP2D6\*10* también se encontró sólo en estado heterocigoto, cuya frecuencia fue de 24,1% (n= 35) mientras que el genotipo silvestre presentó una frecuencia de 75,9% (n= 110). En lo que respecta al polimorfismo -582C>T del gen *TC21*, se determinó que el genotipo más abundante fue el C/C con una frecuencia de 50,3% (n= 73), seguido de los genotipos C/T y T/T con una frecuencia de 41,4% y 8,3%, respectivamente.

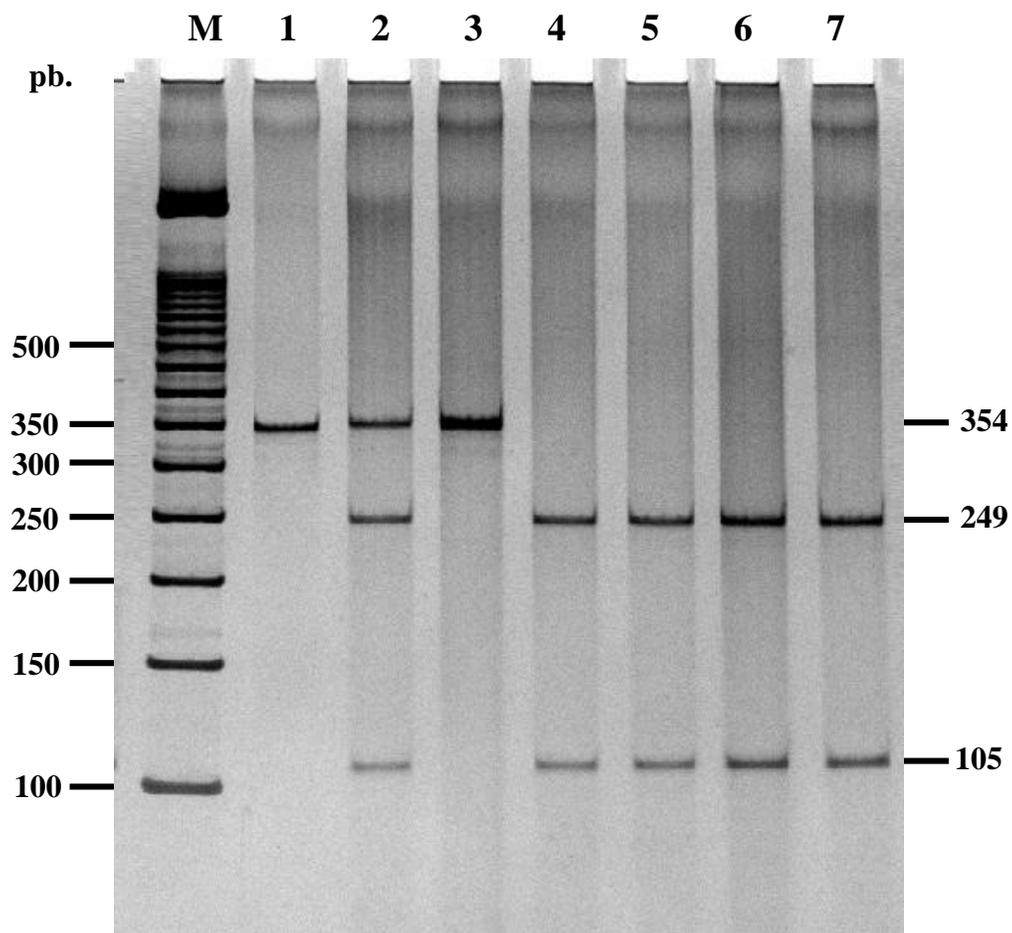
En el grupo de pacientes con cáncer de mama receptores hormonales positivos (n=24), se determinó que los polimorfismos 1846G>A (*CYP2D6*\*4) y 100C>T (*CYP2D6*\*10) de *CYP2D6* sólo se encuentran en estado heterocigoto presentando una frecuencia de 20,8% (n= 5) siendo el estado salvaje para el análisis de esta variante la forma más abundante con una proporción de 79,2% (n =19); la variante 1707delT (*CYP2D6*\*6) no fue encontrada en el grupo de pacientes. En lo que respecta al polimorfismo -582C>T del gen *TC21*, se encontró que los genotipos C/C y C/T presentaron una frecuencia de 45,8% y 54,2%, respectivamente; el genotipo T/T no fue encontrado en este grupo.

En las Figuras 5, 6, 7 y 8 se muestra un ejemplo del perfil electroforético obtenido para los genotipos de los sistemas *CYP2D6*\*4, *CYP2D6*\*6 y *CYP2D6*\*10 y -582C>T de *TC21*, respectivamente.

#### **4.5 Frecuencia de las variantes alélicas 1846G>A (*CYP2D6*\*4), 1707delT (*CYP2D6*\*6) y 100C>T (*CYP2D6*\*10) del gen *CYP2D6* y -582C>T de *TC21*:**

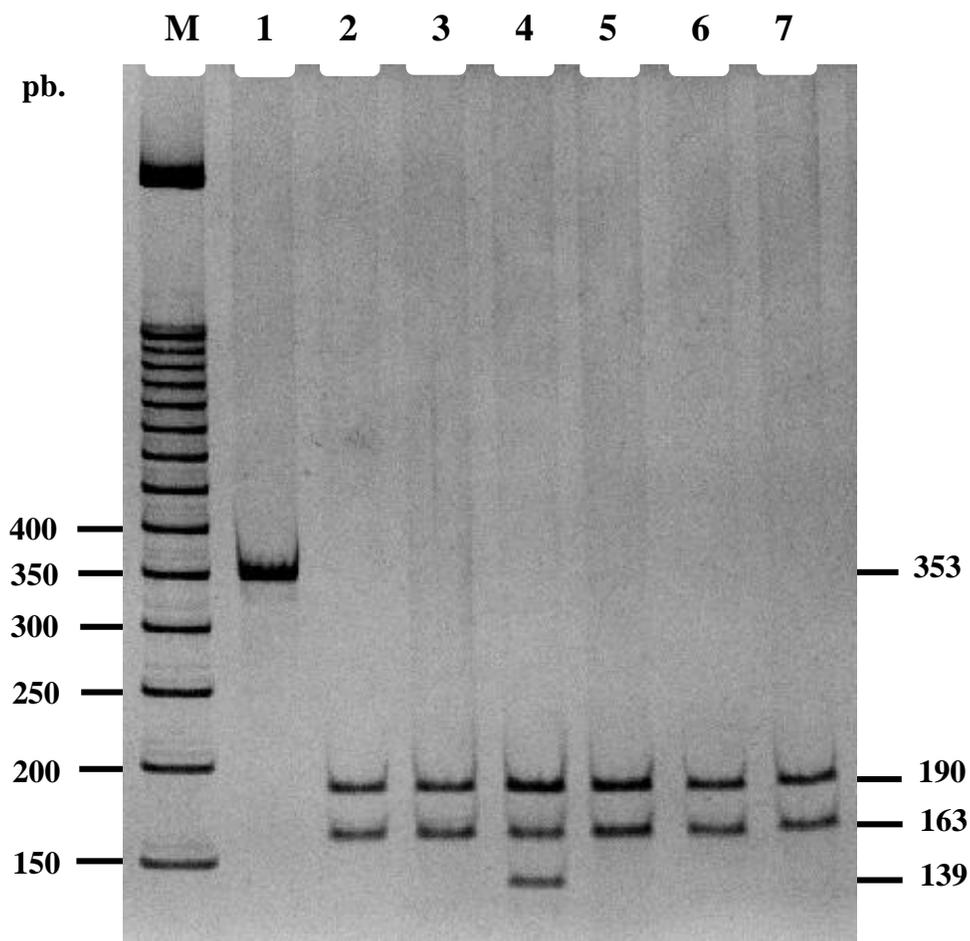
Se evaluaron un total de 290 cromosomas de la población de referencia (145 individuos) determinándose que en los voluntarios sanos los alelos \*1 (ausencia de los polimorfismos evaluados),\*4, \*6 y \*10 del gen *CYP2D6* se encuentran en una frecuencia de 73,1% (n= 212), 14,5% (n= 42), 0,3% (n= 1) y 12,1% (n= 35), respectivamente. En relación a los alelos del polimorfismo -582C>T del gen *TC21* se determinó que el alelo C, relacionado con una baja expresión de la enzima, se encuentra con una frecuencia de 71,0% (n= 206); mientras que el alelo T, asociado con un aumento de la expresión de *TC21*, se encontró con una frecuencia de 29,0% (n= 84) (Tabla 8 y 9).

**Figura 5. Visualización de los genotipos del polimorfismo 1846G>A (*CYP2D6*\*4) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%**



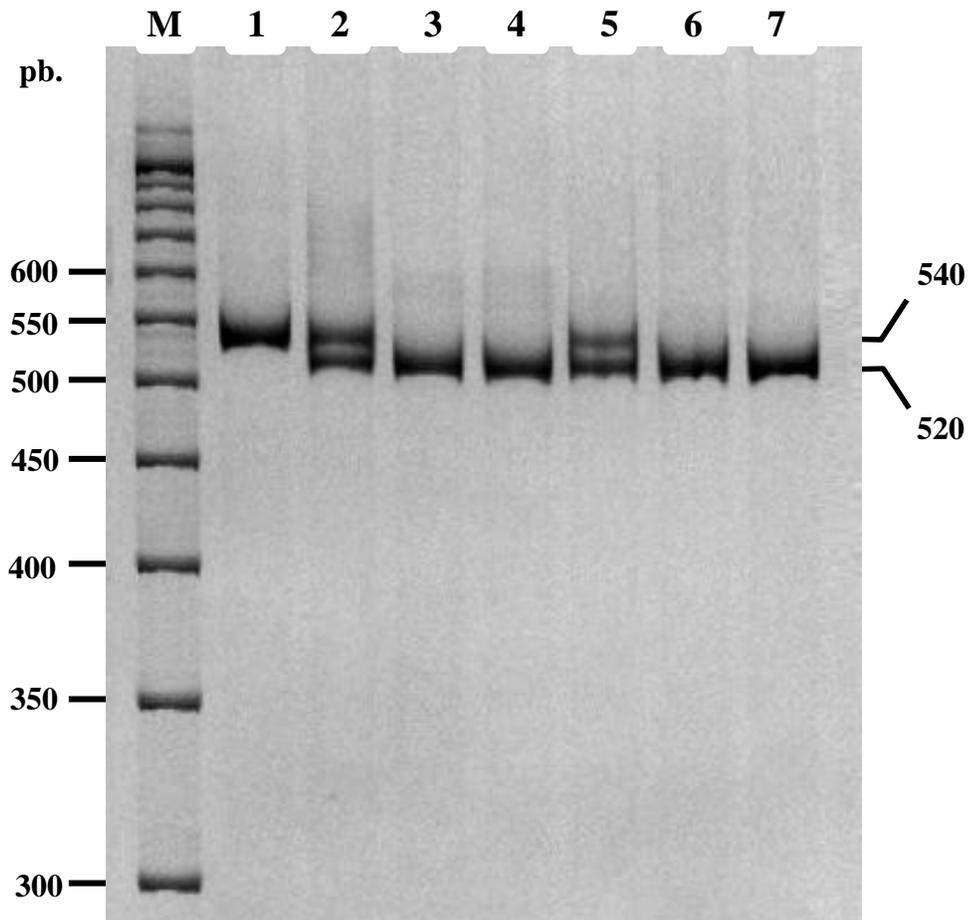
M: Marcador de 50 pb; Carril 1: Producto PCR de 354 pb sin digerir; Carril 2: Sujeto con el genotipo \*1/\*4; Carril 3: Individuo con el genotipo \*4/\*4; Carriles 4-7: Sujetos con el genotipo \*1/\*1.

**Figura 6. Visualización de los genotipos del polimorfismo 1707delT (*CYP2D6\*6*) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%**



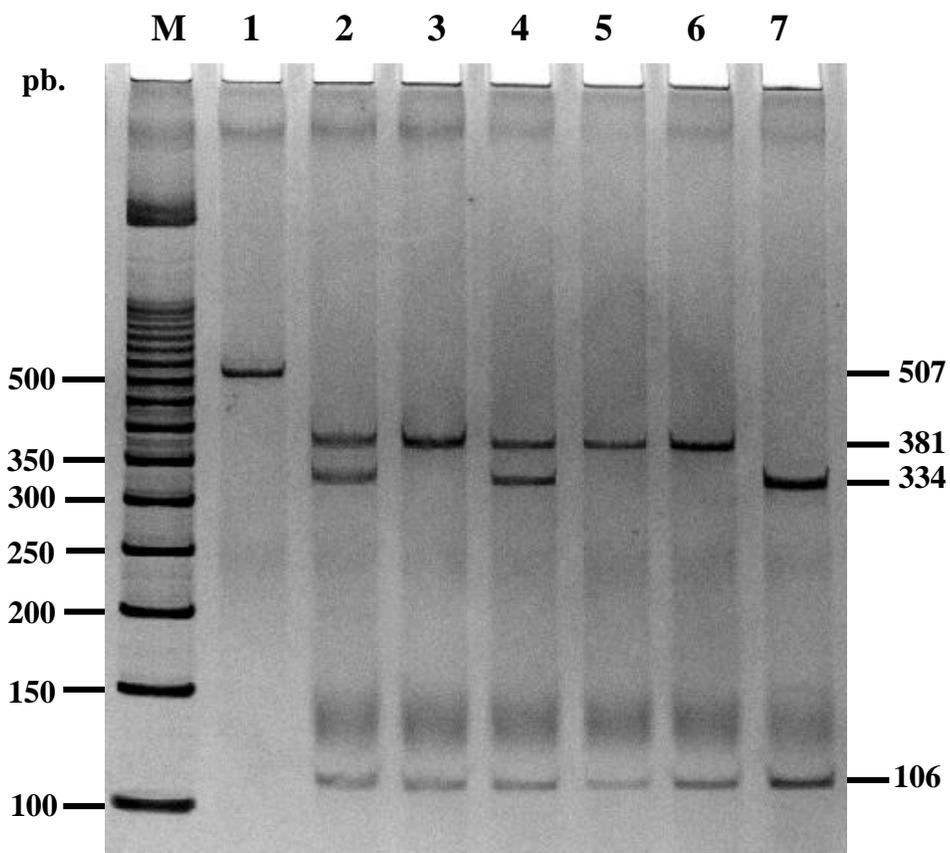
M: Marcador de 50 pb; Carril 1: Producto PCR de 353 pb sin digerir; Carriles 2,3,5-7: Sujetos con el genotipo *wt/wt*; Carril 4: Individuo con el genotipo *wt/\*6*.

**Figura 7. Visualización de los genotipos del polimorfismo 100C>T (*CYP2D6\*10*) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 11%**



M: Marcador de 50 pb; Carril 1: Producto PCR de 540 pb sin digerir; Carriles 2 y 5: Sujetos con el genotipo *wt/\*10*; Carril 3, 4, 6 y 7: Individuos con el genotipo *wt/wt*.

**Figura 8. Visualización de los genotipos del polimorfismo -582 del gen *TC21* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%**



M: Marcador de 50 pb; Carril 1: Producto PCR de 507 pb sin digerir; Carriles 2 y 4: Sujetos con el genotipo C/T; Carriles 3, 5 y 6: Individuos con los genotipos C/C; Carril 7: Sujeto con el genotipo T/T.

En lo que respecta al grupo de pacientes con cáncer de mama receptores hormonales positivos, se evaluaron 48 cromosomas (24 individuos). En cuanto a los alelos del gen *CYP2D6*, se encontró que el alelo \*1 tuvo una frecuencia de 79,2% (n= 38) y de los polimorfismos *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*6* y *CYP2D6\*10* fue de 10,4% (n= 5), 0% (n= 0) y 10,4% (n= 5), respectivamente. Por otro lado, el alelo C del polimorfismo -582C>T del gen *TC21* se encontró con una frecuencia de 72,9% y el alelo T con una de 27,1% (Tabla 8).

**Tabla 8. Frecuencia alélica de los polimorfismos 1846G>A (*CYP2D6\*4*), 1707delT (*CYP2D6\*6*), 100C>T (*CYP2D6\*10*) y -582C>T de *TC21* obtenida en la muestra de voluntarios aparentemente sanos y pacientes con cáncer de mama**

<b>Alelo</b>	<b>Voluntarios [% (n)]</b>	<b>Pacientes [% (n)]</b>
<i>CYP2D6*1</i>	73,1 (212)	79,2 (38)
<i>CYP2D6*4</i>	14,5 (42)	10,4 (5)
<i>CYP2D6*6</i>	0,3 (1)	0 (0)
<i>CYP2D6*10</i>	12,1 (35)	10,4 (5)
<i>TC21-582C</i>	71,0 (206)	72,9 (35)
<i>TC21-582T</i>	29,0 (84)	27,1 (13)

**Tabla 9. Frecuencia de los alelos \*1, \*4, \*6 y \*10 del gen *CYP2D6* obtenida en la muestra de voluntarios aparentemente sanos evaluados en el presente trabajo y otras poblaciones**

Población	Chr	FRECUENCIA ALÉLICA [% (n)]					
		*1	*4	*6	*10	$X^2$	$p$
Presente estudio	290	73,1 (212)	14,5 (42)	0,3 (1)	12,1 (35)	Ref.	Ref.
<sup>a</sup> Afroamericanos	544	92,6 (504)	3,9 (21)	0,6 (3)	2,9 (16)	59,37	<0,001
<sup>a</sup> Caucásicos americanos	694	77,1 (535)	19,7 (137)	1,0 (7)	2,2 (15)	41,23	<0,001
<sup>b</sup> Ecuatorianos	236	88,1 (208)	10,6 (25)	0 (0)	1,3 (3)	26,01	<0,001
<sup>c</sup> Embera <sup>ψ</sup>	306	78 (239)	14 (43)	1,1 (3)	6,9 (21)	4,39	0,223
<sup>d</sup> Espanoles	898	80,1 (719)	16,5 (148)	1,2 (11)	2,2 (20)	46,38	<0,001
<sup>c</sup> Guaimí <sup>δ</sup>	688	64,9 (447)	17,1 (118)	0,5 (3)	17,5 (120)	6,12	0,106
<sup>c</sup> Mediterráneos	494	55,5 (274)	17,8 (88)	8,1 (40)	18,6 (92)	33,91	<0,001
<sup>f</sup> México-americanos	528	86,8 (458)	10 (53)	0,4 (2)	2,8 (15)	31,77	<0,001
<sup>g</sup> Nicaragüenses	196	82,7 (162)	14,2 (28)	0 (0)	3,1 (6)	11,51	0,009

Chr: Cromosomas evaluados;  $\delta$ : Amerindios de Panamá;  $\psi$ : Amerindios de Colombia;  $p$ : Valor  $p$  obtenido al aplicar el estadístico chi-cuadrado ( $X^2$ ) con la corrección de Yates. Fuente: a: Gaedigk y cols. (2008); b: Dorado y cols. (2012); c: Jorge y cols. (1999); d: Almoguera y cols. (2010); e: Sistone y cols. (2007); f: Luo y cols. (2005); g: Llerena (2012).

#### **4.6 Frecuencia haplotípica y del fenotipo metabolizador de *CYP2D6*:**

Se encontró que en los voluntarios sanos la frecuencia del haplotipo \*1 es 84,2% (n= 244), mientras que la de los haplotipos \*4, \*4*bas*, \*6 y \*10 fue de 11,0 % (n= 32), 3,5% (n= 10), 0,3% (n= 1) y 1,0% (n= 3), respectivamente (Tabla 10). En el grupo de pacientes la frecuencia de haplotipo \*1 fue de 89,6% (n= 43) y del haplotipo \*4 de 10,4% (n= 5) (Tabla 11A).

A partir de los datos haplotípicos de cada individuo se determinó el fenotipo metabolizador de *CYP2D6*, determinándose en la población de referencia una frecuencia de metabolizadores rápidos de 72,4% (n= 105), metabolizadores intermedios de 23,5% (n= 34) y metabolizadores lentos de 4,1% (n= 6). En el grupo de pacientes, se encontró que el 79,2% (n= 19) correspondían a los metabolizadores rápidos y el otro 20,8% (n= 5) a los metabolizadores intermedios (Tabla 11B).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los voluntarios sanos y los pacientes en lo respecta a la frecuencia haplotípica de *CYP2D6* y del fenotipo metabolizador de *CYP2D6*.

#### **4.7 Análisis combinado de los fenotipos metabolizadores de *CYP2D6* y los genotipos de *TC21*:**

En los voluntarios sanos el Grupo A (*TC21*\_wt/*CYP2D6*\_rápido) presento una frecuencia de 34,5% (n= 50). El Grupo B presentó una frecuencia de 53,8% (n= 78); el subgrupo B-1 (*TC21*\_wt/*CYP2D6*\_afectado) tuvo una frecuencia de 15,9% (n= 23), mientras que en el subgrupo B-2 (*TC21*\_mut/*CYP2D6*\_rápido) fue de 37,9 (n= 55). En el Grupo C (*TC21*\_mut/*CYP2D6*\_afectado) se obtuvo una frecuencia de 11,7% (n= 17) (Tabla 12).

**Tabla 10. Frecuencia haplotípica del *CYP2D6* en la muestra de voluntarios aparentemente sanos evaluados en el presente trabajo y en diferentes poblaciones**

		FRECUENCIA HAPLOTÍPICA [%(n)]					
Población	Chr	*1	*4 <sup>‡</sup>	*6	*10	X <sup>2</sup>	p
Presente estudio	290	84,2 (244)	14,5 (42)	0,3 (1)	1,0 (3)	Ref.	Ref.
África subsahariana	254	92,9 (236)	2,8 (7)	0 (0)	4,3 (11)	24,99	<0,001
Medio Oriente	296	91,1 (270)	6,8 (20)	1,4 (4)	0,7 (2)	9,07	0,028
Europa	314	79,3 (249)	17,2 (54)	0,6 (2)	2,9 (9)	2,63	0,453
Asia del centro y sur	420	88,1 (370)	8,1 (34)	0 (0)	3,8 (16)	10,21	0,017
Asia de este	482	57,9 (279)	2,7 (13)	0 (0)	39,4 (190)	156,95	<0,001
América <sup>§</sup>	216	96,8 (209)	3,2 (7)	0 (0)	0 (0)	17,93	<0,001

Chr: Cromosomas evaluados; ‡: Incluye al haplotipo \*4*Bas*; §: Grupo compuesto por poblaciones de Pimas, Mayas, Colombianos, Karitiana y Surui. Datos poblacionales tomados del trabajo de Sistonen y cols. (2007). *p*: Valor *p* obtenido al aplicar el estadístico chi-cuadrado (X<sup>2</sup>) con la corrección de Yates.

**Tabla 11. Frecuencia haplotípica y del fenotipo metabolizador de *CYP2D6* obtenida en la muestra de voluntarios aparentemente sanos y pacientes con cáncer de mama**

A)

<b>Haplotipo</b>	<b>Voluntarios [% (n)]</b>	<b>Pacientes [% (n)]</b>
*1	84,2 (244)	89,6 (43)
*4	11,0 (32)	10,4 (5)
*4 <i>Bas</i>	3,5 (10)	0 (0)
*6	0,3 (1)	0 (0)
*10	1,0 (3)	0 (0)

B)

<b>Fenotipo metabolizador</b>	<b>Voluntarios [% (n)]</b>	<b>Pacientes [% (n)]</b>
Rápido	72,4 (105)	79,2 (19)
Intermedio	23,5 (34)	20,8 (5)
Lento	4,1 (6)	0 (0)

**Tabla 12. Frecuencia del fenotipo responder del tamoxifeno obtenido del análisis combinado de los fenotipos metabolizadores de CYP2D6 y los genotipos de *TC21***

<b>Fenotipo metabolizador de CYP2D6 y genotipo -582C&gt;T de <i>TC21</i></b>	<b>Grupo</b>	<b>Voluntarios [% (n)]</b>	<b>Pacientes [% (n)]</b>
<i>TC21_wt</i> /CYP2D6_rápido	A	34,5 (50)	41,7 (10)
<i>TC21_wt</i> /CYP2D6_afectado o <i>TC21_mut</i> /CYP2D6_rápido	B	53,8 (78)	41,7 (10)
<i>TC21_mut</i> /CYP2D6_afectado	C	11,7 (17)	16,6 (4)

*TC21\_wt*: Genotipo de C/C de *TC21*; CYP2D6\_rápido: Metabolizador rápido o extensivo de CYP2D6; CYP2D6\_afectado: Metabolizar intermedio o lento de CYP2D6; *TC21\_mut*: Genotipos T/C o T/T; Grupo A: Respondedor bueno; Grupo B: Respondedor intermedio; Grupo C: Respondedor malo.

En cuanto al grupo de pacientes con cáncer de mama receptores hormonales positivos, se encontró que el Grupo A y B presentaron una frecuencia de 41,7% (n= 10) cada uno, con una proporción de 4,2% (n= 1) y 37,5% (n= 9) para los subgrupos B-1 y B-2, respectivamente. En el Grupo C, se documentó una frecuencia de 16,7% (n= 4) (Tabla 12).

#### 4.8 Equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento:

Se determinó que en la muestra de voluntarios sanos y pacientes con cáncer de mama receptores hormonales positivos los polimorfismos 1846G>A, 1707delT y 100C>T del gen *CYP2D6* y la variante -582C>T del gen *TC21* se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p>0,05$ ).

En la población de referencia y pacientes con cáncer de mama se determinó que los polimorfismos 1846G>A y 100C>T del gen *CYP2D6* se encuentran en desequilibrio de ligamiento. En los voluntarios sanos el valor de los estadísticos evaluados fue de  $D' = 0,90$  y  $r^2 = 0,65$  ( $p<0,001$ ); y en los pacientes de  $D' = 1,00$  y  $r^2 = 1,00$  ( $p<0,001$ ), lo cual indica un fuerte desequilibrio de ligamiento.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

El tamoxifeno es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama hormonosensibles, documentándose que en Venezuela es utilizado aproximadamente en el 66% de los pacientes con dicha entidad nosológica (Bergamo y cols., 2011). La respuesta clínica depende de varios factores que incluyen las características clínicas y el perfil genético del sujeto, entre otros.

La información clínica conseguida en este estudio (n= 47) indica que una proporción importante de los pacientes con cáncer de mama (53,2%) son diagnosticados en estadios clínicos avanzados (Estadios III y IV) (Tablas 4 y 5). Esta situación constituye un serio problema de salud pública debido a la influencia sobre el nivel de respuesta terapéutica en función del estadio clínico de la enfermedad; así según datos suministrados por la *American Cancer Society*<sup>®</sup> (2013) se ha determinado que la tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes en los estadios III y IV es de 72% y 22%, respectivamente, mientras que los pacientes en estadios I y II poseen una tasa de supervivencia superior a 93%. La frecuencia de los diferentes estadios clínicos es similar estadísticamente a muestras de población colombiana y Sur África, pero diferente a muestras poblacionales del Reino Unido (Piñeros y cols., 2009; Lyratzopoulos y cols., 2012; McCormack y cols., 2013). En este sentido, al analizar otras muestras de población se ha sugerido que factores étnicos, socioeconómicos y el grado de instrucción se encuentran asociados con la demora a la asistencia médica lo que retrasa el diagnóstico (Lantz y cols., 2006; Piñeros y cols., 2009). Llama la atención que esta situación esté ocurriendo en Venezuela, a pesar de las campañas publicitarias que con regularidad se realizan en el país, en relación a este aspecto cabe preguntarse si el mensaje está llegando realmente a la población, por lo tanto es importante orientar dichas campañas con un contacto mayor hacia las comunidades; por otra parte también es necesario diseñar estrategias que mejoren la detección de sujetos en estadios más tempranos.

Al analizar los datos clínicos y obtenidos del interrogatorio se determinó que la frecuencia del cáncer de mama hereditario/familiar es de 10,6%, siguiendo los criterios descritos por el *National Comprehensive Cancer Network*® de los Estados Unidos de América (2013).

Un caso representativo de cáncer de mama posiblemente hereditario corresponde al número 1, cuyo paciente de sexo femenino de 56 años de edad, con cáncer de mama inflamatorio, de tipo luminal B en estadio IV, presenta antecedentes personales de cáncer de mama contralateral (Diagnosticado a los 50 años) y antecedentes de un familiar de primer grado (madre) afectada por cáncer de mama. Las características personales y familiares hacen sospechar que el caso índice padece del Síndrome de cáncer de ovario y/o mama hereditario, el cual se debe a mutaciones en el gen *BRCA1/BRCA2* (NCCN2, 2013). Asimismo, esta situación es aplicable para los casos 2, 3 y 5.

El caso 4 corresponde a una paciente femenina de 45 años de edad, con carcinoma ductal infiltrante, de tipo basal en estadio IV. Con antecedentes de cáncer en la línea materna, madre afectada por cáncer de mama y útero, abuela padeció de cáncer de mama y abuelo de cáncer de pulmón. Los datos clínicos y de los antecedentes familiares sugieren que puede tratarse del Síndrome de cáncer de ovario y/o mama hereditario o del Síndrome de Li-fraumeni debido a que cumple también con los criterios de Chompret (Tinat y cols., 2009).

Tomando en cuenta que dentro de un grupo familiar se encuentra un número variable de individuos en riesgo de desarrollar cáncer de mama, como se muestra en la Figura 4, surge la necesidad de optimizar pruebas genéticas en nuestro medio para identificar a los miembros de la familia que posean alteraciones genéticas predisponentes al desarrollo de esta patología, como ha sido recomendado por la *American Society of Clinical Oncology* (Robson y cols., 2010).

La identificación de sujetos con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama esporádico o familiar tiene implicaciones preventivas importantes. En relación a este aspecto, la *American Society of Clinical Oncology* recomienda la quimioprevención con tamoxifeno, entre otros agentes, determinándose que el empleo de éste disminuye el riesgo de desarrollar cáncer de mama receptor de estrógeno positivo entre 31 a 67% (Visvanathan y cols., 2013). El uso del tamoxifeno en sujetos sanos con mutaciones en *BRCA1/2* como estrategia quimiopreventiva es menos claro debido al pobre desarrollo de estudios epidemiológicos; sin embargo, se ha determinado una reducción del riesgo en un 62% en personas con el *BRCA2* mutado, pero no se encontró disminución del riesgo en sujetos con *BRCA1* mutado (NCCN, 2013; King y cols., 2001).

Al analizar las características inmunohistoquímicas del tumor de los pacientes evaluados en el presente trabajo se determinó que el 51% (n= 24) tienen receptores hormonales positivos. Estos resultados son estadísticamente similares a los reportados en otras muestras de pacientes venezolanos, como es el caso de Uribe y cols. en Barquisimeto (2010) y Bergamo y cols. en Caracas (2011) y en pacientes japoneses (Yanagawa y cols. 2012), pero es menor a lo reportado por Redondo y cols. en España (2012) y Cintra y cols. en Brasil (2012). Por lo tanto, más de la mitad de los pacientes con cáncer de mama de esta muestra atendidos en el ISENA, poseen características que los convierten en un grupo de pacientes que pueden beneficiarse del uso del tamoxifeno. Sin embargo, reportes previos indican que aproximadamente el 30-50% de los pacientes tratados con este fármaco experimentan recaídas (Arpino y cols., 2008; Hoskins y cols., 2009), siendo responsable, en parte, de esta situación la presencia de alteraciones moleculares en genes que codifican a enzimas metabolizadoras de fármacos y proteínas que participan en la regulación del crecimiento celular.

En relación a este aspecto, uno de los genes más estudiados es el *CYP2D6*, debido al importante rol de su producto proteico en la generación de metabolitos

activos de tamoxifeno, 4-hidroxi-N-desmetiltamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno. En este gen se han descrito varios polimorfismos, siendo muy variable su frecuencia de acuerdo a la población analizada. Al comparar la frecuencia de los alelos \*1, \*4, \*6 y \*10 del gen *CYP2D6* en los voluntarios sanos analizados en este trabajo con nueve muestras de otras poblaciones se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los afroamericanos ( $X^2= 59,37$ ;  $p < 0,001$ ) (Gaedigk y cols., 2008), caucásicos americanos ( $X^2= 41,23$ ;  $p < 0,001$ ) (Gaedigk y cols., 2008), ecuatorianos ( $X^2= 26,01$ ;  $p < 0,001$ ) (Dorado y cols., 2012), españoles ( $X^2= 46,38$ ;  $p < 0,001$ ) (Almoguera y cols., 2010), mediterráneos ( $X^2= 33,91$ ;  $p < 0,001$ ) (Sistonen y cols., 2007), méxico-americanos ( $X^2= 31,77$ ;  $p < 0,001$ ) (Luo y cols., 2005) y nicaragüenses ( $X^2= 11,51$ ;  $p= 0,009$ ) (Llerena y cols., 2012), mientras que se determinó características similares a la población de Embera ( $X^2= 4,39$ ;  $p= 0,223$ ) (Jorge y cols., 1999) y Guaimi ( $X^2= 6,12$ ;  $p= 0,106$ ) (Jorge y cols., 1999) (Tabla 9).

La frecuencia de los haplotipos \*1, \*4 (incluyendo \*4Bas), \*6 y \*10 de *CYP2D6* del grupo de referencia fue comparada con seis poblaciones (Tabla 9), determinándose que existen diferencias estadísticamente significativas con la población de África subsahariana ( $X^2= 24,99$ ;  $p < 0,001$ ), medio Oriente ( $X^2= 9,07$ ;  $p= 0,028$ ), Asia del centro y sur ( $X^2= 10,21$ ;  $p= 0,017$ ), Asia del Este ( $X^2= 156,95$ ;  $p < 0,001$ ) y América (Pimas, Mayas, Colombianos, Karitiana y Surui) ( $X^2= 17,93$ ;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la población de Europa ( $X^2= 2,63$ ;  $p= 0,453$ ) (Sistonen y cols., 2007) (Tabla 12).

Otro candidato asociado recientemente con la respuesta al tratamiento del tamoxifeno es el gen *TC21/RRAS2* (Rokavec y cols., 2008); en relación a este gen se determinó que en la muestra de voluntarios sanos la frecuencia de los genotipos asociados con pobre respuesta al tratamiento (Genotipos C/T o T/T) es de 49,7%, mientras que el resto corresponde al genotipo C/C, el cual se asocia con una respuesta eficiente al tratamiento con tamoxifeno. Al comparar la frecuencia de los alelos C y T del polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* observadas en la población

analizada se encontraron marcadas diferencias con la población de Asia ( $X^2= 5,57$ ;  $p= 0,018$ ) y África subsahariana ( $X^2= 24,74$ ;  $p<0,001$ ) y se determinó que no existen diferencias significativas con la población de Europa ( $X^2= 2,45$ ;  $p= 0,117$ ) (Datos obtenidos de la base de datos de los SNPs de la *National Center for Biotechnology Information*), sin embargo, en los datos de Europa no se describen los países donde procede la información. Estos resultados son concordantes a lo encontrado en la población de referencia para los haplotipos de *CYP2D6*, lo cual ilustra el aporte de la población europea a la constitución genética de los venezolanos.

Esta diferencia interpoblacional en la frecuencia de los polimorfismos de *CYP2D6* y *TC21/RRAS2* resalta la necesidad de realizar estudios descriptivos poblacionales relativos a estos polimorfismos, previos al desarrollo de investigaciones clínicas, sobre todo en una población mestiza, como la venezolana, donde no existen datos publicados para el gen *TC21/RRAS2* y hay muy pocos estudios relacionados con polimorfismos del gen *CYP2D6*, entre ellos los de Griman y cols. en muestra de población Centrooccidental (2009). La generación de estos conocimientos constituye una de las bases necesarias para emprender estudios farmacogenéticos no sólo sobre el valor predictivo de la respuesta al tamoxifeno, sino también en relación a otros fármacos en cuya metabolismo interviene *CYP2D6*, como los empleados en psiquiatría (Clomipramina, vortioxetina, clozapina, flovoxamina, iloperidona, imipramina, desipramina, nortriptilina, pimizida, risperidona, doxepin, trimipramina y perfenazina), en cardiología (metoprolol, propafenona, propranolol), en neurología (Quinidina, tetrabenazina) y en urología (Tolterodina), en donde se ha determinado que el nivel de actividad de *CYP2D6* incluye sobre el efecto terapéutico (FDA, 2014). Es conocido que en la actualidad la FDA y la *European Medicines Agency* (EMA) han recomendado incluir en 141 fármacos el efecto en la modificación de la actividad de diversas enzimas metabolizadores de fármacos, cuya evidencia clínica, ha demostrado que individuos con determinadas características fenotípicas, bien sea como consecuencia de la presencia de variantes genéticas o por

interacción medicamentosa, pueden experimentar efectos adversos y responder o no a un tratamiento específico (Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, 2013; FDA, 2014; EMA, 2014).

Esta situación ha conducido a diseñar algoritmos de dosificación de antidepresivos en función del genotipo de *CYP2D6*, requiriendo algunos sujetos sólo la quinta parte de la dosis habitual mientras que otros requieren hasta 40% más de la dosis recomendada (Kirchheiner y cols., 2001). Así, en relación a la propafenona, fármaco antiarrítmico, los pacientes con un metabolismo lento tienen mayor riesgo de experimentar arritmias cardíacas y un excesivo bloqueo beta adrenérgico que los metabolizadores rápidos (FDA: 3261581); otro ejemplo lo representa la vortioxetina, medicamento utilizado en la depresión mayor, cuya dosis habitual es de 20 mg/día, aconsejándose disminuir la dosis a 10 mg/día en metabolizadores lentos e incluso reducirlo a 5 mg/día si el sujeto es metabolizador lento y consume de forma concomitante algún inhibidor de *CYP2D6* (FDA: 3381579).

Otro dato poblacional de importancia clínica obtenido en esta investigación, es el desequilibrio de ligamiento, cuyo análisis es un prerequisite fundamental para el diseño de estudios de asociación debido a que éste varía ampliamente de una población a otra, siendo necesario que exista un fuerte desequilibrio de ligamiento para emprender tales estudios (Sistonen y cols., 2007; Zhao y cols., 2003; Stephens y cols., 2001).

A partir de los datos haplotípicos se determinó el valor de  $D' = 0,90$  y  $r^2 = 0,65$  entre los polimorfismos 1846G>A y 100C>T del gen *CYP2D6*, este hecho indica una fuerte asociación no aleatoria de dichas variantes, lo cual había sido sugerido previamente por nuestro grupo de investigación al analizar los genotipos de *CYP2D6* en una muestra más pequeña de residentes del Estado Aragua (Flores-Angulo y cols., 2013). El hecho que estas variantes se encuentren en desequilibrio de ligamiento indica que el segmento de 1.748 pb que comprende a ambas variantes se hereda en

bloque y experimenta poca recombinación. Datos similares de desequilibrio de ligamiento para el gen *CYP2D6* ha sido reportada para poblaciones de Europa, Medio Oriente y Asia del centro y del sur, pero no para África subsahariana ( $r^2 = >0,30 - <0,60$ ) (Sistonen y cols., 2007).

Al analizar los datos obtenidos en el grupo de pacientes se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas de los genes *CYP2D6* y *TC21/RRAS2* con el grupo de referencia (Tabla 8). Resultados similares para el alelo 10 ha sido documentado por Li y cols. en una muestra de pacientes chinos (2006). Sin embargo, el equipo de Abraham y cols. encontró un discreto aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama con el alelo 6 de *CYP2D6* en una muestra de la población inglesa (OR: 1,32; 95% CI: 1,04-1,68) (2011); asimismo, el equipo de Khedhaier al analizar una muestra de pacientes con cáncer de mama en estado postmenopáusicos determinó que existe mayor frecuencia del alelo 4 de *CYP2D6* en estado homocigoto comparado con un grupo control (OR: 1,79; CI: 0,97-3,31,  $p$ : 0,04) (2008). El hecho de que las variantes alélicas de *CYP2D6* y *TC21* se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos, sugiere que no existe una asociación preferencial de algún alelo a determinado grupo en la muestra analizada, empero es necesario aumentar el tamaño de la muestra de pacientes para obtener resultados concluyentes.

En lo que respecta al polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2*, no se encontraron resultados de investigaciones donde se compare la frecuencia entre un grupo de voluntarios sanos y pacientes con cáncer de mama.

En relación al fenotipo metabolizador de *CYP2D6* en los voluntarios aparentemente sanos y pacientes con cáncer de mama respectivamente, se determinó que el estrato más numeroso corresponde al de metabolizadores rápidos (72,4% y 79,2%), seguido de los metabolizadores intermedios (23,5% y 20,8%) y metabolizadores lentos (4,1% y 0%) (Tabla 11B). La importancia clínica de la estratificación de los sujetos de acuerdo a su fenotipo metabolizador se basa en la

posibilidad de predecir la respuesta clínica al tratamiento con tamoxifeno; en relación a ello, diversos estudios clínicos han determinado que los metabolizadores rápidos poseen una probabilidad de 82-95% de sobrevida libre de recurrencia a los 10 años; estos datos contrastan con el obtenido en los metabolizadores lentos cuya probabilidad es de 62-70%. La información de los metabolizadores intermedios es más ambigua, ya que la probabilidad del intervalo libre de enfermedad calculada a los 10 años es amplia, variando entre 32-77% (Kiyotani y cols., 2008; Kiyotani y cols., 2010; Teh y cols., 2012; Thompson y cols., 2011; Schroth y cols., 2009). Tal ambigüedad en la respuesta clínica de los metabolizadores intermedios puede deberse a varios factores descritos por Hertz y cols. (2012), sin embargo se atribuye un gran peso a la flexibilidad en la clasificación de estos sujetos, al origen y características de la muestra. La clasificación tan laxa de los metabolizadores intermedios ha sido analizada por Lim y cols. (2011), quienes han informado sobre la variabilidad de la concentración del endoxifeno en los metabolizadores intermedios de acuerdo a su genotipo. Por tales motivos, se torna necesario establecer un sistema de clasificación más riguroso y homogéneo debido a que los metabolizadores intermedios representan un grupo numeroso.

Es importante destacar que el estatus del fenotipo metabolizador puede variar de forma dinámica debido al uso de drogas que inhiben a CYP2D6, como es el caso de fármacos empleados en psiquiatría (Fluoxetina, paroxetina, sertralina, doxepina), gastroenterología (Cimetidina), cardiología (Amiodarona) y neurología (Ticlopidina, haloperidol) (Martínez y cols., 1999; Ohyama y cols., 2000; Ko y cols., 2000; Shin y cols., 2001; Stearns y cols., 2003; Szewczuk-Bogusławska y cols., 2004; Jin y cols., 2005), siendo comúnmente coprescritos los antidepresivos en pacientes con cáncer de mama que reciben tamoxifeno (Jin y cols., 2005; Goetz y cols., 2007). Un ejemplo de esta situación fue vista en una de las pacientes que conforman la muestra en estudio, quien posee receptores hormonales positivos, tiene fenotipo metabolizador rápido y se encontraba recibiendo fluoxetina y tamoxifeno, debido a que este último

origino efectos adversos fue sustituido por un inhibidor de la aromatasas. Por otra parte, también existe un suplemento herbal, denominado Hierba de San Juan, conocida también como *Saint Jhon's Worth (Hypericum perforatum)*, el cual es utilizado para la depresión y que también puede inhibir a CYP2D6 (Obach, 2000; Shi y Klotz, 2012); en este aspecto hay que tomar en cuenta la tendencia a tomar suplementos herbales por considerarlos inocuos, esto genera mayor preocupación porque este producto es de venta libre y hay buena disponibilidad en diversos establecimientos del país. En este sentido, se recomienda a los médicos informar a las pacientes sobre los problemas que se pueden generar por el consumo de dicho suplemento.

Debido a la complejidad de la enfermedad y del metabolismo del tamoxifeno es muy probable que alteraciones de otros genes contribuyan a determinar la respuesta farmacológica. Debido a ello, varios grupos incluyendo al de Rokavec (2008) han iniciado un estudio combinado de los metabolizadores de CYP2D6 y del gen *TC21* con la intención de mejorar el nivel de predicción. Los resultados de estudios clínicos llevados a cabo sólo analizando a polimorfismos del gen *CYP2D6* (Schroth y cols., 2007; Rokavec y cols., 2008) indican que la probabilidad de intervalo libre de recurrencia en los metabolizadores rápidos es de 90% y ~77% a los 5 y 10 años, respectivamente. Sin embargo, al realizar un estudio conjunto de *CYP2D6* y *TC21/RRAS2*, sobre el mismo grupo de pacientes, se determinó una mejoría del nivel de predicción del intervalo libre de recurrencia del Grupo A, que fue mayor a 93% a los 5 años y de 85% a los 10 años. Al comparar la probabilidad de intervalo libre de enfermedad de los pacientes metabolizadores intermedios y lentos con los pertenecientes al Grupo B y C, se evidenciaron resultados similares con una probabilidad a los 10 años de ~68% y 50%, correspondientemente (Schroth y cols., 2007; Rokavec y cols., 2008).

Siguiendo las recomendaciones de este grupo de investigadores la muestra analizada en este trabajo fue estratificada de acuerdo al grado de respuesta a la terapia

con tamoxifeno en los grupos denominados: A (Buen respondedor), B (Respondedor intermedio) y C (Mal respondedor); al comparar las frecuencias de dichos grupos entre los enfermos y los voluntarios sanos no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 12). La frecuencia observada en los pacientes evaluados en este trabajo es comparable a lo reportado por Rokavec y cols. (2008) ( $X^2$ : 1,70;  $p= 0,428$ ).

Al comparar la distribución de los fenotipos metabolizadores identificados en función de *CYP2D6*, con la estratificación realizada al incluir los polimorfismos del gen *TC21/RRAS2*, se observa una modificación importante. Así, en el grupo de voluntarios sanos se determinó que teóricamente el 72,4% son metabolizadores rápidos mientras que al realizar el análisis combinado de *CYP2D6* y *TC21/RRAS2* se encontró que 34,5% tiene un perfil genético que lo convierte en buen respondedor al tamoxifeno; de forma similar ocurre al analizar al grupo de pacientes, 79,2% versus 41,7%. Esta situación es un hecho notable debido que una proporción considerable de sujetos fueron clasificados inicialmente como metabolizadores rápidos a pesar de poseer características moleculares de respondedor intermedio, lo cual se pone de manifiesto al incorporar en el análisis al gen *TC21/RRAS2* (Tabla 11B y 12). De esta forma se ilustra la mejora en el nivel de predicción de respuesta al incluir otros grupos de genes cuyo producto participe en la farmacocinética y farmacodinamia del tamoxifeno.

La aplicación de las técnicas desarrolladas en el presente trabajo para determinar el fenotipo metabolizador de *CYP2D6* y el polimorfismo -582C>T del gen *TC21/RRAS2* pueden potencialmente extenderse a los individuos de alto riesgo de desarrollar cáncer de mama y que poseen indicación médica del tamoxifeno. Sin embargo, es necesario el desarrollo de un estudio epidemiológico que incluya este tipo de análisis moleculares.

A pesar que todavía no existe un consenso internacional que recomiende el uso de tamoxifeno en función del fenotipo metabolizador de *CYP2D6*; la información recopilada en un metaanálisis que incluyó a 5020 pacientes con cáncer de mama,

cuyos trabajos fueron considerados con un nivel de evidencia 4 (Estudios controlados de buena calidad) y relevancia clínica E (Evaluación del aumento del riesgo de fracaso a la terapia), el *Dutch Pharmacogenetics Working Group* recomienda que los pacientes con el fenotipo metabolizador de CYP2D6 pobre e intermedio sean tratados con otro medicamento (Swen y cols., 2008; Swen y cols., 2011).

En función de los resultados de este trabajo es menester considerar la factibilidad de replantear los esquemas de tratamiento de los pacientes afectados por cáncer de mama con la intención de disminuir la tasa de recaída y maximizar los efectos terapéuticos del tamoxifeno.

Los conocimientos generados en esta investigación contribuyen a la formación de bases de datos para el desarrollo de estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama, con el fin de determinar el verdadero impacto clínico de las variantes génicas estudiadas debido a la clara diferencia que existe entre nuestra población y otras. Así mismo, es fundamental vincular esta información con las organizaciones médicas para la aplicación de estos conocimientos lo cual repercutirá positivamente a nivel económico y sobre el bienestar de los pacientes.

## CONCLUSIONES

1. Una proporción importante de los pacientes con cáncer de mama (51%) son diagnosticados en estadios III y IV. Esta situación representa un serio problema de salud pública debido a que en dichos estadios la probabilidad de supervivencia es considerablemente más baja en relación a los estadios I y II.

2. El 89,4% de los pacientes tiene características de cáncer de mama esporádico, mientras que el 10,6% restante cumple criterios que indican la posibilidad de cáncer de mama hereditario/familiar, situación que amerita evaluación por parte de genetista.

3. Existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la frecuencia de los alelos de *CYP2D6* y *TC21/RRAS2*, entre las muestras de los voluntarios sanos analizados en este trabajo y las de muestras similares en otras poblaciones, lo cual resalta la necesidad de realizar un análisis poblacional inicial para el posterior diseño de estudios farmacogenéticos.

4. En la presente investigación se ha desarrollado un ensayo que permite la identificación del fenotipo respondedor del tamoxifeno, basado en el análisis del fenotipo metabolizador de *CYP2D6* y el genotipo de *TC21*. Más de la mitad (51%) de los pacientes con cáncer de mama atendidos en el ISENA poseen tumores que son receptores hormonales positivos, siendo este grupo el que potencialmente se beneficie de la terapia hormonal. En este segmento de pacientes se ha determinado que el 41,7% posee características que lo convierten en un buen respondedor (Grupo A) a la terapia hormonal basada en tamoxifeno, mientras que el 58,3% tiene un perfil que sugiere una respuesta intermedia y pobre a la terapia (Grupo B y C). Aunque existe controversia en cuanto a la respuesta del tamoxifeno en función de datos genéticos, es conveniente replantear los esquemas de tratamiento para estos pacientes.

5. Los alelos *CYP2D6*\*4 y \*10 se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento ( $D' = 0,90$  y  $r^2 = 0,65$ ), siendo esta situación importante para el desarrollo de estudios de asociación.

6. En virtud que el fenotipo metabolizador para *CYP2D6*, puede ser modificado en función del tratamiento con fármacos habitualmente indicados en psiquiatría (Fluoxetina, paroxetina, sertralina, doxepina), en gastroenterología (Cimetidina), en cardiología (Amiodarona), en neurología (Ticlopidina, haloperidol) y por el suplemento herbal denominado hierba de San Juan, este aspecto debe ser tomado muy en cuenta por los médicos tratantes.

7. Se dispone de una base de datos de la población aragüeña que permite la reconstrucción haplotípica mediante análisis bayesiano de sujetos que requieran análisis genético previo al inicio de la terapia con tamoxifeno.

### **RECOMENDACIONES**

1. Diseñar estrategias de detección precoz del cáncer de mama para diagnosticar la enfermedad en estadios más temprano con la intención de disminuir la tasa de mortalidad.

2. Evaluar en conjunto con un médico genetista a los pacientes con características sugestivas de cáncer de mama hereditario/familiar, así como a sus familiares.

3. Analizar muestras de voluntarios sanos de otras regiones de Venezuela

4. Aumentar en el tamaño de la muestra de pacientes con cáncer de mama.

5. Incorporar a este estudio otros polimorfismos de los genes evaluados.

6. Analizar otros genes vinculados con la respuesta al tratamiento en el cáncer de mama, por ejemplo: *CYP3A4/5*, UDP-glucuronosiltransferasas, sulfottransferasas, entre otros.

7. Realizar un estudio clínico en muestras de población aragüeña con el fin de evaluar el impacto de las variantes genéticas sobre la respuesta al tratamiento con tamoxifeno y otros medicamentos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkareem IH & Zurmi IB. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger J Clin Pract*, 15(1), 9-14.
- Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C & et al. (2011). CYP2D6 gene variants and their association with breast cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20(6), 1255-8.
- Alarcón B & Martínez-Martín N. (2012). RRas2, RhoG and T-cell phagocytosis. *Small GTPases*, 3(2), 97-101.
- Almoguera B, Riveiro-Alvarez R, Gomez-Dominguez B, Lopez-Rodriguez R, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C & et al. (2010). Evaluating a newly developed pharmacogenetic array: screening in a Spanish population. *Pharmacogenomics*, 11(11), 1619-25.
- American Cancer Society®. (2013). *Breast cancer*. Estados Unidos de América. Recuperado de: <http://www.cancer.org/cancer/%20breastcancer/detailedguide/breast-cancer-pdf2>
- American Cancer Society®. (2014). ASCO Guideline Update Recommends Tamoxifen for Up to 10 Years for Women With Non-Metastatic Hormone Receptor Positive Breast Cancer. Estados Unidos de América. Recuperado de: <http://www.asco.org/press-center/asco-guideline-update-recommends-tamoxifen-10-years-women-non-metastatic-hormone>
- Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK & Schiff R. (2008). Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev*, 29(2), 217-33.
- Ayoub N, Lucas C & Kaddoumi A. (2011). Genomics and pharmacogenomics of breast cancer: current knowledge and trends. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(5), 1127-40.
- Bergamo L, Bolívar E, Godoy A, Carrero N, Betancourt L, Romero G & et al. (2011). Tratamiento preservador del cáncer de la mama: Dos años de experiencia. *Rev venez oncol*, 23(1), 46-49.
- Bergh J, Jönsson PE, Lidbrink EK, Trudeau M, Eiermann W, Brattström D & et al. (2012). FACT: An Open-Label Randomized Phase III Study of Fulvestrant and Anastrozole in Combination Compared With Anastrozole Alone as First-Line Therapy for Patients With Receptor-Positive Postmenopausal Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 30(16), 1919-25.

- Bernhardt R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol*, 124(1), 128-45.
- Bijl MJ, van Schaik RH, Lammers LA, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T & et al. (2009). The CYP2D6\*4 polymorphism affects breast cancer survival in tamoxifen users. *Breast Cancer Res Treat*, 118(1), 125-30.
- Boccardo F, Rubagotti A, Puntoni M, Guglielmini P, Amoroso D, Fini A & et al. (2005). Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole Trial. *J Clin Oncol*, 23(22), 5138-47.
- Brábek J, Constancio SS, Siesser PF, Shin NY, Pozzi A & Hanks SK. (2005). Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells. *Mol Cancer Res*, 3(6), 307-15.
- Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M & Schwab M. (2009). Pharmacogenomics of Tamoxifen Therapy. *Clin Chem*, 55(10):1770-82.
- Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group, Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS, Mouridsen H, Mauriac L & et al. (2005). A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med*, 353(26), 2747-57.
- Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H & Shozu M. (2003). The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86(3-5), 219-24.
- Buzdar A, Douma J, Davidson N, Elledge R, Morgan M, Smith R & et al. (2001). Phase III, multicenter, double-blind, randomized study of letrozole, an aromatase inhibitor, for advanced breast cancer versus megestrol acetate. *J Clin Oncol*, 19(14), 3357-66.
- Cazzaniga M & Bonanni B. (2012). Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 985620, 1-15.
- Chang M. (2011). Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis. *BMB Rep*, 44(7), 423-34.
- Chia S, Gradishar W, Mauriac L, Bines J, Amant F, Federico M & et al. (2008). Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, advanced breast cancer: results from EFECT. *J Clin Oncol*, 26(10), 1664-70.
- Cintra JR, Teixeira MT, Diniz RW, Gonçalves Junior H, Florentino TM, Freitas GF & et al. (2012). Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras*, 58(2), 178-87.

- Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. (2013). *PharmaGKB. Pharmacogenomics. Knowledge. Implementation*. California. Recuperado de: <http://www.pharmgkb.org>
- Contreras A & Ferri N. (2010). Hormonoterapia en pacientes premenopáusicas con cáncer de mama. *Rev Venez Oncol*, 22(4), 268-277.
- Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Paridaens R, Jassem J, Delozier T & et al. (2004). A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med*, 350(11), 1081-92.
- Coutiño EMR, Purata A & Hernández P. (2010). Citocromo P450 biomarcador de exposición terapeútico-toxicológico-carcinogénico. *REB*, 29(2), 39-52.
- Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK & Lee AV. (2005). Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol*, 23(30), 7721-35.
- Cuzick J, Sestak I, Bonanni B, Costantino JP, Cummings S, DeCensi A & et al. (2013). Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet*, 381(9880), 1827-34. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671272/?report=reader>
- Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M & et al. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*, 381(9869), 805-16.
- Dezentjé VO, Guchelaar HJ, Nortier JW, van de Velde CJ & Gelderblom H. (2009). Clinical implications of CYP2D6 genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer. *Clin Cancer Res*, 15(1), 15-21.
- Dixom JM. (2014). Endocrine resistance in breast cancer. *New Journal of Science*, 1-28.
- Dorado P, Cáceres M, Pozo-Guisado E, Wong ML, Licinio J & Llerena A. (2005). Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Biotechniques*, 39(10 Suppl), S571-4.
- Dorado P, Heras N, Machín E, Hernández F, Teran E & Llerena A. (2012). CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *Eur J Clin Pharmacol*, 68(5), 637-44.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and

- 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 365(9472), 1687-717.
- Ensembl. (2013). *Human (GRCh37)*. Reino Unido. Recuperado de: <http://www.ensembl.org/>
- Erdogan M, Pozzi A, Bhowmick N, Moses HL & Zent R. (2007). Signaling pathways regulating TC21 -induced tumorigenesis. *J Biol Chem*, 282(38), 27713-20.
- European Medicines Agency. (2014). *Science medicine health*. Reino Unido. Recuperado de: <http://www.ema.europa.eu/>
- Excoffier L & Lischer HEL. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- Falany JL, Pilloff DE, Leyh TS & Falany CN. (2006). Sulfation of raloxifene and 4-hydroxytamoxifen by human cytosolic sulfotransferases. *Drug Metab Dispos*, 34(3), 361-8.
- Fernández L, Chirino R, Fernández JP & Torres S. (2004). Bases de la resistencia al tratamiento hormonal en el cáncer de mama. *Biocáncer*, 2. Recuperado de: <http://www.biocancer.com/journal/199/bases-de-la-resistencia-al-tratamiento-hormonal-en-el-cancer-de-mama>
- Flores-Angulo C, Villegas C, Martínez J & Moreno N. (2012). Identificación del fenotipo metabolizador (gen *CYP2D6*) en pacientes con cáncer de mama: Ensayos preliminares del proyecto PEII n° 1290. En: *tomo 2 de libro de resúmenes, ponencias, simposios y feria - exposición del Primer Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación LOCTY-PEII*. pp. 274.
- Flores-Angulo C, Villegas C, Martínez JA, Mora Y, Oropeza T & Moreno N. (2013). Frecuencia de los polimorfismos 1846G>A, 1707delT y 100C>T del gen *CYP2D6* en una muestra de población residente del estado Aragua. *Acta Científica Venezolana*, 63(Sup1), 23-24.
- Food and Drug Administration. (2014). *Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling*. Estados Unidos de América. Recuperado de: <http://www.fda.gov>
- Fox EM, Andrade J & Shupnik MA. (2009). Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids*, 74(7), 622-7.
- Fuselli S, Dupanloup I, Frigato E, Cruciani F, Scozzari R, Moral P & et al .(2004). Molecular diversity at the *CYP2D6* locus in the Mediterranean region. *Eur J Hum Genet*, 12(11), 916-24.

- Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M & Meyer UA. (1991). Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet*, 48, 943-50.
- Gaedigk A, Gotschall RR, Forbes NS, Simon SD, Kearns GL & Leeder JS. (1999). Optimization of cytochrome P4502D6 (CYP2D6) phenotype assignment using a genotyping algorithm based on allele frequency data. *Pharmacogenetics*, 9(6), 669-82.
- Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ & Leeder JS. (2008). The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther*, 83(2), 234-42.
- Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C & et al. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*, 81(24), 1879-86.
- Goddard KA, Hopkins PJ, Hall JM & Witte JS. (2000). Linkage disequilibrium and allele-frequency for 114 single-nucleotide polymorphisms in five populations. *Am J Hum Genet*, 66(1), 216-34.
- Goetz MP, Kamal A & Ames MM. (2008). Tamoxifen pharmacogenomics: the role of CYP2D6 as a predictor of drug response. *Clin Pharmacol Ther*, 83(1), 160-6.
- Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM & et al. (2007). The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*, 101(1): 113-21.
- Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW & et al. (2005). Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol*, 23(36), 9312-8.
- Gormus U, Selvi N & Yaylim-Eraltan I. (2012). PCR-RFLP and Real-Time PCR techniques in molecular cancer investigations. En: Hernandez-Rodriguez P (Ed.), *Polymerase Chain Reaction*, ISBN: 978-953-51-0612-8, InTech, DOI: 10.5772/36866. Recuperado de: <http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/pcr-rflp-and-real-time-pcr-techniques-in-molecular-cancer-investigations>
- Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ & et al. (2003). A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med*, 349(19), 1793-802.

- Griman P, Moran Y, Camargo M & Chirullo M. (2009). Caracterización de variantes alélicas de citocromo CYP2D6 en la población de la región Centroccidental de Venezuela. *Acta Biol Colomb*, 14(1), 195-202.
- Grunenwald H. (2003). Optimization of Polymerase Chain Reactions. En: Bartlett JMS & Stirling D (Eds.), *PCR Protocols* (pp. 89-99). New Jersey: Humana Press.
- Hammes SR & Levin ER. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*, 28(7), 726-41.
- Hanioka N, Kimura S, Meyer UA & Gonzalez FJ. (1990). The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet*, 47(6), 994-1001.
- Hannemann F, Bichet A, Ewen KM & Bernhardt R. (2007). Cytochrome P450 systems --biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta*, 1770(3), 330-44.
- Harbeck N, Thomssen C & Gnant M. (2013). St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast Care (Basel)*, 8(2),102-9.
- Hertz DL, McLeod HL & Irvin WJ Jr. (2012). Tamoxifen and CYP2D6: a contradiction of data. *Oncologist*, 17(5), 620-30.
- Hoskins JM, Carey LA & McLeod HL. (2009). CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(8), 576-86.
- Integrated DNA Technologies. (2013). *OligoAnalyzer 3.1*. Estados Unidos de América. Recuperado de: <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>
- International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE & et al. (2009). Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*, 360(8), 753-64.
- Jakesz R, Jonat W, Gnant M, Mittlboeck M, Greil R, Tausch C & et al. (2005). Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet*, 366(9484), 455-62.
- Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH & et al. (2005). CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 97(1): 30-9.
- Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjöqvist F & Ingelman-Sundberg M. (1994). Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus:

- characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*, 46(3), 452-9.
- Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV & et al. (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*, 85(2), 151-9.
- Jonat W, Gnant M, Boccardo F, Kaufmann M, Rubagotti A, Zuna I & et al. (2006). Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncol*, 7(12), 991-6.
- Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T & Arias TD. (1999). Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics*, 9(2), 217-28.
- Kalendar R, Lee D & Schulman AH. (2011). Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 98(2), 137-144.
- Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J, Eidtmann H, Gademann G, Zuna I & et al. (2007). Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen: the ARNO 95 Study. *J Clin Oncol*, 25(19), 2664-70.
- Khedhaier A, Hassen E, Bouaouina N, Gabbouj S, Ahmed SB & Chouchane L. (2008). Implication of xenobiotic metabolizing enzyme gene (CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, mEH and NAT2) polymorphisms in breast carcinoma. *BMC Cancer*, 8,109.
- King MC, Wieand S, Hale K, Lee M, Walsh T, Owens K & et al. (2001). Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA*, 286(18), 2251-6.
- Kirchheiner J, Brøsen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S, Roots I & et al. (2001). CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand*, 104(3), 173-92.
- Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Hosono N, Tsunoda T, Kubo M & et al. (2010). Significant Effect of Polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on Clinical Outcomes of Adjuvant Tamoxifen Therapy for Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol*, 28(8), 1287-93.
- Kiyotani K, Mushiroda T, Nakamura Y & Zembutsu H. (2012). Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet*, 27(1), 122-31.

- Kiyotani K, Mushiroda T, Sasa M, Bando Y, Sumitomo I, Hosono N & et al. (2008). Impact of CYP2D6\*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci*, 99(5), 995-9.
- Ko JW, Desta Z, Soukhova NV, Tracy T & Flockhart DA. (2000). In vitro inhibition of the cytochrome P450 (CYP450) system by the antiplatelet drug ticlopidine: potent effect on CYP2C19 and CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol*, 49(4): 343-51.
- Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G & et al. (2011). The dynamic structure of the estrogen receptor. *J Amino Acids*, 2011, 812540, 1-7.
- Lahusen T, Henke RT, Kagan BL, Wellstein A & Riegel AT. (2009). The role and regulation of the nuclear receptor co-activator AIB1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 116(2), 225-37.
- Lammers LA, Mathijssen RH, van Gelder T, Bijl MJ, de Graan AJ, Seynaeve C & et al. (2010). The impact of CYP2D6-predicted phenotype on tamoxifen treatment outcome in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer*, 103(6), 765-71.
- Langaee T & Shin J. (2010). The genetic basis of pharmacogenomics. En: Zdanowicz M (Ed.), *Concepts in pharmacogenomics* (pp. 19-53). Estados Unidos de América: American Society of Health-System Pharmacists, Inc.
- Lantz PM, Mujahid M, Schwartz K, Janz NK, Fagerlin A, Salem B & et al. (2006). The influence of race, ethnicity, and individual socioeconomic factors on breast cancer stage at diagnosis. *Am J Public Health*, 96(12), 2173-8.
- Lemos MC, Cabrita FJ, Silva HA, Vivan M, Plácido F & Regateiro FJ. (1999). Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis*, 20(7), 1225-9.
- Li H, Feng L, Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J & et al. (2006). The association of CYP2D6\*10 polymorphism with breast cancer risk and clinic-pathologic characteristics in Chinese women. *Acta Oncol*, 45(5), 597-601.
- Lim JS, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RC, Wong NS & et al. (2011). Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*, 71(5), 737-50.
- Lippman M. (2008). Cáncer de mama. En: Fauci A, Braunwald B, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L & et al (Eds.), *Harrison Principios de Medicina Interna* (17a edición pp. 563-570). México, D.F: McGraw-Hill interamericana editores.
- Llerena A, Dorado P, Ramírez R, González I, Alvarez M, Peñas-Lledó EM & et al. (2012). CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *Pharmacogenomics J*, 12(2), 176-83.

- Lønning PE, Haynes BP, Straume AH, Dunbier A, Helle H, Knappskog S & et al. (2011). Exploring breast cancer estrogen disposition: the basis for endocrine manipulation. *Clin Cancer Res*, 17(15), 4948-58.
- Luo HR, Gaedigk A, Aloumanis V & Wan YJ. (2005). Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *Eur J Clin pharmacol*, 61(11), 797-802.
- Lyratzopoulos G, Abel GA, Barbiere JM, Brown CH, Rous BA & Greenberg DC. (2012). Variation in advanced stage at diagnosis of lung and female breast cancer in an English region 2006-2009. *Br J Cancer*, 106(6), 1068-75.
- Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW & et al. (2011). Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer. *Clin Pharmacol Ther*, 89(5), 718-25.
- Martínez C, Albet C, Agúndez JA, Herrero E, Carrillo JA, Márquez M & et al. (1999). Comparative in vitro and in vivo inhibition of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A by H2-receptor antagonists. *Clin Pharmacol Ther*, 65(4): 369-76.
- Masimirembwa C, Persson I, Bertilsson L, Hasler J & Ingelman-Sundberg M. (1996). A novel mutant variant of the CYP2D6 gene (CYP2D6\*17) common in a black African population: association with diminished debrisoquine hydroxylase activity. *Br J Clin Pharmacol*, 42(6), 713-9
- McCormack VA, Joffe M, van den Berg E, Broeze N, Dos Santos Silva I, Romieu I & et al. (2013). Breast cancer receptor status and stage at diagnosis in over 1,200 consecutive public hospital patients in Soweto, South Africa: a case series. *Breast Cancer Res*, 15(5), R84.
- McKenna NJ, Lanz RB & O'Malley BW. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*, 20(3), 321-44.
- Mendes-Pereira AM, Sims D, Dexter T, Fenwick K, Assiotis I, Kozarewa I & et al. (2012). Genome-wide functional screen identifies a compendium of genes affecting sensitivity to tamoxifen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(8), 2730-5.
- Miller S A, Dykes DD & Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16(3), 1215.
- Miller TW. (2013). Endocrine resistance. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 37-42.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2014). *Anuario de mortalidad, año 2011*. Caracas, Venezuela. Recuperado de: [http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&download=829:anuario2011&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915](http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=829:anuario2011&id=11:anuarios-de-mortalidad&Itemid=915)

- Nabholtz JM, Buzdar A, Pollak M, Harwin W, Burton G, Mangalik A & et al. (2000). Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. Arimidex Study Group. *J Clin Oncol*, 18(22), 3758-67.
- National Center for Biotechnology Information. (2009). *PrimerBlast*. Estados Unidos de América. Recuperado de: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)
- National Center for Biotechnology Information. (2013). *dbSNP Short genetic variations*. Estados Unidos de América. Recuperado de: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11023197](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11023197)
- National Comprehensive Cancer Network®. (2012). *Breast cancer. Version 3.2012*. Estados Unidos de América. Recuperado de: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf)
- National Comprehensive Cancer Network®. (2014). *Genetic/familial high-risk assessment: Breast and Ovarian. Version 2.2014*. Estados Unidos de América. Recuperado de: [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_screening.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf)
- Noriega-Reyes MY & Langley E. (2008). Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología*, 3, 29-40.
- Nowell SA, Ahn J, Rae JM, Scheys JO, Trovato A, Sweeney C & et al. (2005). Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 91(3), 249-58.
- Obach RS. (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther*, 294(1), 88-95.
- Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H & Yokoi T. (2000). Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: prediction of in vivo drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*, 49(3): 244-53.
- Omura T. (2010). Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J Biochem*, 147(3), 297-306.
- Osborne CK & Schiff R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*, 62, 233-47.
- Paridaens RJ, Dirix LY, Beex LV, Nooij M, Cameron DA, Cufer T & et al. (2008). Phase III study comparing exemestane with tamoxifen as first-line hormonal treatment of metastatic breast cancer in postmenopausal women: the European

- Organization for Research and Treatment of Cancer Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 26(30), 4883-90.
- Piñeros M, Sánchez R, Cendales R, Perry F & Ocampo R. (2009). Patient delay among Colombian women with breast cancer. *Salud Publica Mex*, 51, 372-380.
- Pritchard KI. (2009). Ovarian suppression/ablation in premenopausal ER-positive breast cancer patients. Issues and recommendations. *Oncology (Williston Park)*, 23(1), 27-33.
- Prossnitz ER & Barton M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7(12), 715-26.
- Puhalla S, Brufsky A & Davidson N. (2009). Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with breast cancer. *Breast*, 18(Suppl 3), S122-30.
- Radisky ES & Radisky DC. (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 201-12.
- Ramón T, Altés A, Paré L, del Rio E, Alonso C, Barnadas A & et al. (2010). Impact of CYP2D6 polymorphisms in tamoxifen adjuvant breast cancer treatment. *Breast Cancer Res Treat*, 119(1), 33-8.
- Redondo CM, Gago-Domínguez M, Ponte SM, Castelo ME, Jiang X, García AA & et al. (2012). Breast feeding, parity and breast cancer subtypes in a Spanish cohort. *PLoS One*, 7(7), e40543.
- Robson ME, Storm CD, Weitzel J, Wollins DS, Offit K & American Society of Clinical Oncology. (2010). American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*, 28(5), 893-901.
- Rockhill B, Spiegelman D, Byrne C, Hunter DJ & Colditz GA. (2001). Validation of the Gail et al. model of breast cancer risk prediction and implications for chemoprevention. *J Natl Cancer Inst*, 93(5), 358-66.
- Rokavec M, Schroth W, Amaral SM, Fritz P, Antoniadou L, Glavac D & et al. (2008). A polymorphism in the TC21 promoter associates with an unfavorable tamoxifen treatment outcome in breast cancer. *Cancer Res*, 68(23), 9799-808.
- Rong R, He Q, Liu Y, Sheikh MS & Huang Y. (2002). TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene*, 21(7), 1062-70.
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S & Roots I. (1997). Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*, 60(2), 284-95.

- Sachse C, Brockmöller J, Hildebrand M, Müller K & Roots I. (1998). Correctness of prediction of the CYP2D6 phenotype confirmed by genotyping 47 intermediate and poor metabolizers of debrisoquine. *Pharmacogenetics*, 8(2), 181-5.
- Safe S & Kim K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*, 41(5), 263-75.
- Sakaki T. (2012). Practical application of cytochrome P450. *Biol Pharm Bull*, 35(6), 844-9.
- Sausville E & Long D. (2008). Principios del tratamiento del cáncer. En: Fauci A, Braunwald B, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson L & et al (Eds.), *Harrison Principios de Medicina Interna* (17a edición pp. 514-533). México, D.F: McGraw-Hill interamericana.
- Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE & et al. (1994). Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet*, 3(6), 923-6.
- Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM & et al. (2007). Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol*, 25(33), 5187-93.
- Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S & et al. (2009). Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA*, 302(13), 1429-36.
- Shi S Klotz U. (2012). Drug interactions with herbal medicines. *Clin Pharmacokinet*, 51(2), 77-104.
- Shin JG, Kane K & Flockhart DA. (2001). Potent inhibition of CYP2D6 by haloperidol metabolites: stereoselective inhibition by reduced haloperidol. *Br J Clin Pharmacol*, 51(1): 45-52.
- Simoncini T. (2010). Mecanismos de acción de los receptores de estrógeno en células vasculares: relevancia para la menopausia y el envejecimiento. *Revista del climaterio*, 13(74), 41-47.
- Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI & et al. (2002). Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*, 20(17), 3628-36.
- Sirachainan E, Jaruhathai S, Trachu N, Panvichian R, Sirisinha T, Ativitavas T & et al. (2012). CYP2D6 polymorphisms influence the efficacy of adjuvant tamoxifen in Thai breast cancer patients. *Pharmgenomics Pers Med*, 5, 149-53.

- Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G & Fuselli S. (2007). CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics*, 17(2), 93-101.
- Smith IE, Dowsett M, Yap YS, Walsh G, Lønning PE, Santen RJ & et al. (2006). Adjuvant aromatase inhibitors for early breast cancer after chemotherapy-induced amenorrhoea: caution and suggested guidelines. *J Clin Oncol*, 24(16), 2444-7.
- SPSS & IBM Company. (2010). *IBM® SPSS® Statistics: Statistical Package for the Social Sciences, versión 19*.
- Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P & et al. (2003). Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst*, 95(23), 1758-64.
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE & et al. (2001). Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, 293(5529), 489-93.
- Stephens M & Donnelly P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*, 73(5), 1162-9.
- Steward WP & Brown K. (2013). Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Br J Cáncer*, 109(1), 1-7.
- Stopeck A. (1994-2012). *Breast cancer*. Nueva York: Medscape. Recuperado de: <http://emedicine.medscape.com/article/1947145-overview#a0101>
- Sukasem C, Sirachainan E, Chamnanphon M, Pechatanan K, Sirisinha T, Ativitavas T & et al. (2012). Impact of CYP2D6 polymorphisms on tamoxifen responses of women with breast cancer: a microarray-based study in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(9), 4549-53.
- Sun D, Sharma AK, Dellinger RW, Blevins-Primeau AS, Balliet RM, Chen G & et al. (2007). Glucuronidation of active tamoxifen metabolites by the human UDP glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 35(11), 2006-14.
- Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H & et al. (2011). Pharmacogenetics: from bench to byte— an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther*, 89(5), 662-73.
- Swen JJ, Wilting I, de Goede AL, Grandia L, Mulder H, Touw DJ & et al. (2008). Pharmacogenetics: from bench to byte. *Clin Pharmacol Ther*, 83(5), 781-7.
- Szewczuk-Bogusławska M, Kiejna A, Beszłej JA, Orzechowska-Juzwenko K & Milejski P. (2004). Doxepin inhibits CYP2D6 activity in vivo. *Pol J Pharmacol*, 56(4):491-4.

- Tan SH, Lee SC, Goh BC, Wong J. (2008). Pharmacogenetics in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 14(24), 8027-41.
- Teh LK & Bertilsson L. (2012). Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet*, 27(1), 55-67.
- Teh LK, Mohamed NI, Salleh MZ, Rohaizak M, Shahrin NS, Saladina JJ & et al. (2012). The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *AAPS J*, 14(1), 52-9.
- Thakkar JP & Mehta DG. (2011). A review of an unfavorable subset of breast cancer: estrogen receptor positive progesterone receptor negative. *Oncologist*, 16(3), 276-85.
- The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. (2014). *CYP2D6 allele nomenclature*. Recuperado de: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>
- Thompson AM, Johnson A, Quinlan P, Hillman G, Fontecha M, Bray SE & et al. (2011). Comprehensive CYP2D6 genotype and adherence affect outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen monotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 125(1), 279-87.
- Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E & et al. (2009). 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol*, 27(26), e108-9.
- UniProt Consortium. (2013). *Protein knowledgebase*. Reino Unido. Recuperado de: <http://www.uniprot.org/>
- Uribe J, Hernández C, Menolascino F, Rodríguez J, Istúriz L, Márquez M & et al. (2010). Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Rev Venez Oncol*, 22(2), 109-116.
- van Schie RM, Wadelius MI, Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, de Boer A & et al. (2009). Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design. *Pharmacogenomics*, 10(10), 1687-95.
- Van Slambrouck S, Grijelmo C, De Wever O, Bruyneel E, Emami S, Gespach C & et al. (2007). Activation of the FAK-srcmolecularscaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by alpha1-integrins during colon cancer cell invasion. *Int J Oncol*, 31(6), 1501-8.
- Verma S, Bal A, Joshi K, Arora S & Singh G. (2012). Immunohistochemical characterization of molecular subtypes of invasive breast cancer: a study from North India. *APMIS*, 120(12), 1008-19.

- Visvanathan K, Chlebowski RT, Hurley P, Col NF, Ropka M, Collyar D & et al. (2009). American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast cancer risk reduction. *J Clin Oncol*, 27(19), 3235-58.
- Visvanathan K, Hurley P, Bantug E, Brown P, Col NF, Cuzick J & et al. (2013). Use of pharmacologic interventions for breast cancer risk reduction: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*, 31(23), 2942-62.
- Wegman P, Elingarami S, Carstensen J, Stål O, Nordenskjöld B & Wingren S. (2007). Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res*, 9(1), R7.
- Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF & et al. (2012). Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*, 92(4), 414-7.
- Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN & et al. (2005). American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol*, 23(3), 619-29.
- Xu Y, Sun Y, Yao L, Shi L, Wu Y, Ouyang T & et al. (2008). Association between CYP2D6 \*10 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. *Ann Oncol*, 19(8), 1423-9.
- Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M & et al. (2012). Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes*, 5, 376.
- Yeh FC & Boyle TJB. (1997). Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129, 157.
- Zhao H, Pfeiffer R & Gail MH. (2003). Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics*, 4(2), 171-8.
- Zhou SF. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet*, 48(11), 689-723.