



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,  
FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA**

**MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS: ESTUDIO  
DE SU POSIBLE PAPEL EN EL CÁNCER DE  
MAMA Y LA RESISTENCIA A INSULINA**

**Ana González Hernández**

**Las Palmas de Gran Canaria 2011**



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA**

***A mis padres***



## **AGRADECIMIENTOS**



---

Con estas líneas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que han colaborado en la realización de este trabajo y a aquellas que me han ayudado durante estos años dedicados a la investigación.

En primer lugar quiero agradecer a mis dos directores de tesis, Nicolás Díaz Chico y Antonio Cabrera de León los conocimientos que me han transmitido, así como la confianza, el apoyo y el cariño que me han ofrecido.

Igualmente quiero darle las gracias a José Pestano Brito, quien años atrás me abrió generosamente las puertas de su laboratorio brindándome la oportunidad de dar mis primeros pasos en la investigación.

Jefes y amigos. Los tres saben que siempre les estaré agradecida.

Al Instituto Canario de Investigación del Cáncer, por la confianza y el apoyo económico prestado durante este tiempo.

A mis compañeros del grupo CDC, especialmente a M<sup>a</sup> del Cristo Rodríguez, Marta Rodríguez, Armando Aguirre, Delia Almeida, Buenaventura Brito y Santiago Domínguez. Gracias por colaborar en esta tesis, por el apoyo personal que me han prestado, y por crear un clima de trabajo agradable y positivo.

También quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a los pacientes de los servicios de oncología del Hospital Ntra. Sra. De Candelaria y Hospital Insular de Gran Canaria que participaron en este estudio.

A los doctores Javier Dorta Delgado y Adolfo Murias Rosales, así como al resto del personal de los Servicios de Oncología Médica del Hospital Ntra. Sra. de la Candelaria y del Hospital Insular de Gran Canaria, sin cuya colaboración hubiera sido imposible realizar este trabajo.

También quiero dar las gracias al director de la unidad de investigación Félix Claverie Martín por acogerme en la unidad de investigación y permitirme desarrollar mi trabajo, y al que fuera mi jefe en la Estación Experimental La Mayora, Enrique Moriones Alonso.

A los doctores Luís Henríquez Hernández y Ana María González Matilla por su colaboración desinteresada en este trabajo.

A todos los que han sido mis compañeros a lo largo de estos años tanto en la unidad de investigación, el laboratorio de genética forense, el departamento de fisiología y la estación experimental la Mayora. Gracias por toda la ayuda prestada y por hacer más agradables las horas de trabajo.

A mi familia, por su cariño incondicional, por su apoyo y su confianza en mis posibilidades.

A ti, Jesús, gracias por tu gran ayuda, tu paciencia infinita, tu enorme generosidad y tu cariño. Gracias por tantas y tantas cosas.

---



## ÍNDICES



## ÍNDICE GENERAL

### CAPITULO I: ASPECTOS GENERALES DE LOS MICROSATÉLITES.

<b>I.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS MICROSATÉLITES.....</b>	<b>3</b>
I.1.1- Los microsatélites y su distribución genómica.....	3
I.1.2- Variabilidad de los microsatélites.....	4
I.1.2.1- Mecanismos que explican la variación de la longitud de los microsatélites.....	5
I.1.3- Enfermedades causadas por la expansión de microsatélites.....	6
I.1.3.1- Enfermedades causadas por expansiones localizadas en exones...7	
I.1.3.2- Enfermedades causadas por la expansión de repeticiones en regiones no codificantes.....	8
I.1.4 - Funciones y efectos biológicos de los microsatélites.....	8
I.1.4.1- Implicación de los microsatélites en la organización de la cromatina.....	9
a) - Estructura del ADN.....	9
b)- Centrómeros y telómeros.....	10
I.1.4.2- Regulación de los procesos metabólicos del ADN: Efectos sobre la recombinación.....	10
I.1.4.3- Efectos de los microsatélites sobre la actividad génica.....	10
a)- Efectos sobre la transcripción.....	10
b) - Efectos sobre la traducción.....	11

---

I.1.5- Relaciones de los microsatélites polimórficos con otras enfermedades.....	11
--	----

<b>I.2- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>13</b>
-------------------------------	-----------

## **CAPÍTULO II: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y LA ENZIMA AROMATASA: SU RELACIÓN CON EL CANCER DE MAMA**

<b>II.1- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
--------------------------------	-----------

II.1.1- Hormonas sexuales esteroideas en la mujer.....	19
--	----

II.1.1.1- Producción de estrógenos en la mujer.....	20
---	----

II.1.1.2- Producción de andrógenos en la mujer.....	20
---	----

II.1.2- Andrógenos, estrógenos y cáncer de mama.....	22
--	----

II.1.3- El receptor de andrógenos.....	23
--	----

II.1.4- Microsatélites del receptor de andrógenos (CAG) <sub>n</sub> y (GGC) <sub>n</sub> .....	26
---	----

II.1.4.1- El microsatélite (CAG) <sub>n</sub> y su relación con la concentración y actividad del receptor.....	27
--	----

II.1.4.2- Relación entre las concentraciones de hormonas esteroideas y la longitud del microsatélite (CAG) <sub>n</sub> .....	28
---	----

II.1.4.3- El microsatélite (GGC) <sub>n</sub> y su relación con la transcripción, concentración y funcionalidad del receptor.....	28
---	----

II.1.4.4- Relación de los polimorfismos (CAG) <sub>n</sub> y (GGC) <sub>n</sub> con el cáncer de mama.....	29
--	----

II.1.5- La enzima aromatasa.....	31
----------------------------------	----

II.1.6- El microsatélite (TTTA) <sub>n</sub> de la enzima aromatasa.....	32
--	----

II.1.6.1- El microsatélite (TTTA) <sub>n</sub> y su relación con la actividad aromatasa y la concentración de hormonas sexuales.....	32
--	----

II.1.6.2- El microsatélite (TTTA) <sub>n</sub> y su relación con el cáncer de mama.....	33
---	----

---

<b>II.2- OBJETIVOS</b> .....	35
<b>II.3- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	37
II.3.1- Diseño.....	37
II.3.1.1- Participantes.....	37
a) - Características de los casos.....	37
b) - Características de los controles.....	37
II.3.1.2 -Obtención de muestras e información relevante de los casos para el estudio.....	38
II.3.1.3- Obtención de muestras e información relevante de los controles para el estudio.....	39
II.3.2- Análisis de la longitud de los microsatélites (CAG) <sub>n</sub> , (GGC) <sub>n</sub> y (TTTA) <sub>n</sub> .....	39
II.3.3- Análisis estadístico.....	41
<b>II.4- RESULTADOS</b> .....	43
II.4.1- Características de casos y controles.....	43
II.4.2- Características clínicas de los casos de cáncer de mama .....	44
II.4.3- Distribución alélica para los microsatélites (CAG) <sub>n</sub> , (GGC) <sub>n</sub> y (TTTA) <sub>n</sub> .....	45
II.4.4- Polimorfismos (CAG) <sub>n</sub> , (GGC) <sub>n</sub> y (TTTA) <sub>n</sub> y cáncer de mama.....	48
II.4.5- Combinaciones de los microsatélites (CAG) <sub>n</sub> , (GGC) <sub>n</sub> y (TTTA) <sub>n</sub> y cáncer de mama.....	55
<b>II.5- DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>II.6- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63
 <b>CAPÍTULO III: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS EN LOS GENES <i>E2F4</i>, <i>EGFR</i> Y <i>NOTCH4</i>, Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA.</b>	
<b>III.1- INTRODUCCIÓN</b> .....	77

---



---

III.1.1- Microsatélites y cáncer de mama.....	77
III.1.2- El factor de transcripción E2F4.....	78
III.1.2.1- Los factores de transcripción E2F.....	78
III.1.2.2- Función del factor de transcripción E2F4.....	80
III.1.2.3- Papel de E2F4 en el cáncer de mama.....	81
III.1.2.4- Estructura del gen <i>E2F4</i> .....	82
III.1.2.5- Microsatélite (AGC) <sub>n</sub> de <i>E2F4</i> .....	83
III.1.3- El receptor EGFR.....	84
III.1.3.1- Papel del receptor EGFR en el cáncer de mama.....	84
III.1.3.2- Estructura del receptor EGFR.....	85
III.1.3.3- Estructura del gen <i>EGFR</i> .....	86
III.1.3.4- Microsatélite (CA) <sub>n</sub> de <i>EGFR</i> .....	87
III.1.4- El receptor NOTCH4.....	88
III.1.4.1- La ruta de señalización NOTCH y el cáncer de mama.....	88
III.1.4.2- Estructura del receptor NOTCH4.....	89
III.1.4.3- Microsatélite (CTG) <sub>n</sub> del gen NOTCH4.....	91
<b>III.2- OBJETIVOS.....</b>	<b>93</b>
<b>III.3- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>95</b>
III.3.1- Diseño.....	95
III.3.1.1- Participantes.....	95
a)- Características de los casos.....	95
b)- Características de los controles.....	95
III.3.1.2-Obtención de muestras y datos relevantes para el estudio.....	95
a)- Obtención de muestras e información relevante de los casos.....	95

---

---

b)- Obtención de muestras e información relevante de los controles.....	96
III.3.2- Análisis de la longitud de los microsatélites (AGC) <sub>n</sub> , (CA) <sub>n</sub> y (CTG) <sub>n</sub> .....	96
III.3.3- Análisis estadístico.....	98
<b>III.4- RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
III.4.1- Características de casos y controles.....	101
III.4.2- Características clínicas de los casos de cáncer de mama.....	102
III.4.3- Distribución de frecuencias alélicas de los microsatélites (AGC) <sub>n</sub> , (CA) <sub>n</sub> y (CTG) <sub>n</sub> en casos y controles.....	103
III.4.4- Comparación de la longitud de los microsatélites (AGC) <sub>n</sub> , (CA) <sub>n</sub> y (CTG) <sub>n</sub> en casos y controles.....	106
<b>III.5- DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>III.6- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>115</b>
 <b>CAPÍTULO IV: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y LA ENZIMA AROMATASA: RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA</b>	
<b>IV.1- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>131</b>
IV.1.1- Hormonas sexuales esteroideas y metabolismo de la glucosa.....	131
IV.1.2- Citoquinas, resistencia a la insulina y hormonas sexuales.....	132
IV.1.2.1- Resistina y resistencia a la insulina.....	133
IV.1.2.2- Resistina y hormonas sexuales.....	133
IV.1.2.3- Leptina y resistencia a la insulina.....	134
IV.1.2.4- Relación entre la leptina y las hormonas sexuales.....	135

---

IV.1.3- Microsatélites polimórficos del receptor de andrógenos y la enzima aromatasa: su relación con el metabolismo de la glucosa.....	136
<b>IV.2- OBJETIVOS.....</b>	<b>137</b>
<b>IV.3- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>139</b>
IV.3.1- Diseño del estudio.....	139
IV.3.1.1- Participantes.....	139
IV.3.1.2- Recogida de los datos antropométricos.....	139
IV.3.1.3- Mediciones bioquímicas.....	140
IV.3.1.4- Medición de la longitud de los microsatélites.....	141
IV.3.2- Análisis estadístico.....	142
<b>IV.4- RESULTADOS.....</b>	<b>143</b>
IV.4.1- Características de los participantes.....	143
IV.4.2- Distribución alélica para los microsatélites (CAG) <sub>n</sub> , (GGC) <sub>n</sub> y (TTTA) <sub>n</sub> ...	144
IV.4.3- Relación entre la longitud de los microsatélites (CAG) <sub>n</sub> , (GGC) <sub>n</sub> y (TTTA) <sub>n</sub> y variables relacionadas con la RI.....	144
IV.4.4- Longitud de los microsatélites (CAG) <sub>n</sub> , (GGC) <sub>n</sub> y (TTTA) <sub>n</sub> y hormonas sexuales.....	148
<b>IV.5- DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>IV.6- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>157</b>
<b>CAPÍTULO V- CONCLUSIONES</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>173</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPITULO I: ASPECTOS GENERALES DE LOS MICROSATÉLITES.

I.1- Electroferograma del microsatélite (GAC) <sub>n</sub> del gen <i>E2F4</i> .....	4
I.2- Mecanismo de expansión /contracción de microsatélites mediante patinaje de hebras durante la replicación.....	5
I.3- Mecanismo de expansión /contracción de microsatélites mediante sobrecruzamiento desigual durante la recombinación meiótica.....	6
I.4- Posibles funciones y efectos de los microsatélites.....	9

### CAPÍTULO II: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y LA ENZIMA AROMATASA: SU RELACIÓN CON EL CANCER DE MAMA

II.1- Rutas de síntesis de hormonas sexuales esteroideas.....	21
II.2- El receptor de andrógenos y su mecanismo de acción.....	24
II.3- Estructura del gen y la proteína AR.....	26
II.4- Estructura del gen de la aromatasa <i>CYP19</i> .....	32
II.5- Distribución alélica para el microsatélite (CAG) <sub>n</sub> del AR.....	47
II.6- Distribución alélica para el microsatélite (GGC) <sub>n</sub> del AR.....	47
II.7- Distribución alélica para el microsatélite (TTTA) <sub>n</sub> de <i>CYP19</i> .....	48
II. 8- Distribución de frecuencias para la. tres categorías de (CAG) <sub>n</sub> de AR.....	50
II.9- Distribución de frecuencias para las tres categorías de (GGC) <sub>n</sub> de AR.....	50
II.10- Distribución de frecuencias para las tres categorías de (TTTA) <sub>n</sub> de <i>CYP19</i> .....	51

II.11- Distribución de frecuencias para el alelo medio CAGx del *AR*.....52

II.12- Distribución de frecuencias para el alelo medio GGCx del *AR* .....52

II.13- Distribución de frecuencias para el alelo medio TTTAx de *CYP19*.....53

**CAPÍTULO III: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS EN LOS GENES *E2F4*, *EGFR* Y *NOTCH4*, Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA.**

III.1- Estructura del gen *E2F4*.....82

III.2- Estructura del receptor EGFR.....85

III.3- Ruta de señalización mediada por receptores NOTCH.....91

III.4- Análisis de la longitud de los fragmentos con el software Peak Scanner.....98

III.5- Distribución de frecuencias alélicas para el microsatélite (AGC)<sub>n</sub> de *E2F4*.....104

III.6- Distribución de frecuencias alélicas para el microsatélite (CA)<sub>n</sub> de *EGFR*.....105

III.7- Distribución de frecuencias alélicas para el microsatélite (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4*.....105

III.8 Distribución de frecuencias del alelo medio para el microsatélite (CA)<sub>n</sub> de *EGFR*.....107

III.9 Distribución de frecuencias del alelo medio para el microsatélite (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4*.....107

III.10. Distribución de frecuencias para las tres categorías de (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4*.....108

III.11. Distribución de frecuencias para las tres categorías de (CA)<sub>n</sub> de *EGFR*.....109



**ÍNDICE DE TABLAS**

**CAPÍTULO II: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y LA ENZIMA AROMATASA: SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA**

Tabla II. 1- Estudios de asociación entre la longitud de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (GGC)<sub>n</sub> y el cáncer de mama.....30

Tabla II. 2- Características de casos y controles.....43

Tabla II. 3- Características clínicas de los casos de cáncer de mama.....44

Tabla II. 4- Frecuencias alélicas para (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> en casos y controles.....46

Tabla II- 5- Tamaños medios de alelos (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> en casos y controles.....49

Tabla II. 6- Análisis bivariado entre la longitud de los alelos medios CAG<sub>x</sub>, GGC<sub>x</sub> y TTTA<sub>x</sub> y el cáncer de mama.....55

Tabla II.7- Análisis multivariado de regresión logística entre de los alelos medios y el cáncer de mama CAG<sub>x</sub>, GGC<sub>x</sub> y TTTA<sub>x</sub>.....55

Tabla II.8- Análisis bivariado que muestra la asociación entre cáncer de mama y las combinaciones de los alelos medios CAG<sub>x</sub>, GGc<sub>x</sub> y TTTA<sub>x</sub>.....57

Tabla II.9- Análisis multivariado de regresión logística entre las combinaciones CAG<sub>x</sub>, GGC<sub>x</sub>, TTTA<sub>x</sub> y el cáncer de mama.....58

**CAPÍTULO III: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS EN LOS GENES *E2F4*, *EGFR* Y *NOTCH4*, Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA.**

Tabla III.1- Características de casos y controles.....101



Tabla III. 2- Características clínicas de los casos de cáncer de mama de casos y controles.....102

Tabla III. 3- Frecuencias alélicas para los microsatélites (AGC)<sub>n</sub> de *E2F4*, (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* Y (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* en casos y controles.....104

Tabla III.4 Comparación de la longitud media de alelos (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* y (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* entre casos y controles.....106

**CAPÍTULO IV: MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y LA ENZIMA AROMATASA: RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA**

Tabla IV. 1 Características generales de los participantes.....143

Tabla IV.2 Análisis de correlación entre el número de repeticiones de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y variables bioquímicas y antropométricas en varones.....145

Tabla IV.3 Análisis de correlación entre el número de repeticiones de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y variables bioquímicas y antropométricas en mujeres.....146

Tabla IV.4 Modelos multivariados de regresión lineal con la resistina como variable dependiente (varones).....147

Tabla IV. 5 Modelos multivariados de regresión lineal con el Péptido C como variable dependiente (varones).....148

Tabla IV. 6. Modelos multivariados de regresión lineal con el índice HOMA2IR como variable dependiente (varones).....148

Tabla IV.7 Correlaciones parciales entre los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y hormonas sexuales en los varones.....149

Tabla IV.8 Correlaciones parciales entre los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y hormonas sexuales en las mujeres.....150



## **CAPÍTULO I**

### **ASPECTOS GENERALES DE LOS MICROSATÉLITES**



## I.1- ASPECTOS GENERALES DE LOS MICROSATÉLITES

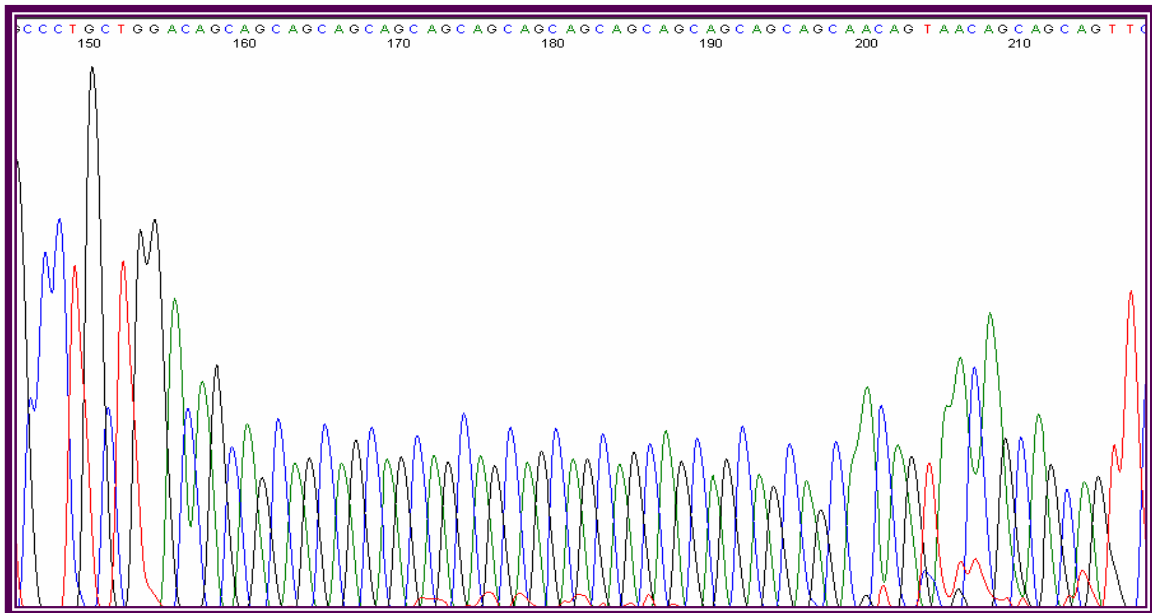
### I.1.1- LOS MICROSATÉLITES Y SU DISTRIBUCIÓN GEONÓMICA

Los microsatélites son secuencias cortas (de 1-6 pares de bases) repetidas en tándem un número variable de veces, que se encuentran de manera abundante en el genoma de organismos procariotas y eucariotas (Figura I.1). Según algunas estimaciones estas secuencias podrían ocupar alrededor del 3% del genoma humano.<sup>1,2</sup> Los microsatélites pueden localizarse en cualquier parte del genoma (exones, intrones, regiones intergénicas, etc.), aunque por lo general son más abundantes en las regiones no codificantes<sup>1</sup>. En los primates, por ejemplo, se ha estimado que únicamente el 10% de los microsatélites se encuentran en regiones codificantes.<sup>3</sup> Estas diferencias en la distribución de los microsatélites no parecen deberse puramente al azar, y podrían explicarse, al menos en parte, por la selección negativa ejercida frente a mutaciones situadas en las regiones codificantes que afectan a la pauta de lectura.<sup>4</sup>

En la mayoría de los organismos los microsatélites más abundantes están constituidos por repeticiones de dinucleótidos. Sin embargo, en los primates (incluidos los humanos), los más frecuentes son las repeticiones de mononucleótidos<sup>3</sup> (33.5% del total), seguidos por di- (26.2%), tetra- (15.0%), penta- (11.8%), tri- (7.5%) y hexanucleótidos (6.1%).

Los diferentes tipos de repeticiones tampoco se encuentran distribuidas con igual densidad a lo largo del genoma. Un ejemplo de ello es que los tri- y hexanucleótidos se encuentran con mayor frecuencia en los exones que en los intrones y regiones intergénicas del genoma humano.<sup>1</sup>

Figura I.1 Electroferograma en el que se observa el microsatélite (GAC)<sub>n</sub> situado en el exón 7 del gen E2F4.



### I.1.2- VARIABILIDAD DE LOS MICROSATÉLITES

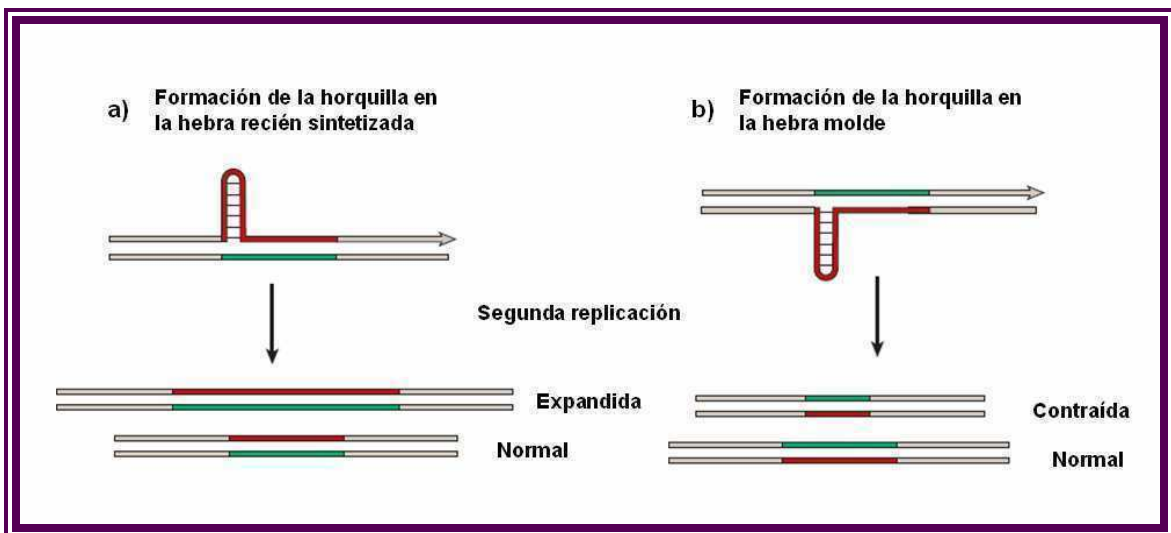
Los microsatélites son secuencias muy inestables dentro del genoma, que presentan altas tasas de mutación ( $10^{-2}$ - $10^{-6}$  eventos por locus y por generación). Estas tasas, bastante superiores a la del ADN no repetitivo ( $10^{-9}$  por locus y por generación), no son uniformes para todos ellos, y parecen incrementarse a medida que aumenta el número de repeticiones.<sup>5</sup>

Los microsatélites constituyen uno de los tipos de ADN más variables dentro del genoma. Dicha variabilidad se refleja principalmente en cambios en el número de unidades repetitivas que los componen (polimorfismos de longitud), aunque también pueden aparecer variaciones en la secuencia (polimorfismos de secuencia), o ambos tipos de manera simultánea. Otro aspecto a destacar es que mientras algunos microsatélites son altamente polimórficos y muestran una amplia variación en longitud dentro de la población, otros poseen una escasa o nula variabilidad. Su alto grado de polimorfismo, junto con su amplia distribución dentro del genoma, los hace muy útiles como marcadores para el mapeo genético, estudios de genética de poblaciones, identificación de individuos en genética forense, etc.<sup>6</sup>

### I.1.2.1- Mecanismos que explican la variación de la longitud de los microsatélites

Para explicar los cambios en la longitud de los microsatélites se han propuesto diversos mecanismos, entre los que cabe destacar el patinaje de hebras y el sobrecruzamiento desigual. El primero de los mecanismos, conocido como patinaje de las hebras durante la replicación,<sup>7</sup> postula que durante el proceso de formación de una nueva hebra de ADN, se forma una horquilla compuesta por una o varias secuencias repetitivas en la hebra molde o en la que se está sintetizando (Figura I.2). La formación de esta horquilla (estabilizada por la complementariedad de las bases) causa una alteración del número de unidades repetitivas durante la síntesis de la nueva hebra. De esta forma se obtiene una cadena más larga (con mayor número de repeticiones) si la horquilla se forma en la nueva hebra sintetizada, o más corta si la formación de la horquilla tiene lugar en la hebra molde.

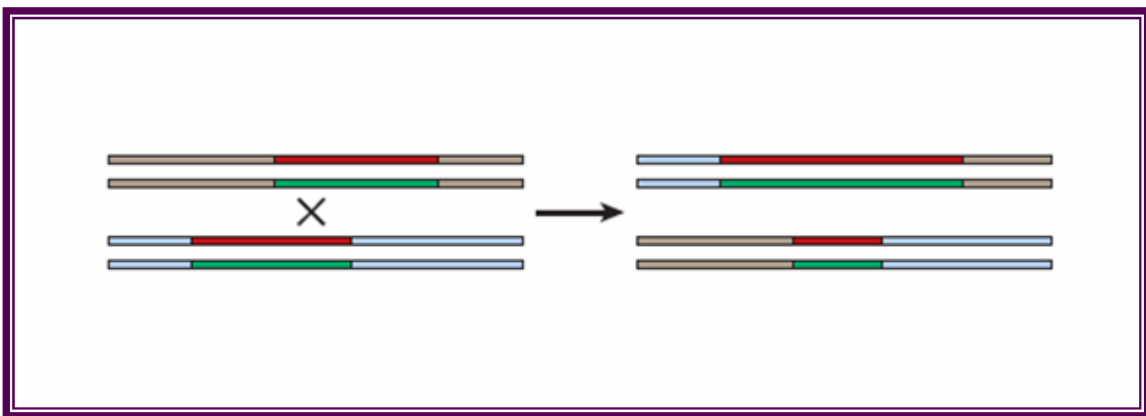
Figura I.2 Mecanismo de expansión/contracción de microsatélites mediante patinaje de hebras durante la replicación (adaptado de Mirkin SM 2007).



El segundo mecanismo estaría basado en el sobrecruzamiento desigual de los trectos repetitivos que ocurre en los cromosomas homólogos durante los procesos de recombinación meiótica, y tendría como resultado expansiones o contracciones recíprocas de los microsatélites<sup>8</sup> (figura I.3). Aunque este mecanismo parece estar

implicado en la expansión de las repeticiones  $(GCN)_n$ , ha sido desechado como mecanismo general que explique la inestabilidad de los microsatélites, ya que se ha comprobado que las variaciones en el tamaño de estas secuencias no están acompañadas por un intercambio de los marcadores flanqueantes.

Figura I.3 Mecanismo de expansión/contracción de microsatélites mediante sobrecruzamiento desigual durante la recombinación meiótica (adaptado de Mirkin SM 2007).



### I.1.3- ENFERMEDADES CAUSADAS POR LA EXPANSIÓN DE MICROSATÉLITES

Tradicionalmente se había considerado que los microsatélites eran marcadores evolutivamente neutros, que carecían de una función específica, y que formaban parte del denominado “ADN basura”.<sup>9</sup> Sin embargo, los estudios realizados en estos últimos años, han puesto en entredicho este modelo neutro de evolución, demostrándose la relevancia funcional de algunos de ellos.

El importante papel que podían desempeñar ciertos microsatélites comenzó a revelarse en 1991, cuando se descubrió que la expansión de algunas de estas secuencias era el origen de determinadas enfermedades neurológicas como el síndrome del cromosoma X frágil y la atrofia espino-bulbar-muscular.<sup>10-11</sup> Desde entonces la lista de enfermedades causadas por la expansión de este tipo de repeticiones no ha parado de crecer, y hoy se conocen cerca de treinta enfermedades



hereditarias con este origen en humanos. La mayoría de estas enfermedades están causadas por la expansión de trinucleótidos, aunque también se conocen otras en las que las repeticiones implicadas son tetranucleótidos, pentanucleótidos e incluso dodecanucleótidos. Estas repeticiones se localizan tanto en regiones codificantes, como no codificantes, lo que ha llevado a pensar que el mecanismo patogénico que yace tras estas enfermedades puede provenir no sólo de una pérdida o ganancia de función a nivel de la proteína, sino también del propio ARN.<sup>12,13</sup>

Las enfermedades causadas por la expansión de repeticiones pueden clasificarse en dos categorías: aquellas en las que la repetición se encuentra localizada en un exón, y aquellas otras en las que se localiza en regiones no codificantes.

### **I.1.3.1- Enfermedades causadas por expansiones localizadas en exones**

Dentro de este grupo se encuentran enfermedades neurodegenerativas como la atrofia espinobulbar-muscular (SBMA), la enfermedad de Huntington (HD), el síndrome de Haw River (DRPLA), y las ataxias espinocerebelares (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 y SCA17). Estas enfermedades se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva, cuya evolución depende de la edad de aparición y de la longitud de la expansión. En estos casos la unidad repetitiva expandida es el triplete CAG.CTG, que codifica para el aminoácido glutamina. Se cree que el aumento en el número de residuos del aminoácido glutamina, genera cambios conformacionales en la proteína que le proporcionan una ganancia de función y le confieren propiedades tóxicas. Al parecer las proteínas anómalas no pueden ser degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma y se acumulan en inclusiones citoplasmáticas.<sup>14,15</sup> Se cree que los cambios conformacionales de la proteína anómala le permitirían establecer nuevas interacciones con otras proteínas celulares, produciendo el secuestro de las mismas en estos agregados<sup>16</sup>.

En estas enfermedades, además del efecto tóxico por ganancia de función, se puede observar una reducción en el funcionamiento de la proteína involucrada en la enfermedad. En la SCA6, por ejemplo, se ha detectado una disminución de la funcionalidad del canal de calcio del que forma parte la proteína expandida.<sup>17</sup> En la

SBMA también se ha comprobado que el incremento en el número de glutaminas del receptor de andrógenos produce una reducción en la capacidad transactivadora del mismo.<sup>18</sup>

### **I.1.3.2- Enfermedades causadas por la expansión de repeticiones en regiones no codificantes**

En otras ocasiones, las repeticiones causantes de estas enfermedades se localizan fuera de las regiones codificantes (región promotora, 5'- UTR, 3'- UTR o intrones). Esto ocurre en la epilepsia mioclónica progresiva 1(EPM1), síndrome del cromosoma X frágil (FRAXA), síndrome X frágil con temblor/ataxia (FXTAS), ataxia de Friedreich (FRDA), distrofia miotónica tipo2 (DM2), ataxia espinocerebelar tipo 10 (SCA10), ataxia espinocerebelar tipo 8 (SCA8) y distrofia miotónica tipo 1 (DM1). En estos casos la relación entre la expansión y la patología de la enfermedad no puede atribuirse únicamente a un cambio en las propiedades de la proteína. En enfermedades como (FRAXA) y (FRDA) la expansión provoca un silenciamiento transcripcional que resulta en una pérdida de la función de la proteína.<sup>19</sup> En otras, como la DM1 y DM2, existen evidencias de que el mecanismo patogénico está mediado por la alteración en la función del ARN. Se cree que el ARN expandido es capaz de establecer uniones aberrantes con proteínas de unión al ARN, produciendo la desregulación de su función. Se ha comprobado que muchas de las proteínas que interactúan con el ARN expandido están implicadas en la regulación de los procesos de splicing.<sup>20</sup>

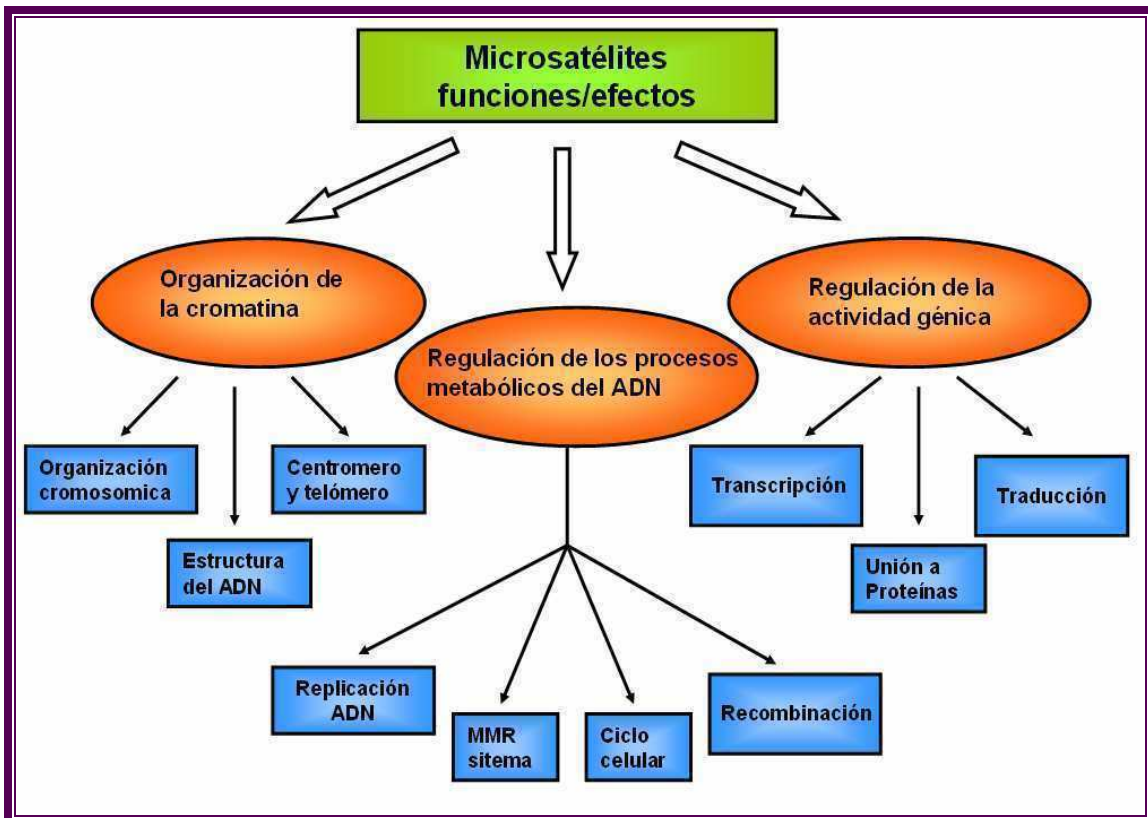
### **I.1.4- FUNCIONES Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS MICROSATÉLITES**

A raíz de la implicación de los microsatélites en estas enfermedades, se han empezado a conocer los efectos biológicos producidos por la alteración del número de repeticiones y las posibles funciones de los mismos. Como hemos visto con anterioridad, la expansión de microsatélites puede generar proteínas tóxicas o malfuncionantes, desencadenar el secuestro de proteínas implicadas en procesos de splicing, causar el silenciamiento de los genes en los que se localizan, o afectar a los procesos de traducción y transcripción.<sup>21</sup> Li y cols.<sup>22</sup>, en una revisión sobre el tema agruparon las funciones o efectos de los microsatélites en tres grandes bloques:

---

organización de la cromatina, regulación de los procesos metabólicos del ADN, y regulación de la actividad génica (Figura I.4).

Figura I.4 Posibles funciones y efectos de los microsatélites (adaptado de Li YC y cols. 2002).



### I. 1.4.1- Implicación de los microsatélites en la organización de la cromatina

#### a) Estructura del ADN

Muchas repeticiones en tándem son capaces de formar una amplia variedad de estructuras inusuales en el ADN, como la formación de plegamientos en forma de bucles con distinto grado de complejidad. Se piensa que la formación de estas estructuras podría tener importantes efectos reguladores sobre la expresión génica.<sup>23</sup>

## b) Centrómeros y telómeros

En muchas especies, la región centromérica de los cromosomas contiene numerosas repeticiones en tándem. Estas repeticiones podrían contribuir a la cohesión de cromátidas hermanas o jugar un papel en la formación o función del cinetocoro.<sup>24</sup>

### I.1.4.2- Regulación de los procesos metabólicos del ADN: efectos sobre la recombinación

Son numerosos los microsatélites que han sido propuestos como puntos calientes para la recombinación.<sup>25,26</sup> Las repeticiones de dinucleótidos parecen ser sitios preferentes para estos procesos, debido a su alta afinidad por enzimas implicadas en la recombinación y a las estructuras que forman este tipo de microsatélites.<sup>27</sup>

### I.1.4.3 Efectos de los microsatélites sobre la actividad génica

#### a) Efectos sobre la transcripción

Existen numerosas evidencias de que algunos microsatélites localizados en las regiones promotoras de determinados genes pueden actuar como elementos cis-reguladores, afectando a la actividad transcripcional de los mismos.<sup>28</sup> Los microsatélites pueden ser propiamente lugares de unión para proteínas reguladoras de la transcripción o encontrarse próximos a ellos, de manera que puedan interferir en dicha unión. Algunos estudios señalan que las variaciones en el número de repeticiones de los mismos pueden modificar la afinidad de las proteínas reguladoras por estos sitios de unión, y afectar la actividad transcripcional del gen.<sup>29-31</sup> Un ejemplo de ello es el microsatélite polimórfico (TGYCC)<sub>n</sub>, que se encuentra situado en el promotor del gen 3 inducido por p53 (PIG3). La proteína p53 se une específicamente a este microsatélite *in vitro* e *in vivo*, y se ha observado que un alto número de repeticiones se correlaciona con una alta activación transcripcional de p53.<sup>32</sup>

Los microsatélites situados en regiones intrónicas también pueden tener influencia sobre la transcripción génica. Un ejemplo de ello es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuya actividad transcripcional parece disminuir al

aumentar en número de repeticiones del microsatélite polimórfico (CA)<sub>n</sub> situado en el intrón 1 del gen.<sup>33</sup> También el microsatélite polimórfico (TCAT)<sub>n</sub>, situado en el primer intrón del gen de la tirosina hidroxilasa (TH), parece ser capaz de actuar como un elemento regulador de la transcripción *in Vitro*.<sup>34</sup> Cabe destacar que las repeticiones de trinucleótidos son especialmente abundantes en genes reguladores relacionados con la transcripción y transducción de señales, mientras que son infrecuentes en genes que codifican proteínas estructurales. Estas observaciones apoyan el posible papel de este tipo de microsatélites en la regulación de la transcripción génica.<sup>35</sup>

#### b) Efectos sobre la traducción

Diversos estudios han mostrado la capacidad de los microsatélites para influir en los procesos de traducción. Se ha podido observar que variaciones en el número de repeticiones de microsatélites situados en las regiones 3'-UTR de ciertos genes, son capaces de generar estructuras que podrían afectar a la estabilidad de los productos transcritos, y por tanto a la expresión génica. Este es el caso del segmento rico en repeticiones (GA)<sub>n</sub> en el extremo 3'-UTR del gen del receptor polimérico de inmunoglobina<sup>23</sup> y el gen de la elastina de pollo.<sup>36</sup> También se ha podido comprobar que el aumento del número de repeticiones del dinucleótido (CA)<sub>n</sub> en las moléculas de ARNm de los genes de *Escherichia coli* lacZ, gusA y neo incrementan la unión de los ribosomas *in vitro*, dando lugar a un aumento de su expresión.<sup>37</sup>

### I.1.5- RELACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS CON OTRAS ENFERMEDADES

En la aparición y desarrollo de algunas enfermedades multifactoriales complejas como el cáncer de mama o la diabetes tipo II, están implicados distintos factores genéticos y ambientales, en su mayoría desconocidos. La identificación de variantes génicas que puedan conferir susceptibilidad a las mismas es uno de los grandes retos de la genética actual. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) y los microsatélites polimórficos, debido a su alta mutabilidad, son componentes importantes de la variabilidad genética humana.

Aunque la variación funcional puede residir en cualquier tipo de polimorfismo genético, en la actualidad el interés en este campo está centrado en los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), en buena parte debido al desarrollo de técnicas para su genotipado masivo. El genotipado de los microsatélites, en cambio, no se encuentra tan automatizado, lo que sin duda ha repercutido en el número de estudios que han centrado su interés en los mismos.

Análisis bioinformáticos realizados sobre bases de datos de secuencias de proteínas humanas, han revelado que aproximadamente el 20% de ellas contienen, al menos, un tracto compuesto por cuatro o más residuos de un mismo aminoácido. Muchos de estos trectos repetitivos de aminoácidos están codificados por microsatélites, y las proteínas humanas que los presentan están frecuentemente implicadas en la regulación transcripcional, la señalización celular, el desarrollo, y la actividad del sistema nervioso. También se ha comprobado que un gran número de estas proteínas están relacionadas con enfermedades neurológicas, leucemias y varios tipos de cánceres.<sup>38</sup>

Hoy en día se cree que la habilidad de los microsatélites para expandirse o contraerse en cortos periodos de tiempo, podría ser enormemente beneficiosa para los organismos desde el punto de vista adaptativo. Estas secuencias confieren hipervariabilidad a los genes que los contienen, permitiéndoles una rápida evolución. Sin embargo, no hay que olvidar que algunas de estas secuencias tienen la capacidad de modular la expresión génica y la función proteica, de modo que variaciones en las mismas podrían constituir factores de riesgo, aún sin explorar, para la susceptibilidad a ciertas enfermedades.<sup>39,40</sup>





## I.2- BIBLIOGRAFÍA

1. Subramanian S, Mishra RK, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol* 2003;4(2): R13.
2. Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 2000; 10(7): 967-81.
3. Jurka J, Pethiyagoda C. Simple Repetitive DNA Sequences from Primates: Compilation and Analysis. *J Mol Evol* 1995; 40(2): 120-6.
4. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 2004; 21(6): 991-1007.
5. Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *H Trends Genet* 2000; 16 (12):551-8.
6. Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 2006; 255(1-4):1-2.
7. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair *Nature* 1993; 365(6443): 274-6.
8. Warren ST. Poyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science* 1997; 275(5298): 408-9.
9. Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 1980; 284(5757): 604-7.
10. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65(5): 905–14.

11. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; 352(6330):77–9.
12. Mirkin SM. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 2007; 447(7147): 932-40.
13. Gatchel JR, Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet* 2005; 6(10):743-55.
14. Ross CA, Margolis RL, Becher MW, Wood JD, Engelender S, Sharp AH.(1998) Pathogenesis of polyglutamine neurodegenerative diseases: towards a mechanism. En *genetic Instabilities and Hereditary Neurological Diseases* (761-776), San Diego: Academic Press Inc.
15. Ross CA. When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron* 1995; 15(3): 493-96.
16. McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet* 2000; 9(14): 2197-202.
17. Kordasiewicz HB, Gomez CM. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 6. *Neurotherapeutics* 2007; 4(2): 285-94.
18. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(15): 3181-6.
19. Lagerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* 2001; 10(4): 329-38.
20. Ranum LP, Day JW. Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends Genet* 2004; 20(10): 506-12.
21. Usdin K. The biological effects of simple tandem repeats: lessons from the repeat expansion diseases. *Genome Res* 2008;18(7):1011-9.

22. Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 2002; 11(12): 2453-65.
23. Fabregat I, Koch KS, Aoki T, Atkinson AE, Dang H, Amosova O, Fresco JR, Schildkraut CL, Leffert HL. Functional pleiotropy of an intramolecular triplex-forming fragment from the 3'-UTR of the rat *Pigr* gene. *Physiol Genomics* 2001; 5(2): 53-65.
24. Murphy TD, Karpen GH. Localization of centromere function in a *Drosophila* minichromosome. *Cell* 1995; 82(4): 599-609.
25. Brandström M, Bagshaw AT, Gemmell NJ, Ellegren H. The relationship between microsatellite polymorphism and recombination hot spots in the human genome. *Mol Biol Evol* 2008; 25(12): 2579-87.
26. Bagshaw AT, Pitt JP, Gemmell NJ. High frequency of microsatellites in *S. cerevisiae* meiotic recombination hotspots. *BMC Genomics* 2008; 9:49.
27. Biet E, Sun J, Dutreix M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(2): 596-600.
28. Iglesias AR, Kindlund E, Tammi M, Wadelius C. Some microsatellites may act as novel polymorphic cis-regulatory elements through transcription factor binding. *Gene* 2004; 341: 149-65.
29. Hoffman EK, Trusko SP, Murphy M, George DL. An S1nuclease-sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the c-Ki-ras promoter interacts with a nuclear factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(7): 2705-9.
30. Lafyatis R, Denhez F, Williams T, Sporn M, Roberts. Sequence specific protein binding to and activation of the TGF-beta 3 promoter through a repeated TCCC motif. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(23): 6419-25.
31. Lanz RB, Wieland S, Hug M, Rusconi Tae HJ, Luo X, Kim KH. Roles of CCAAT/enhancer-binding protein and its binding site on repression and derepression of acetyl-CoA carboxylase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 10475-84.

32. Contente A, Dittmer A, Koch MC, Roth J, Dobbelstein M. A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nat Genet* 2002; 30(3): 315-20.
33. Gebhardt F, Zänker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999; 274(19): 13176-80.
34. Albanèse V, Ravassard P, Treilhou F, Mallet J A. Tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element *in Vitro*. Meloni R. *Hum Mol Genet* 1998; 7(3): 423-8.
35. Young ET, Sloan JS, Van Riper K. Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2000; 154(3): 1053-68.
36. Hew Y, Lau C, Grzelczak Z, Keeley FW. Identification of a GA-rich sequence as a protein-binding site in the 3'-untranslated region of chicken elastin mRNA with a potential role in the developmental regulation of elastin mRNA stability. *J Biol Chem* 2000; 275(32): 24857-64.
37. Martin-Farmer J, Janssen GR. A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999; 31(4): 1025-38.
38. Karlin S, Brocchieri L, Bergman A, Mrazek J, Gentles A. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *J. Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(1): 333-8.
39. Bacolla A, Larson JE, Collins JR, Li J, Milosavljevic A, Stenson PD, Cooper DN, Wells RD. Abundance and length of simple repeats in vertebrate genomes are determined by their structural properties. *Genome Res* 2008; 18(10): 1545-53.
40. Legendre M, Pochet N, Pak T, Verstrepen KJ. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome Res* 2007; 17(12): 1787-96.



**CAPÍTULO II**  
**MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS**  
**Y LA ENZIMA AROMATASA: SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA**



## II.1 - INTRODUCCIÓN

### II.1.1- HORMONAS SEXUALES ESTEROIDEAS EN LA MUJER

La producción de hormonas sexuales esteroideas a lo largo de la vida de una mujer es amplia y variada, con importantes cambios en las diferentes etapas de la misma. Los ovarios femeninos fabrican tres clases principales de hormonas sexuales: los estrógenos, los progestágenos y los andrógenos<sup>1,2</sup>. La producción de hormonas esteroideas por el ovario está sujeta a un complejo mecanismo de regulación, en el que las hormonas hipofisarias foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) juegan un papel determinante.

Los estrógenos, de gran importancia en la mujer, dirigen el desarrollo de sus órganos genitales y promueven la aparición de los caracteres sexuales femeninos. Estas hormonas son capaces de inducir fenómenos de proliferación celular sobre órganos como el endometrio, la mama y el propio ovario. Su producción cíclica es la responsable del ciclo menstrual.

La progesterona es el principal progestágeno natural producido por el ovario. Es capaz de estimular el desarrollo del endometrio, preparando al útero para la recepción del blastocisto y su posterior desarrollo durante el embarazo. La progesterona también favorece el desarrollo de los acinos glandulares de la mama disponiéndola para la lactancia.

Los andrógenos son los esteroides sexuales más abundantes en el torrente circulatorio. Son precursores necesarios para la síntesis de estrógenos en el ovario, y se encuentran asociados a la masculinidad y a sus caracteres sexuales.



### **II.1.1.1- Producción de estrógenos en la mujer**

En las mujeres premenopáusicas la mayor parte de los estrógenos circulantes son producidos por los ovarios (folículos y cuerpo lúteo), por la placenta (durante el embarazo) y en menores cantidades por las glándulas adrenales. De los más de veinte tipos de estrógenos identificados, los que parecen tener una mayor importancia clínica son el 17 $\beta$ -estradiol y dos de sus metabolitos; la estrona y el estriol.<sup>3</sup>

El 17 $\beta$ -estradiol es el estrógeno más potente secretado por el ovario, que sintetiza más del 95% del mismo. La estrona y el estriol también se producen en el hígado o en tejidos extragonadales a partir de precursores androgénicos. En las mujeres la producción ovárica de estrógenos se ve notablemente mermada tras la menopausia y los niveles de estradiol disminuyen notablemente. En este periodo la mayor parte de los estrógenos se sintetizan extragonadalmente en el hígado y otros tejidos periféricos, a partir de precursores androgénicos producidos por las glándulas suprarrenales y en menor proporción por el ovario. (Figura II.1).

### **II.1.1.2- Producción de andrógenos en la mujer**

Aunque los estrógenos son las hormonas sexuales femeninas por excelencia, las mujeres secretan cuantitativamente mayor cantidad de andrógenos que de estrógenos. Los andrógenos tienen importantes efectos fisiológicos en la mujer, no sólo porque actúan como precursores hormonales para la síntesis de estrógenos en los ovarios y tejidos extragonadales, sino porque mediante su unión con los receptores de andrógenos, son capaces de ejercer efectos directos sobre sus células diana.

Las principales hormonas esteroideas circulantes clasificadas como andrógenos son la dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstendiona, testosterona y dihidrotestosterona (en orden decreciente según su concentración sérica).<sup>4</sup>

La testosterona es el andrógeno natural más potente. El 50% de esta hormona deriva de los ovarios y las glándulas adrenales a partes iguales, mientras que el 50% restante, procede de la conversión periférica de la androstendiona. Esta última

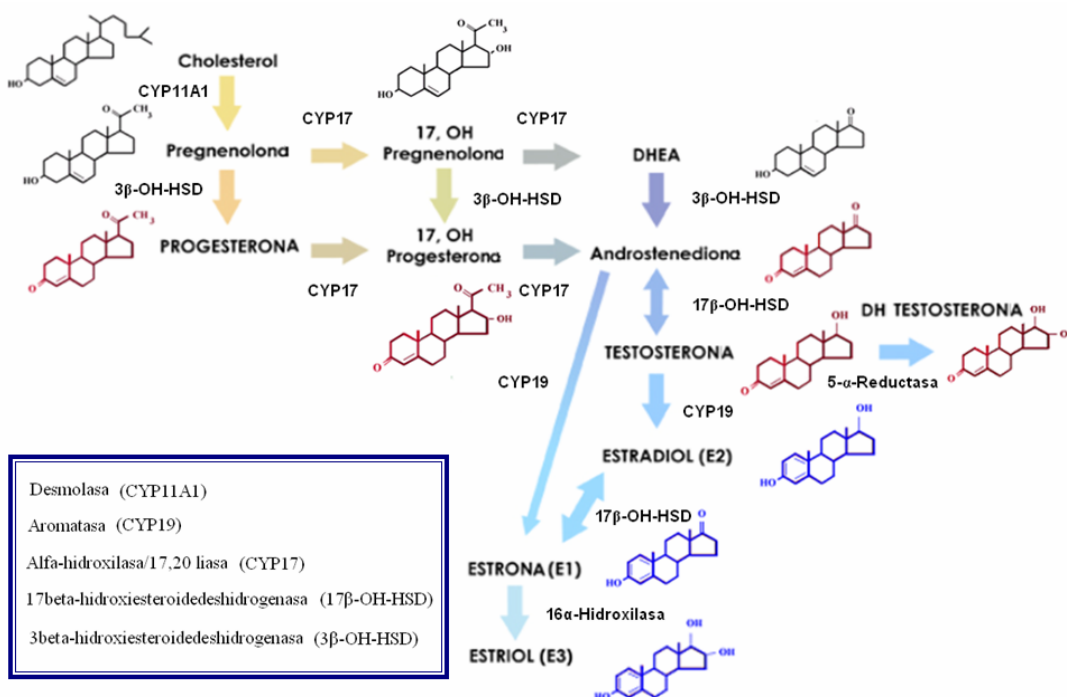
también es producida por las glándulas adrenales y los ovarios en una proporción similar.

La DHEA actúa como un precursor para la síntesis periférica de otros andrógenos más potentes. Es producida por las glándulas adrenales (50%) y los ovarios (20%), aunque puede ser sintetizada a partir de la DHEAS circulante (20%), gracias a la acción de sulfatasas esteroideas.

La dihidrotestosterona es un producto de la conversión periférica de la testosterona y circula a baja concentración en el suero. Sólo la testosterona y la dihidrotestosterona son capaces de unirse al receptor de andrógenos. Las otras tres hormonas son consideradas pro-andrógenos.

Los andrógenos producidos por las células tecales ováricas sirven como sustrato para la síntesis de estrógenos. La enzima aromatasa, muy importante en el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas, es la principal responsable de la transformación de los andrógenos en estrógenos. (Figura II.1).

Figura II.1 Rutas de síntesis de hormonas sexuales esteroideas.



## II.1.2- ANDRÓGENOS, ESTRÓGENOS Y CÁNCER DE MAMA

La producción de hormonas esteroideas en el ovario sufre diversos cambios a lo largo de la vida de la mujer. Uno de los principales cambios está asociado con el final del periodo menstrual, una fase de la vida en la que muchas mujeres son diagnosticadas de cáncer de mama.<sup>5</sup>

Existen claras evidencias de que las hormonas sexuales esteroideas están implicadas en el desarrollo de esta enfermedad. Numerosos estudios han demostrado que los estrógenos actúan como estimulantes de la proliferación epitelial y el crecimiento de la glándula mamaria.<sup>6,7</sup> Actualmente no hay ninguna duda sobre el papel promotor de estas hormonas en el cáncer de mama; de hecho, la privación de estrógenos ha resultado ser una terapia muy efectiva contra esta enfermedad.

Por el contrario el papel de los andrógenos en el cáncer de mama es confuso, y no está del todo claro si éstos actúan como estimulantes o represores del crecimiento y la proliferación celular. Aunque la mayoría de los estudios respaldan la hipótesis de que los andrógenos podrían actuar contrarrestando el efecto mitogénico y promotor de los estrógenos sobre el tejido mamario, los resultados de los diferentes estudios (epidemiológicos y experimentales) son en muchos casos contradictorios.

Los experimentos realizados en diversas líneas celulares de cáncer de mama, muestran mayoritariamente un papel antiproliferativo y apoptótico de los andrógenos.<sup>8-10</sup> Sin embargo, los resultados de algunos estudios señalan que en determinadas circunstancias los andrógenos también pueden ejercer efectos proliferativos sobre las células cancerosas.<sup>11,12</sup> Esta divergencia de resultados parece obedecer a diferencias en las líneas celulares empleadas en los experimentos, al tipo de andrógeno suministrado, a la dosis y al estado estrogénico.<sup>10</sup>

Los estudios *in vivo* realizados en ratas, también muestran un efecto inhibitorio de los andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona y DHEAS) sobre los efectos proliferativos de los estrógenos.<sup>13-17</sup> A los resultados de estos trabajos se suman diversas evidencias clínicas y experimentales, como el hecho de que distintos tipos de andrógenos (propionato, fluixymesterona, calusterona, metiltestosterona, etc.) hayan

sido utilizados como adyuvantes en la terapia frente al cáncer de mama (especialmente en el cáncer metastático), con resultados de efectividad comparables a los de otros tratamientos.<sup>18,19</sup>

Paradójicamente, tanto las mujeres que presentan elevadas concentraciones en sangre de estrógenos (estradiol y estrona) como de andrógenos (testosterona, DHEA, DHEAS, androstendiona, y dihidrotestosterona), parecen tener un mayor riesgo de padecer cáncer de mama.

En mujeres premenopáusicas, Secreto y cols.<sup>20</sup> observaron un incremento del riesgo de padecer cáncer de mama a mayores concentraciones de andrógenos (testosterona, dihidrotestosterona, androstendiona, y DHEAS) y progesterona. También Kass y cols.<sup>21</sup> hallaron mayores concentraciones de andrógenos (testosterona, androstenediona y dehidroepiandrosterona sulfato) en mujeres con cáncer de mama. Mientras, Yu y cols.<sup>22</sup> observaron un mayor riesgo de esta enfermedad a mayores niveles de estrona y testosterona en sangre, pero no hallaron variaciones en función de los niveles de DHEAS, estradiol, ni de estrona sulfato.

En mujeres postmenopáusicas, Kass y cols.<sup>23</sup> observaron un incremento del riesgo de cáncer de mama a mayores niveles de estrógenos (estrona y estradiol) y andrógenos (DHEAS, androstendiona y testosterona). Sus resultados coinciden con los obtenidos por Baglietto y cols.<sup>24</sup> que también hallaron un mayor riesgo entre aquellas mujeres con altas concentraciones de estradiol, estrona sulfato, testosterona y DHEAS.

### **II.1.3- EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS**

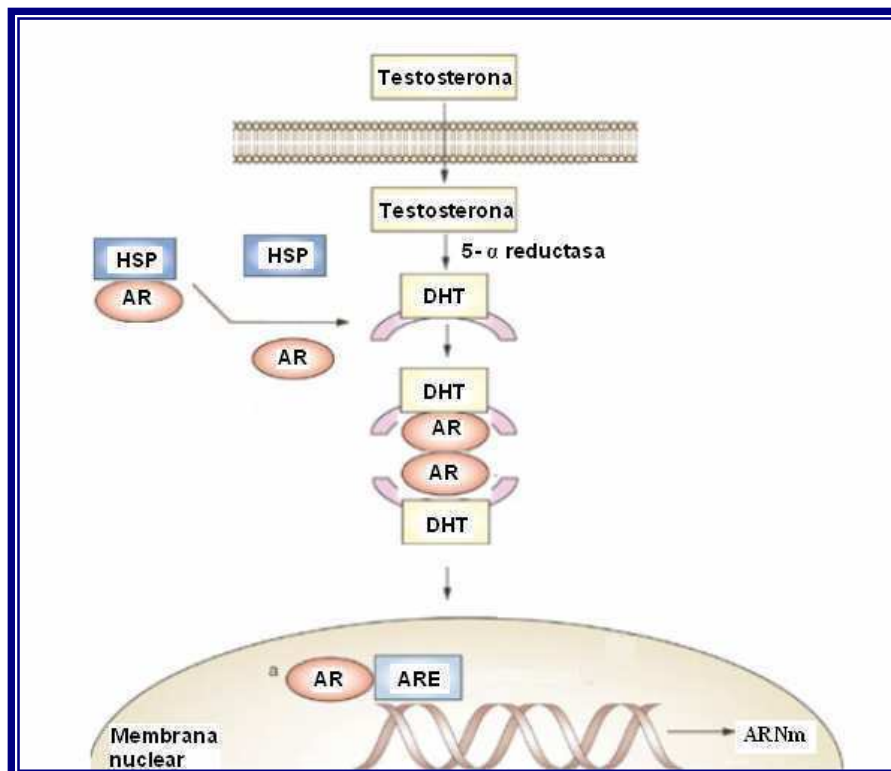
Las hormonas sexuales esteroideas juegan un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de las funciones normales de la glándula mamaria. La acción de estas hormonas está mediada, en buena parte, por su unión a receptores nucleares (receptores de andrógenos, estrógenos, y progesterona).

El receptor de andrógenos (AR) pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas esteroideas. Funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando que regula la transcripción de genes implicados en diversos

procesos fisiológicos entre los que se encuentran la proliferación y la diferenciación celular en tejidos diana.<sup>25</sup>

Generalmente el AR se encuentra de forma inactiva en el citoplasma celular formando un complejo con varias proteínas heat shock, entre las que se encuentran Hsp90, Hsp70 y Hsp56. La unión de la hormona (testosterona o dihidrotestosterona) al dominio de unión al ligando produce un cambio conformacional de la molécula que promueve la liberación de las proteínas heat shock, y permite su translocación al núcleo. Una vez allí, el AR dimeriza formando homodímeros que se unen a los elementos de respuesta a andrógenos (AREs), localizados en las regiones reguladoras de genes diana regulados por andrógenos. Esta unión desencadena el reclutamiento de otras proteínas esenciales para la expresión de estos genes, como cofactores o elementos pertenecientes a la propia maquinaria de transcripción<sup>26</sup> (Figura II.2).

Figura II.2 El receptor de andrógenos y su mecanismo de acción.

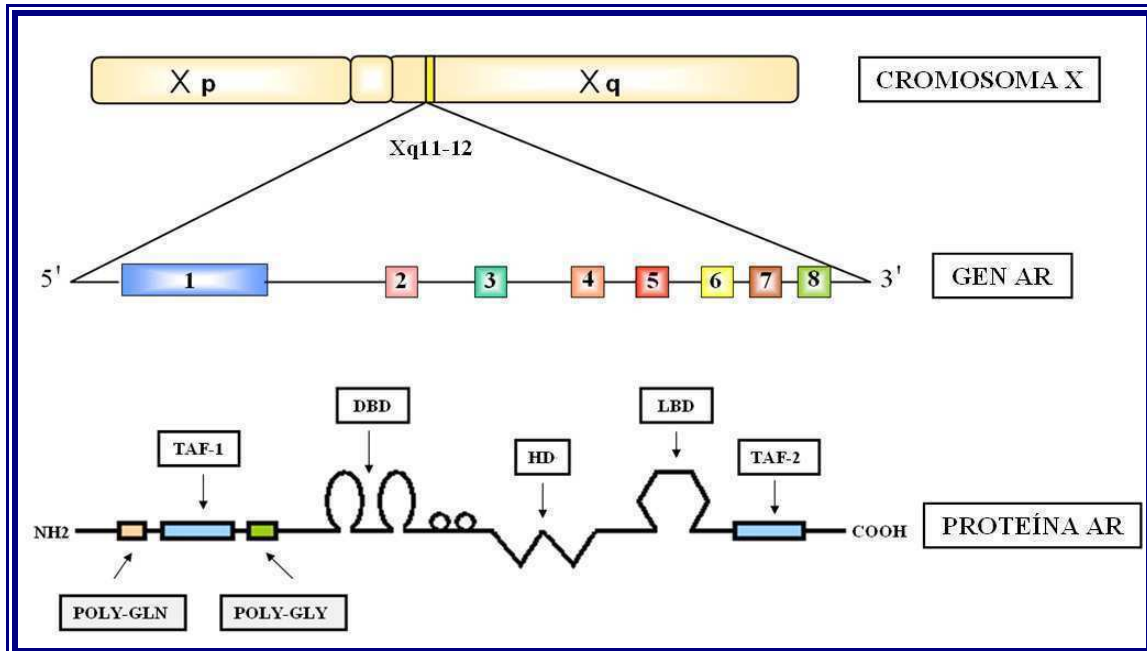


Los receptores de andrógenos están presentes tanto en el tejido mamario normal, como en líneas celulares de cáncer de mama. Su expresión es abundante en las células epiteliales, donde parece estar asociada a la del receptor de estrógenos (RE) y progesterona (PR).<sup>27</sup> Se han encontrado altos niveles de expresión del AR en el 49% de los tumores de mama negativos para ER y en el 89% de los positivos.<sup>28</sup> Estudios realizados en pacientes de cáncer de mama bajo seguimiento médico indican que la expresión del AR se asocia con buen pronóstico en tumores ER/PR negativos.<sup>29</sup> Por el contrario, la pérdida del AR se ha asociado a un pobre pronóstico en tumores ER/PR/Her2 negativos.<sup>30</sup>

El gen que codifica para el AR humano está localizado en el brazo largo del cromosoma X (Xq11.2-12), tiene un tamaño de 90 kilobases, y contiene ocho exones. La proteína AR consta de aproximadamente 917 aminoácidos y posee varios dominios con diferentes funciones.<sup>31</sup>

El dominio regulador N-terminal, codificado principalmente por el exón 1, media la actividad transcripcional. Este dominio contiene la región de activación de la transcripción independiente de ligando (TAF-1), siendo el lugar de interacción con ciertos correguladores. El dominio de unión al ADN (DBD), codificado por los exones 2 y 3, contiene dos dedos de zinc capaces de interactuar específicamente con pequeñas secuencias denominadas elementos de respuesta a andrógenos (AREs). La región bisagra (HD), codificada por el exón 5, es muy importante para el movimiento del receptor. El dominio de localización nuclear (NLD), codificado por el exón 4, ayuda a la localización del AR en el núcleo celular. Finalmente el dominio de unión al ligando (LBD), codificado por los exones 6, 7 y 8, es el lugar de unión de los andrógenos al receptor y contiene la región de activación de la transcripción dependiente de ligando (TAF-2) (Figura II. 2).

Figura II.3 Estructura del gen y la proteína AR.



#### II.1.4- MICROSATÉLITES DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (CAG)<sub>n</sub> Y (GGC)<sub>n</sub>

El primer exón del gen *AR* contiene dos trectos repetitivos de aminoácidos que flanquean la región de activación de la transcripción TAF-1 (Figura II. 2). El primero de ellos, constituido por un número variable de residuos de glutamina, está codificado por la secuencia (CAG)<sub>n</sub>CAA. El microsatélite (CAG)<sub>n</sub> es altamente polimórfico en longitud, y su tamaño oscila generalmente entre 6 y 39 repeticiones, aunque se han observado diferencias en su longitud entre distintas poblaciones. Las poblaciones africanas presentan las repeticiones más cortas, caucásicos e indios americanos muestran tamaños intermedios, y los asiáticos parecen tener las repeticiones más largas.<sup>32,33</sup>

El segundo tracto repetitivo, formado por un número variable de residuos de glicina, está situado 1kb aguas abajo del microsatélite (CAG)<sub>n</sub>. Se encuentra codificado por la secuencia (GGT)<sub>3</sub>GGG(GGT)<sub>2</sub>(GGC)<sub>n</sub>, generalmente referida en la literatura como (GGN)<sub>n</sub>. Los primeros seis residuos de glicina están codificados por la

secuencia constante (GGT)<sub>3</sub>GGG(GGT)<sub>2</sub>, mientras que el resto del tracto de glicinas (un número variable) está codificado por el microsatélite (GGC)<sub>n</sub>. Este microsatélite es polimórfico en longitud y su tamaño suele oscilar entre las 8 y las 21 repeticiones.

#### **II.1.4.1- El microsatélite (CAG)<sub>n</sub> y su relación con la concentración y actividad del receptor**

Los primeros indicios de que la longitud del tracto repetitivo de glutaminas era crítico para la función del AR, surgieron cuando se descubrió que la expansión del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> por encima de las 40 repeticiones era la causa de la enfermedad neurodegenerativa ligada al cromosoma X conocida como atrofia espinobulbar muscular (SBMA) o enfermedad de Kennedy. La expansión de este microsatélite provoca en los sujetos un cuadro clínico caracterizado por debilidad y atrofia muscular, disminución o pérdida de los reflejos, hipotonía, etc. Estos enfermos también presentan síntomas de insensibilidad a los andrógenos como ginecomastia, atrofia testicular, oligospermia, azoospermia y elevadas concentraciones de gonadotropinas.<sup>34,35</sup>

Tras este descubrimiento, diversos estudios han señalado que variaciones en el número de unidades repetitivas (CAG)<sub>n</sub> dentro del rango habitual (por debajo de las 40 repeticiones) tienen influencia sobre la actividad transactivadora del AR, de manera que ésta disminuye al aumentar el número de repeticiones.

Chamberlain y cols.<sup>36</sup> en un ensayo *in vitro* realizado en células de riñón de mono, observaron que la progresiva expansión de este microsatélite causaba un descenso lineal en la función de transactivación. Además, la eliminación del tracto repetitivo resultaba en una elevada actividad transcripcional del AR, lo que sugería que tenía un efecto inhibitorio sobre la misma. Un estudio posterior realizado por Kazemi-Esfarjani y cols.<sup>37</sup> reveló resultados similares.

Ding y cols.<sup>38</sup> también corroboraron el efecto negativo de la longitud de este microsatélite sobre la actividad del AR. Ellos observaron que en células epiteliales de cáncer de próstata el alelo (CAG)<sub>17</sub> mostraba un 40% más de actividad transactivadora por unidad de AR que el alelo (CAG)<sub>21</sub>. Estos autores detectaron, además, diferencias



en el nivel de proteína AR según la longitud del alelo (mayor cantidad de proteína para el alelo más corto). En cambio, Beilin y cols.<sup>39</sup> no encontraron variaciones en la expresión de la proteína AR en función de la longitud del microsatélite, aunque si comprobaron nuevamente una relación inversa entre la longitud de este tracto repetitivo y la actividad transactivadora *in vitro* del AR.

#### **II.1.4.2- Relación entre las concentraciones de hormonas esteroideas y la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub>**

Además de los efectos que la longitud de este microsatélite parece tener sobre la actividad transactivadora del AR, algunos trabajos como los de Westberg y cols.<sup>40</sup> y Brum y cols.<sup>41</sup> describen una relación inversa entre el número de repeticiones del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> y la concentración de andrógenos en suero, tanto en mujeres premenopáusicas como postmenopáusicas. En otros estudios, sin embargo, no se ha observado dicha relación.<sup>42,43</sup>

#### **II.1.4.3- El microsatélite (GGC)<sub>n</sub> y su relación con la concentración y funcionalidad del receptor**

A diferencia de lo que ocurre con el microsatélite (CAG)<sub>n</sub>, no se conoce por el momento ninguna enfermedad causada por variaciones en el número de repeticiones del microsatélite (GGC)<sub>n</sub>, aunque la longitud del tracto (GGN)<sub>n</sub> ha sido asociada con el riesgo de desarrollar criptorquidismo<sup>44</sup> (condición relacionada con baja androgenicidad).

Algunos estudios apuntan a que las variaciones en el número de repeticiones de este microsatélite podrían tener efectos sobre la función y/o concentración del AR. En los experimentos *in vitro* llevados a cabo por Gao y cols.<sup>45</sup> se observó que la delección del tracto (GGN)<sub>n</sub> reducía en un 30% la actividad transactivadora del AR. Posteriormente Lundin y cols.<sup>46</sup> hallaron variaciones no lineales en la función transactivadora del receptor dependiendo de la longitud de las repeticiones. También Ding y cols.<sup>47</sup> observaron una correlación inversa entre el número de repeticiones (GGN)<sub>n</sub> y las concentraciones de proteína AR, si bien no pudieron constatar ningún efecto de la longitud de este microsatélite sobre la actividad transactivadora del AR.

Según estos autores el incremento en la longitud de este microsatélite podría favorecer la formación de estructuras en asa en el ARN<sub>m</sub> que afectarían a su estabilidad y traducción.

#### **II.1.4.4- Relación de los polimorfismos (CAG)<sub>n</sub> y (GGC)<sub>n</sub> con el cáncer de mama**

La longitud de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (GGC)<sub>n</sub> del gen *AR* ha sido asociada con diversos tipos de cáncer como el de próstata, endometrio, ovario, colon, esófago y mama.<sup>48-54</sup>

En lo que al cáncer de próstata se refiere, los resultados de diferentes estudios publicados indican que la presencia de repeticiones cortas de estos microsatélites en los varones podría incrementar el riesgo de padecer esta enfermedad.<sup>47,48,55-59</sup>

La situación para el cáncer de mama podría ser justamente la contraria que la descrita para el cáncer de próstata, ya que son varios los trabajos que indican que las mujeres con largas repeticiones (CAG)<sub>n</sub> podrían tener un mayor riesgo padecer la enfermedad.<sup>60-64</sup> Sin embargo no todos los estudios obsevan dicha relación,<sup>65-70</sup> por lo que no está claro si la longitud de este microsatélites tiene influencia en el riesgo de padecer la enfermedad. (Tabla II.1)

En cuanto al microsatélite (GGC)<sub>n</sub>, muy pocos estudios han explorado la relación del mismo con el cáncer de mama,<sup>67,66</sup> y sólo uno de ellos ha encontrado un mayor riesgo en mujeres jóvenes portadoras de alelos cortos.<sup>69</sup>

**Tabla II.1 Estudios de asociación caso-control entre la longitud de los microsatélites CAG y GGC y el cáncer de mama**

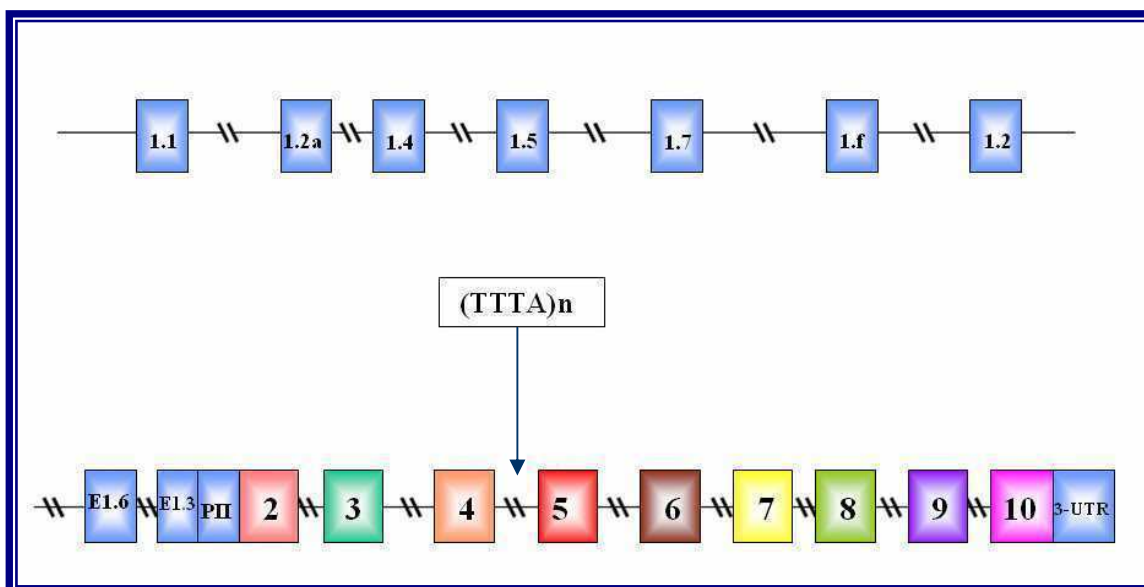
Microsatélite	Referencia	Punto de corte repeticiones	Población estudiada	Características	Casos	Controles	OR (95% CI)	p
(CAG) <sub>n</sub> AR	Spurdle y cols. [65]	<22 CAG	Pincipalmente Caucásica	Mujeres < 40	368	264	1.40 (0.94–2.09)	N.S.
	Rebbeck y cols. [62]	>26 CAG	Pincipalmente Caucásica	BRCA1/2 mutación	165	304	1.81 (1.06–3.08)	N.D.
	Dunning y cols. [66]	<22 CAG	Caucasica (inglesa)	Indistintas	508	426	1.31 (0.87–1.97)	N.S.
	Giguere y cols. [63]	<20 CAG	Pincipalmente Caucásica	Mujeres postmenopaúsicas	255	461	0.5 (0.30–0.83)	0.007
	Kadouri y cols. [67]	>28 CAG	Caucasicos /Askhenazi	BRCA 1/2	188	222	0.80 (0.44–1.46)	N.S.
	Menin y cols. [68]	>23 CAG	Pincipalmente Caucásica	Indistintas	47	101	1.70 (0.90–3.50)	N.S.
	Haiman y cols. [65]	>22 CAG	Pincipalmente Caucásica	Familiares primer grado afectados	729	969	1.70 (1.20–2.40)	0.04
	Liede y cols. [62]	<25 CAG	Filipina	Mujeres postmenopaúsicas	299	229	0.47 (0.28–0.80)	0.015
	Suter y cols. [69]	<22 CAG	Pincipalmente Caucásica	Mujeres < 45 años	524	461	1.30 (1.00–1.70)	N.S.
	EMBRACE Study Collaborators [70]	>28 CAG	Pincipalmente Caucásica	BRCA1/2	322	595	1.04 (0.87–2.42)	N.S.
	Wang y cols. [99]	>22 CAG	Afro- Americana	Familiares primer grado afectados	239	249	3.18 (1.08–9.36)	0.02
Iobagiu y cols. [64]	<15 CAG	Pincipalmente Caucásica	Indistintas	139	145	1.93 (1.05–3.55)	0.03	
(GGC) <sub>n</sub> AR	Dunning y cols. [66]	>14 GGC	Pincipalmente Caucásica	Indistintas	508	426	1.07 (0.89–1.48)	N.S.
	Kadouri y cols. [67]	>17 GGC	Caucasicos /Askhenazi	BRCA 1/2	188	222	0.96 (0.80–1.15)	N.S.
	Suter y cols. [69]	>17 GGC	Pincipalmente Caucásica	Mujeres < 45 años (OC usuarios)	515	443	0.70 (0.50–0.90)	0.026

### II.1.5- LA ENZIMA AROMATASA

La aromatasa es una enzima que pertenece a la superfamilia del citocromo P450. Esta enzima es clave en el metabolismo de las hormonas esteroideas, ya que interviene en la conversión de los andrógenos (androstendiona y testosterona) en estrógenos (estrón y estradiol respectivamente). La aromatasa cataliza la desaturación (aromatización) del anillo A de los andrógenos C19, eliminando el 19-metil y convirtiéndolos en estrógenos C18.

La enzima se encuentra localizada en la membrana del retículo endoplasmático de las células productoras de estrógenos situadas en los ovarios de las mujeres premenopaúsicas (células de la granulosa y cuerpo lúteo), testículos (células de Leydig), placenta, tejido adiposo periférico, endometrio, piel, cerebro, etc. La aromatasa también está presente en el tejido mamario, tanto sano como tumoral, donde constituye una fuente de producción local de estrógenos. La utilización de inhibidores de aromatasa disminuye drásticamente la síntesis de estrógenos en el tejido normal de mama y en el tumoral, por lo que constituye una importante estrategia para reducir los efectos proliferativos de los estrógenos. Los inhibidores de aromatasa han demostrado su eficacia para suprimir la síntesis periférica de estrógenos en mujeres postmenopaúsicas, por lo que son ampliamente empleados como terapia antiestrogénica en cáncer de mama.<sup>71-73</sup>

La enzima aromatasa está codificada por el gen *CYP19*, que se encuentra localizado en el cromosoma 15 (15q21.1.). En este gen se distingue una larga región reguladora de 93kb y una región codificante de 30 kb. La región reguladora contiene diez promotores que son usados alternativamente según el tejido y el tipo de célula, seguidos por al menos otras diez variantes del exón 1 (no codificante). La región codificante la constituyen nueve exones (exones del 2 al 10) (Figura II.4). Cada una de las variantes del exón 1 está bajo el control de un promotor determinado, cuya activación da lugar, por splicing alternativo, a un transcrito que comienza con el correspondiente exón 1, seguido de la secuencia de la región codificante.<sup>74,75</sup>

Figura II.4 Estructura del gen de la aromatasa *CYP19*.

### II.1.6- MICROSATÉLITE (TTTA)<sub>n</sub> DE LA ENZIMA AROMATASA

El gen *CYP19* contiene un microsatélite polimórfico constituido por un tracto repetitivo del tetranucleótido (TTTA)<sub>n</sub>.<sup>76</sup> Éste se encuentra situado en el intrón 4 del gen, ochenta pares de bases aguas abajo del exón 4. Su tamaño es variable, oscilando entre las 7 y 13 repeticiones. Alrededor de cuarenta pares de bases aguas arriba de este microsatélite se ha encontrado una delección de tres pares de bases. La delección se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el alelo de 7 repeticiones del microsatélite (TTTA)<sub>7</sub>.<sup>77</sup>

#### II.1.6.1- El microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> y su relación con la actividad aromatasa y la concentración de hormonas sexuales.

Un estudio funcional *in vitro* realizado por Gennari y cols.<sup>81</sup> reveló mayor actividad aromatasa en los fibroblastos de aquellos varones con un alto número de repeticiones.

Aunque diversos estudios también han relacionado la longitud de este microsatélite con las concentraciones en suero de distintas hormonas esteroideas

(estrona, estradiol, androstendiona y testosterona), los resultados de los mismos no son del todo coincidentes.

En un estudio realizado por Tworoger y cols.<sup>78</sup> en mujeres postmenopáusicas, se observó que las mujeres portadoras del alelo de ocho repeticiones (TTTA)<sub>8</sub> tenían mayores concentraciones séricas de estrona y estradiol que las no portadoras. Coincidiendo con estos resultados, Haiman y cols.<sup>79</sup> también encontraron elevados niveles de estrona, estradiol y un alto cociente estrona/androstendiona en aquellas mujeres portadoras del alelo (TTTA)<sub>8</sub>. Además, las mujeres que poseían el alelo (TTTA)<sub>7</sub> mostraban menores niveles de estrona sulfato, estrona, estradiol y cociente estrona/androstendiona que las no portadoras. Berstein y cols.<sup>80</sup> hallaron una asociación modesta entre el alelo (TTTA)<sub>12</sub> y altos niveles de estradiol y testosterona en pacientes postmenopáusicas con cáncer de endometrio. También se han encontrado elevados niveles de estradiol en varones portadores de un alto número de repeticiones (más de nueve repeticiones).<sup>81</sup> Sin embargo, en otros trabajos como los realizados por Probst-Hensch y cols.<sup>82</sup> y Tavis y cols.<sup>83</sup> no se pudo observar ninguna relación entre la longitud de este microsatélite con el cociente estrona/androstendiona o con el estradiol.

### II.1.6.2- El microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> y su relación con el cáncer de mama

Son muchos los estudios que han analizado la posible asociación de ciertos alelos del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> de *CYP19* y el cáncer de mama. Sin embargo, los resultados de estos estudios no permiten llegar a ninguna conclusión clara, ya que son muchos y muy variados los alelos que han sido asociados con la enfermedad, como el alelo (TTTA)<sub>7</sub> del TCT y (TTTA)<sub>>10</sub>,<sup>84,85</sup> (TTTA)<sub>7</sub>,<sup>86</sup> (TTTA)<sub>8</sub> y (TTTA)<sub>10</sub>,<sup>87,79</sup> (TTTA)<sub>11</sub><sup>88</sup> y (TTTA)<sub>12</sub><sup>79, 89</sup>.

Entre todos ellos el alelo de diez repeticiones (TTTA)<sub>10</sub> es el que en más ocasiones ha mostrado asociación con dicha enfermedad. Haiman y cols.<sup>79</sup> observaron una alta frecuencia del alelo diez entre las pacientes con cáncer de mama más avanzado pertenecientes a la Nurses' Health Study cohort. Otros dos estudios, uno realizados en mujeres chinas por Han y cols.<sup>90</sup> y otro en brasileñas por Ribeiro y cols.<sup>91</sup> también hallaron una asociación entre este alelo y el desarrollo de cáncer de mama.

En mujeres nigerianas portadoras de alelos largos (10 o más repeticiones). Okobia y cols.<sup>92</sup> observaron igualmente un incremento del riesgo de cáncer de mama.



## II.2- OBJETIVOS

A la vista del importante papel que estrógenos y andrógenos parecen tener en el desarrollo del cáncer de mama, es importante conocer aquellas variantes genéticas que puedan modificar la actividad o las concentraciones de estas hormonas.

Los microsatélites polimórficos, debido a su alta mutabilidad, son componentes importantes de la variabilidad genética humana. Algunos de ellos se encuentran localizados en genes importantes para el metabolismo de las hormonas sexuales. Este es el caso de los microsatélites polimórficos  $(CAG)_n$  y  $(GGC)_n$ , situados en el gen del receptor de andrógenos, y  $(TTTA)_n$  de la enzima aromatasa. Existen estudios previos que indican que variaciones en la longitud de estos microsatélites podrían modificar la actividad y/o concentración de la enzima o el receptor, así como las concentraciones de hormonas esteroideas en suero. Ello hace de estos microsatélites buenos candidatos como posibles variantes de susceptibilidad para el cáncer de mama.

Por tanto, este trabajo tiene como objetivo principal conocer si la longitud de los microsatélites  $(CAG)_n$ ,  $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  muestra asociación con el cáncer de mama.

De igual forma nos propusimos conocer la distribución alélica de estos microsatélites en nuestra población.





## II.3- MATERIAL Y MÉTODOS

### II.3.1- DISEÑO

Estudio de casos y controles.

#### II.3.1.1- Participantes

##### a) Características de los casos

Como casos para este estudio se seleccionaron 300 pacientes del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria, con diagnóstico confirmado de cáncer de mama entre los años 1990 y 2005. Las pacientes eran residentes en la provincia de Santa Cruz de Tenerife, y sus edades estaban comprendidas entre los 33 y 74 años. La edad de diagnóstico oscilaba entre los 26 y 74 años, con una edad media de 50 años.

##### b) Características de los controles

Como controles de este estudio se seleccionaron 435 mujeres entre las participantes de la cohorte CDC de Canarias de edades comprendidas entre los 32 y 77 años, residentes en la provincia de Santa Cruz de Tenerife, que no habían padecido cáncer de mama hasta ese momento.

La cohorte CDC de Canarias lleva a cabo el seguimiento de una cohorte de población general con el fin de analizar la prevalencia e incidencia de cáncer, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares en la población adulta del archipiélago canario, así como la exposición a sus factores de riesgo.<sup>93</sup> Las siglas CDC son el acrónimo del nombre de las tres enfermedades que son objeto de este estudio: cáncer, diabetes y cardiovascular.

La cohorte se reclutó entre enero del año 2000 y diciembre del 2005 de forma aleatoria a partir del censo de tarjetas sanitarias, que incluye la casi totalidad de la población residente en el archipiélago. El tamaño final de la muestra fue de 6729 participantes y las edades de los mismos estuvieron comprendidas entre los 18 y 75 años.

A los participantes se les realizó una exploración física, en la que se recogieron medidas antropométricas (peso, talla, circunferencia abdominal, circunferencia pélvica, etc.) y una extracción de sangre venosa en ayunas. De esta sangre se reservó una pequeña muestra para la obtención de ADN, que permaneció almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción. Otra parte de la sangre fue centrifugada a 2.000 rpm durante 10 minutos para permitir la separación del suero de las células sanguíneas. Este suero se almacenó en pequeñas alícuotas de 1ml a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La sangre restante se reservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los participantes de este estudio respondieron a un cuestionario administrado realizado por encuestadores entrenados con este fin. Entre los aspectos recogidos en la encuesta se encontraban los antecedentes personales y familiares de enfermedad, historia ginecológica obstétrica, hábitos de vida, etc.

Este cuestionario se encuentra disponible en la página web ([www.ici.es/cuestionario-CDC/docs](http://www.ici.es/cuestionario-CDC/docs)). Los participantes dieron su consentimiento informado para almacenar sus muestras de sangre, suero y ADN, así como para consultar su historial clínico y emplear la información obtenida en estudios posteriores.

### **II.3.1.2- Obtención de muestras e información relevante de los casos para el estudio**

Aquellas pacientes que tras ser informadas sobre los objetivos del estudio accedieron voluntariamente a participar en el mismo, fueron citadas entre los meses de febrero y mayo del año 2005 para una exploración física, toma de muestras y entrevista personal. En el transcurso de la exploración física se tomaron las medidas antropométricas que fueron empleadas en el estudio. También se procedió a extraer

una muestra de sangre venosa de la que se reservó una pequeña muestra (200µl) para la obtención de ADN, que permaneció almacenada a -20°C hasta el momento de la extracción.

Durante la entrevista personal, realizada entre los meses de febrero y mayo del año 2005, las pacientes respondieron al cuestionario CDC, administrado por encuestadoras contratadas para el proyecto. A partir de este cuestionario se obtuvieron los datos relacionados con factores de riesgo para cáncer de mama que fueron empleados en este estudio (antecedentes familiares, edad de menarquia y menopausia, uso de anticonceptivos orales, hábitos tabáquicos, etc.). Los datos clínicos y patológicos (tamaño del tumor, grado, invasividad y receptores hormonales) fueron obtenidos a partir de los historiales médicos de las pacientes, previo consentimiento informado.

### **II.3.1.3- Obtención de muestras e información relevante para el estudio de los controles**

El ADN usado para el estudio fue extraído a partir de la alícuota de 200 µl de sangre extraída durante el reclutamiento de la cohorte y conservada a -20°C .

La información sobre factores de riesgo para cáncer de mama se obtuvo a partir de los cuestionarios CDC administrados a los participantes de la cohorte.

### **II.3.2- ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE LOS MICROSATÉLITES (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub>**

En primer lugar se procedió a la extracción de ADN a partir de 200 µl de sangre usando el kit comercial PCR Template preparation (Roche Applied Science). A continuación se amplificaron, mediante PCR los fragmentos de los genes *AR* y *CYP19* donde se encuentran localizados los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub>. Para esta amplificación se usaron parejas de primers que habían sido empleadas con anterioridad en otros estudios.<sup>94-96</sup>

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , y conteniendo aproximadamente 60 ng de ADN, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 1X Fast Start Taq DNA polymerase buffer (Roche Applied Science), 1X GC-rich buffer solution (esta solución no fue usada para la amplificación del microsatélite  $(\text{TTTA})_n$ ), 0,25 unidades de Fast Start Taq DNA polymerase, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , y 1.2  $\mu\text{M}$  de cada primer (un primer de cada pareja marcado con un fluorocromo). Las condiciones bajo las que se llevó a cabo la amplificación fueron las siguientes:

$(\text{CAG})_n$  y  $(\text{TTTA})_n$ : 95 °C 5', (95 °C 45", 56 °C 30", 72 °C 30") 30 ciclos, 72 °C 7.'

$(\text{GGC})_n$ : 95 °C 5', (95 °C 1', 55 °C 2", 72 °C 30") 30 ciclos, 72 °C 7.'

A continuación el producto de PCR fue diluido 1:50-1:100 en agua destilada. Un microlitro de esta dilución se mezcló con 10  $\mu\text{L}$  de formamida y 0.3  $\mu\text{L}$  de GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). La mezcla se desnaturalizó a 95 °C durante 3' y se dejó enfriar en hielo. Los Fragmentos fueron separados mediante electroforesis capilar usando el analizador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos fue estimado con ayuda del software Gene Scan Analysis V 3.7 (Applied Biosystems).

Posteriormente se procedió a la amplificación y secuenciación de estos microsatélites en diversas muestras para las que los fragmentos amplificados mostraron tamaños diferentes.

Las condiciones de amplificación fueron idénticas a las descritas anteriormente, a excepción de que los primers utilizados no estaban marcados con fluorocromos. Para la reacción de secuenciación se empleó el kit comercial Big Dye Terminator Sequencing V 3.1 (Applied Biosystems). La electroforesis capilar se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI Prism 3100. Los resultados fueron analizados con el programa Sequencing Análisis V 3.7 (Applied Biosystems).

A partir de los resultados obtenidos se estableció la correspondiente relación entre el tamaño de los fragmentos amplificados y el número de repeticiones para cada microsatélite.

Teniendo en cuenta esta relación se estimó en las muestras restantes el número de repeticiones de los microsátélites, asignándoseles el alelo correspondiente.

### **II.3.3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las variables fueron resumidas conforme a su escala y distribución. Se empleó el test de la chi cuadrado de Pearson para comparar proporciones y un test de la t de Student para comparar variables continuas. Los riesgos relativos se estimaron como razones de ventaja (OR) entre casos y controles, ajustando modelos de regresión logística binaria. En ellos la presencia o ausencia de cáncer de mama fue la variable dependiente y los polimorfismos analizados se incluyeron como predictores junto a otros factores conocidos o sospechados como de riesgo o protección para este cáncer. El método empleado en el ajuste fue el de la Introducción. La significación estadística se aceptó en todos los test al nivel del 5% bidireccional. Los análisis fueron hechos con el paquete estadístico para ciencias sociales SPSS (versión 15.0 en español para Windows). El equilibrio Hardy-Weinberg fue calculado usando el programa Arlequín (versión 2.0).



## II.4- RESULTADOS

### II.4.1- CARACTERÍSTICAS DE CASOS Y CONTROLES

Al comparar la características de casos y controles en relación con conocidos o posibles factores de riesgo para el cáncer de mama (Tabla II.2), se observó que el porcentaje de mujeres con antecedentes familiares en primer grado de esta enfermedad, era mayor en los casos que en los controles ( $p < 0.001$ ). La edad de menarquia, otro factor de riesgo conocido para el cáncer de mama, resultó ser menor en los casos que en los controles ( $p < 0.002$ ).

También se observaron diferencias en la proporción de mujeres que consumen o han consumido tabaco (mayor en casos que en controles) ( $p < 0.001$ ), pero no en el tiempo de consumo. En cuanto a la lactancia materna, la proporción de mujeres que amamantaron a sus hijos o no fue diferente entre casos y controles, aunque sí el tiempo de duración de la lactancia materna (mayor en casos que en controles) ( $p < 0.015$ ). El resto de las variables (edad de menopausia, número de hijos, edad a la tuvieron el primer y último hijo, consumo de anticonceptivos, tiempo de consumo de tabaco y de anticonceptivos, e índice de masa corporal) no mostraron diferencias significativas entre casos y controles.

**Tabla II.2 Características de casos y controles**

Características	Casos		Controles		p
	n	Media $\pm$ SE/ %	n	Media $\pm$ SE/ %	
<i>Edad (años)</i>	297	55.5 $\pm$ 0.5	435	54.0 $\pm$ 0.4	0.037
<i>Antecedentes CM familiares 1º grado</i>	297	31.6	435	10.8	<0.001
<i>Edad de menarquia (años)</i>	293	12.9 $\pm$ 0.1	427	13.3 $\pm$ 0.1	0.002
<i>Edad de menopausia natural* (años)</i>	107	49.8 $\pm$ 0.5	206	49.4 $\pm$ 0.3	0.403
<i>Consumo de anticonceptivos orales</i>	292	49	430	49	0.972
<i>Tiempo consumo de anticonceptivos (años)</i>	143	6.2 $\pm$ 0.6	210	5.7 $\pm$ 0.4	0.476
<i>Número de hijos</i>	295	2.7 $\pm$ 0.2	433	2.7 $\pm$ 0.1	0.950
<i>Edad a la que tuvieron primer hijo (años)</i>	258	24.3 $\pm$ 0.3	397	23.8 $\pm$ 0.2	0.229
<i>Edad a la que tuvieron el último hijo (años)</i>	224	31.5 $\pm$ 0.4	358	31.6 $\pm$ 0.3	0.921
<i>Han amamantado a sus hijos</i>	297	71	335	75	0.147
<i>Tiempo de lactancia (meses)</i>	210	11.7 $\pm$ 1.1	329	15.84 $\pm$ 1.3	0.015
<i>Fumadoras o exfumadoras</i>	224	41	92	21	<0.001
<i>Tiempo de consumo tabaco (años)</i>	121	22.5 $\pm$ 1.0	92	20.0 $\pm$ 1.3	0.122
<i>IMC(kg/m<sup>2</sup>)</i>	288	28.8 $\pm$ 0.4	428	29.3 $\pm$ 0.2	0.168

\* Menopausia fisiológica (sin intervención quirúrgica, debido a fármacos u otras causas no naturales).

#### II.4.2- Características clínicas de los casos de cáncer de mama.

En cuanto a las características clínicas del grupo de casos (Tabla II.3), cabe destacar que éste incluyó tanto pacientes con un diagnóstico reciente de cáncer de mama como otras diagnosticadas varios años antes y en seguimiento por el servicio de Oncología Médica (el número medio de años desde el diagnóstico fue de  $5.6 \pm 5.5$  años). El porcentaje de pacientes en estadios tempranos de la enfermedad (T1, N0 y M0), así como aquellas con receptores de estrógenos y de progesterona positivos indican que en este grupo de casos podrían estar sobrerrepresentadas aquellas pacientes con un mejor pronóstico.

<b>Tabla II.3 Características clínicas de los casos de cáncer de mama</b>		
<b>Características</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>T (tamaño del tumor)</b>		
<b>T1</b>	133	55
<b>T2</b>	91	38
<b>T3+ T4</b>	18	7
<b>N (invasión ganglionar)</b>		
<b>N0</b>	176	67
<b>N1</b>	80	30
<b>N2+N3</b>	3	3
<b>M (estadio metastásico)</b>		
<b>M0</b>	174	99
<b>M1</b>	2	1
<b>Grado del tumor</b>		
<b>1</b>	46	23
<b>2</b>	53	26
<b>3</b>	103	51
<b>Estadio del tumor</b>		
<b>I</b>	45	38
<b>II</b>	65	55
<b>III</b>	6	5
<b>IV</b>	2	2
<b>Receptor de estrógenos</b>		
<b>Positivo</b>	132	79
<b>Negativo</b>	36	21
<b>Receptor de progesterona</b>		
<b>Positivo</b>	123	74
<b>Negativo</b>	44	26

### II.4.3- DISTRIBUCIÓN ALÉLICA PARA LOS MICROSATÉLITES (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> Y (TTTA)<sub>n</sub>

Para el microsatélite (CAG)<sub>n</sub> se obtuvieron los datos genotípicos de 272 casos y 413 controles hallándose 25 alelos de longitudes comprendidas entre las 11 y 37 repeticiones. El alelo con mayor frecuencia, tanto en casos como en controles fue el de 21 repeticiones, seguido por los de 19 y 24 repeticiones. La distribución alélica se aproximó a la normal (Tabla II.4 y figura II.5). La heterocigosidad observada fue del 0,9.

En el caso del microsatélite (GGC)<sub>n</sub> se obtuvieron datos genotípicos para 272 casos y 418 controles. Este microsatélite, menos polimórfico que el anterior, mostró 17 alelos con tamaños comprendidos entre las 5 y 21 repeticiones. Los alelos más frecuentes fueron los de 16 y 17 repeticiones, tanto en los casos como en los controles (Tabla II.4 y figura II.6). La heterocigosidad observada fue del 0,58.

Para el microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> se obtuvieron los datos genotípicos de 283 casos y 417 controles, que mostraron siete alelos diferentes con tamaños comprendidos entre las 7 y 13 repeticiones y una distribución bimodal. Los alelos más frecuentes fueron los de 7 y 11 repeticiones una distribución bimodal. (Tabla II.4 y figura II.7) La heterocigosidad observada fue del 0,53.

Las frecuencias alélicas de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> fueron semejantes en casos y controles.

Las frecuencias alélicas no se desviaron del equilibrio Hardy- Weinberg para ninguno de los tres microsatélites ni en casos ni en controles.



**Tabla II.4 Frecuencias alélicas para  $(CAG)_n$ ,  $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  en casos y controles**

Número de repeticiones/ Alelo	$(CAG)_n$				$(GGC)_n$				$(TTTA)_n$			
	Controles		Casos		Controles		Casos		Controles		Casos	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
5	-	-	-	-	3	0.4	1	0.2	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	2	0.4	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	1	0.2	481	57.7	302	53.4
8	-	-	-	-	2	0.2	1	0.2	58	7.0	51	9.0
9	-	-	-	-	3	0.4	1	0.2	2	0.2	-	-
10	-	-	-	-	1	0.1	2	0.4	9	1.1	9	1.6
11	1	0.1	-	-	3	0.4	3	0.6	245	29.4	187	33.0
12	2	0.2	1	0.2	30	3.6	26	4.8	32	3.8	15	2.7
13	-	-	-	-	13	1.6	8	1.5	7	0.8	-	-
14	6	0.7	8	1.5	6	0.7	3	0.6	-	-	-	-
15	2	0.2	3	0.6	25	3.0	18	3.3	-	-	-	-
16	9	1.1	9	1.7	475	56.6	280	51.5	-	-	-	-
17	19	2.3	8	1.5	210	25.1	147	27.0	-	-	-	-
18	70	8.5	34	6.3	44	5.3	39	7.2	-	-	-	-
19	116	14.0	75	13.8	11	1.3	4	0.7	-	-	-	-
20	86	10.4	56	10.3	11	1.3	8	1.5	-	-	-	-
21	125	15.1	92	16.9	1	0.1	-	-	-	-	-	-
22	73	8.8	48	8.8	-	-	-	-	-	-	-	-
23	89	10.8	55	10.1	-	-	-	-	-	-	-	-
24	109	13.2	69	12.7	-	-	-	-	-	-	-	-
25	57	6.9	36	6.6	-	-	-	-	-	-	-	-
26	33	4.0	24	4.4	-	-	-	-	-	-	-	-
27	11	1.3	6	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-
28	6	0.7	8	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-
29	4	0.5	5	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-
30	4	0.5	2	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	1	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
33	1	0.1	2	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	1	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
35	1	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	2	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	1	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura II.5 Distribución alélica para el microsatélite (CAG)<sub>n</sub> del AR.

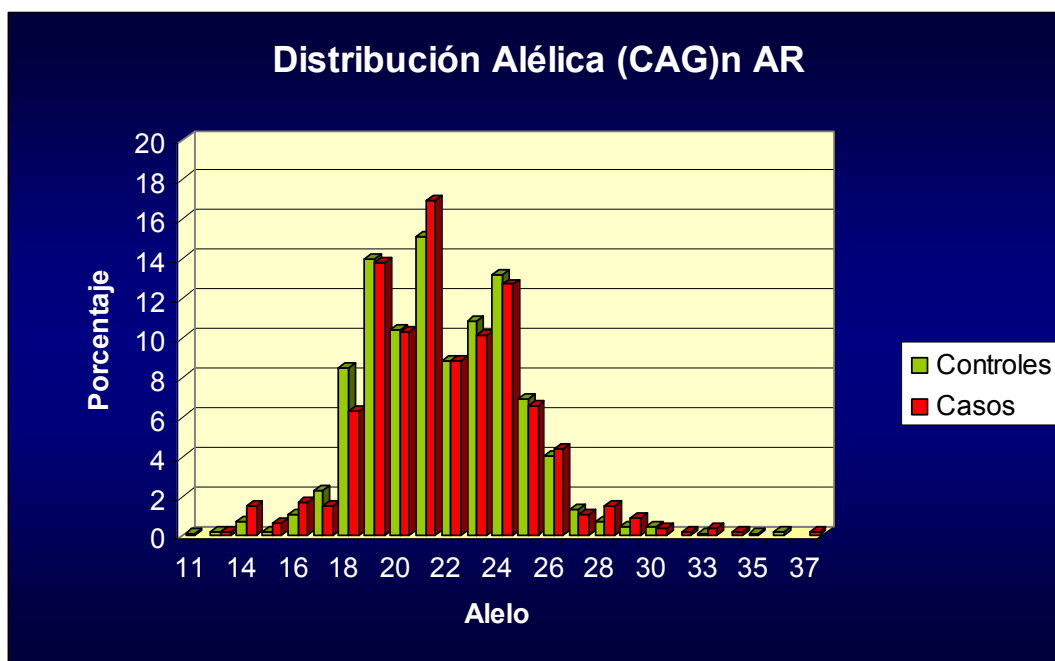


Figura II.6 Distribución alélica para el microsatélite (GGC)<sub>n</sub> del AR.

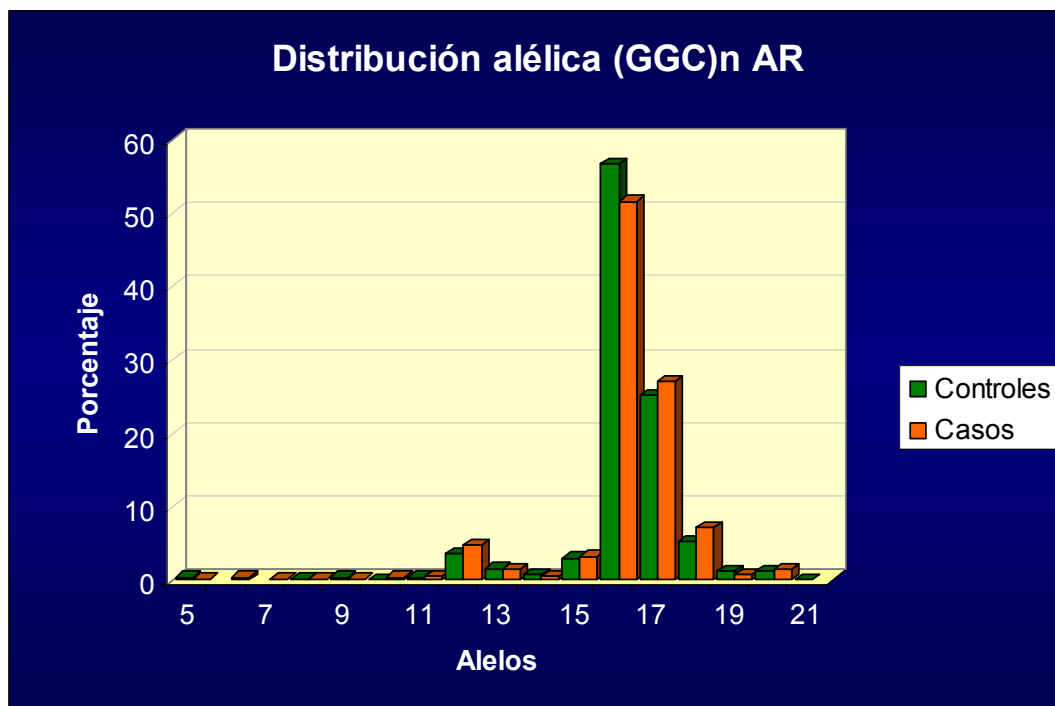
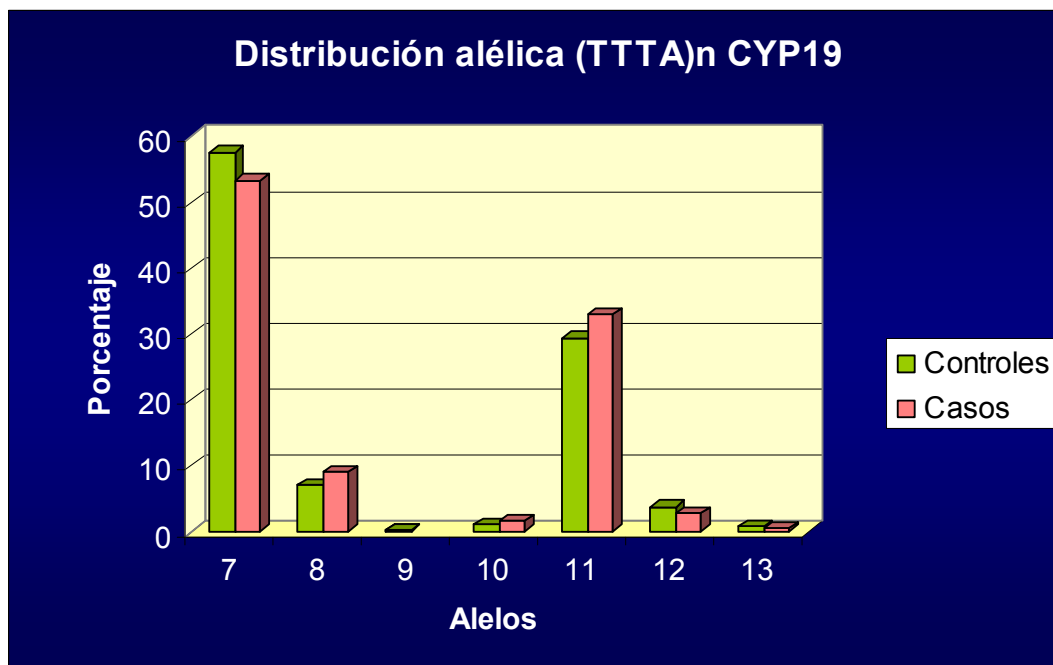


Figura II.7 Distribución alélica para el microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> de *CYP19*.

#### II.4.4- POLIMORFISMOS (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> Y (TTTA)<sub>n</sub> Y CÁNCER DE MAMA

Cuando se comparó la media de la longitud de los alelos cortos y largos, no se observaron diferencias significativas entre casos y controles para ninguno de los tres microsatélites (en el caso de participantes heterocigotas se consideró como alelo corto el de menor número de repeticiones y como alelo largo el de mayor número de ellas). Tampoco se observaron diferencias para el alelo medio. Se consideró alelo medio (CAG<sub>x</sub>, GGC<sub>x</sub>, TTTA<sub>x</sub>) al número medio de repeticiones calculado a partir de la longitud los dos alelos (alelo corto+ alelo largo/2) (Tabla II.5).

**Tabla II.5 Tamaños medios de alelos de (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> en casos y controles**

Alelo	Casos	Controles	p
	Media ± SE	Media ± SE	
<b>(CAG)<sub>n</sub></b>			
Alelo corto	20.00 ± 0.1	19.94 ± 0.1	NS*
Alelo largo	23.38 ± 0.2	23.20 ± 0.1	NS
Alelo medio (CAG <sub>x</sub> )	21.69 ± 0.1	21.57 ± 0.1	NS
<b>(GGC)<sub>n</sub></b>			
Alelo corto	16.33 ± 0.1	16.49 ± 0.1	NS
Alelo largo	17.18 ± 0.1	17.74 ± 0.1	NS
Alelo medio (GGC <sub>x</sub> )	17.06 ± 0.1	17.11 ± 0.1	NS
<b>(TTTA)<sub>n</sub></b>			
Alelo corto	7.65 ± 0.1	7.63 ± 0.1	NS
Alelo largo	9.58 ± 0.1	9.42 ± 0.1	NS
Alelo medio (TTTA <sub>x</sub> )	8.61 ± 0.1	8.52 ± 0.1	NS

\*NS=no significativa

Se procedió entonces a categorizar la longitud de los microsatélite de la siguiente forma: en la categoría corta (SS) se incluyó a aquellas mujeres cuyos dos alelos tenía una longitud igual o inferior a la media (22 repeticiones para (CAG)<sub>n</sub>, 17 repeticiones para (GGC)<sub>n</sub> y 9 repeticiones para (TTTA)<sub>n</sub>), en la categoría media (SL) a las portadoras de un alelo con una longitud igual o inferior a la media y un alelo mayor que la media. En la categoría larga (LL) se incluyó a aquellas mujeres cuyos dos alelos mostraban longitudes por encima de la media.

La distribución de frecuencias para estas categorías no mostró diferencias entre casos y controles para ninguno de los tres microsatélites (Figuras II.8-II.10).

Figura II.8 Distribución de frecuencias para las tres categorías de  $(CAG)_n$  del AR

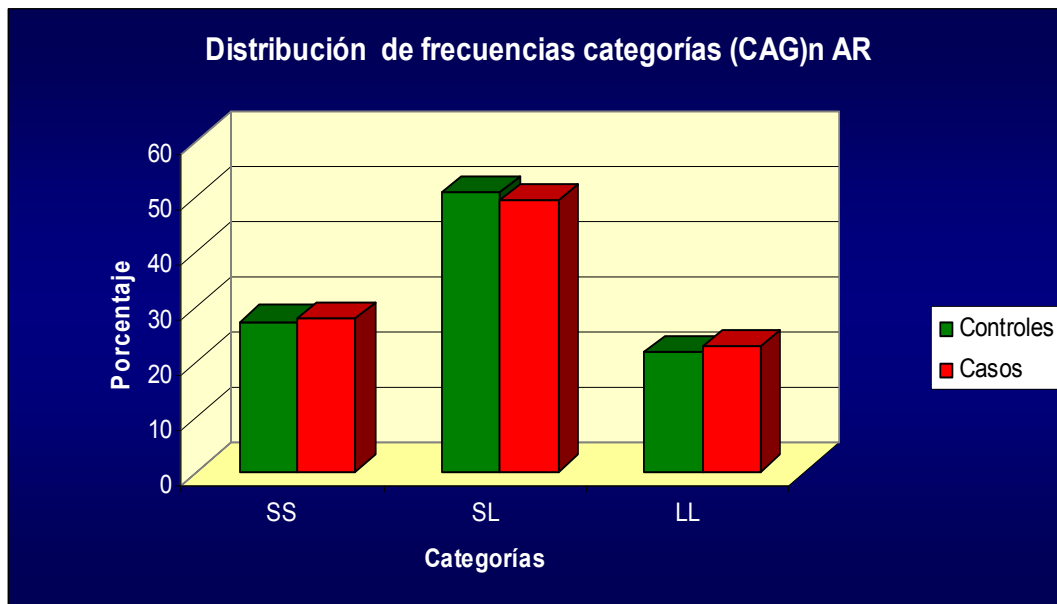


Figura II.9 Distribución de frecuencias para las tres categorías de  $(GGC)_n$  del AR

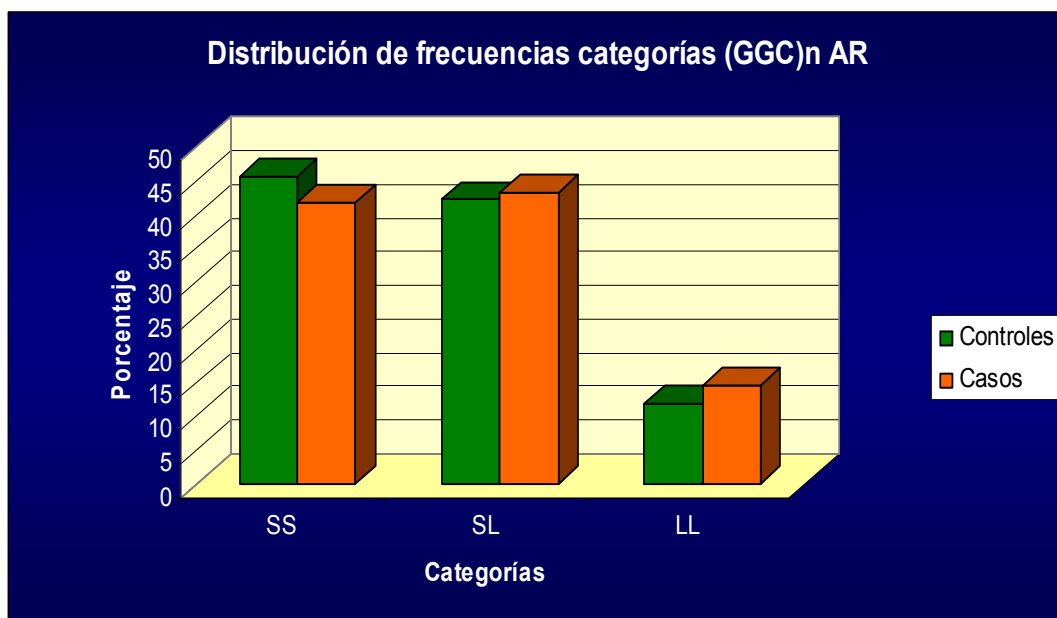
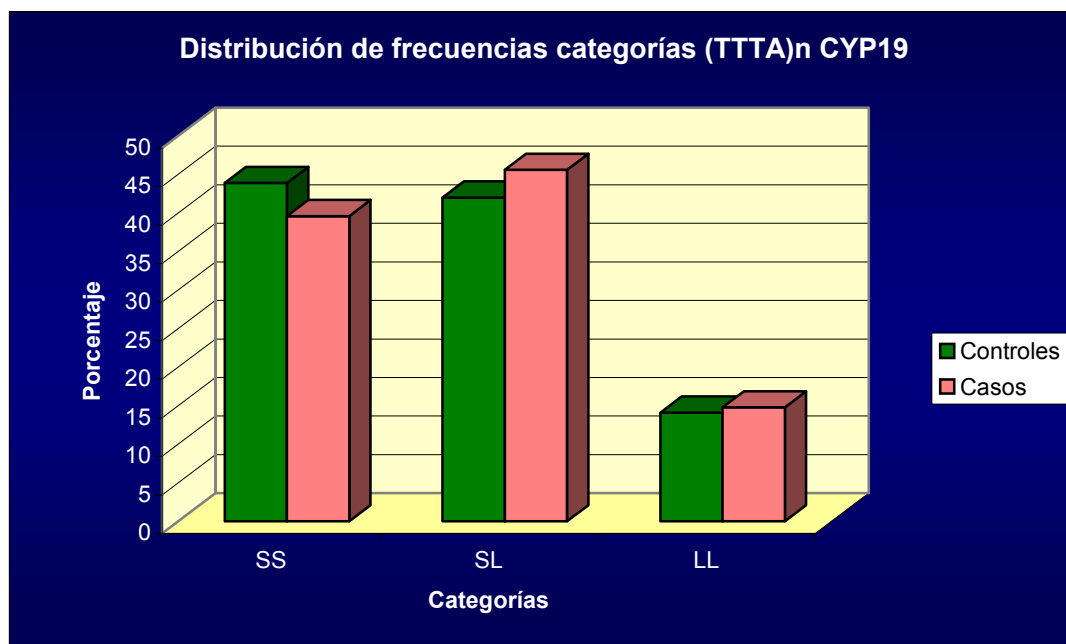


Figura II.10 Distribución de frecuencias para las tres categorías de (TTTA)<sub>n</sub> de CYP19

Sin embargo, cuando se compararon las distribuciones de los alelos medios ( $CAG_x$ ), ( $GGC_x$ ), ( $TTTA_x$ ), se pudieron apreciar algunas diferencias ente casos y controles (Figuras II.11-II.13), por lo que se procedió a categorizar los alelos medios en función de su longitud. Los puntos de corte establecidos para dicha categorización [22 repeticiones para ( $CAG_x$ ), 17 para ( $GGC_x$ ) y 7 para ( $TTTA_x$ )] fueron aquellos para los que se observaron máximas diferencias entre casos y controles. De esta forma se generaron para cada uno de los microsatélites dos categorías: la categoría corta (S), cuando la longitud del alelo medio se encontraba por debajo del punto de corte establecido ( $CAG_x \leq 22$  /  $GGC_x < 17$  /  $TTTA_x \leq 7$ ) y la categoría larga (L) cuando la longitud del alelo medio se encontraba por encima del punto de corte ( $CAG_x > 22$  /  $GGC_x \geq 17$  /  $TTTA_x > 7$ )

Figura II.11 Distribución de frecuencias para el alelo medio (CAGx) del AR

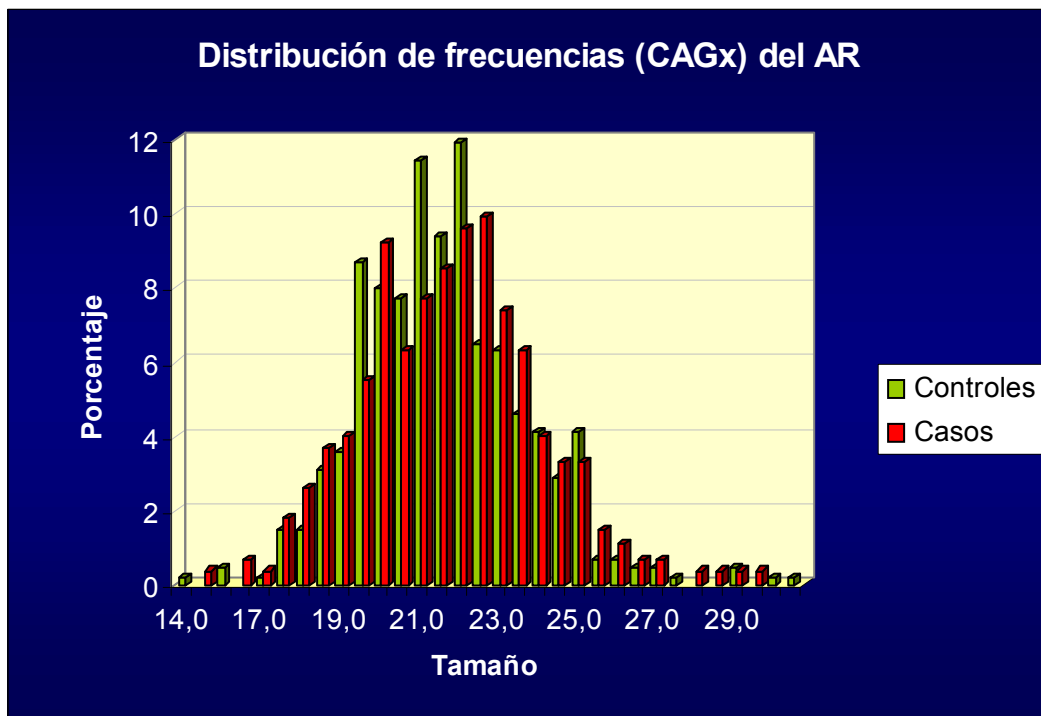


Figura II.12 Distribución de frecuencias para el alelo medio (GGCx) del AR

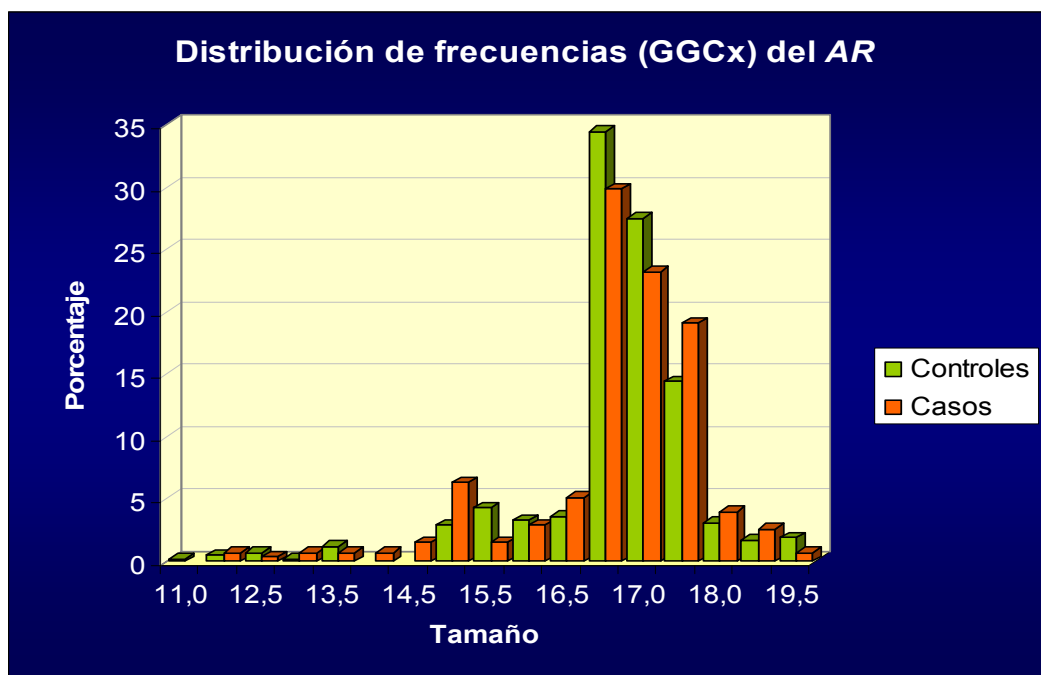
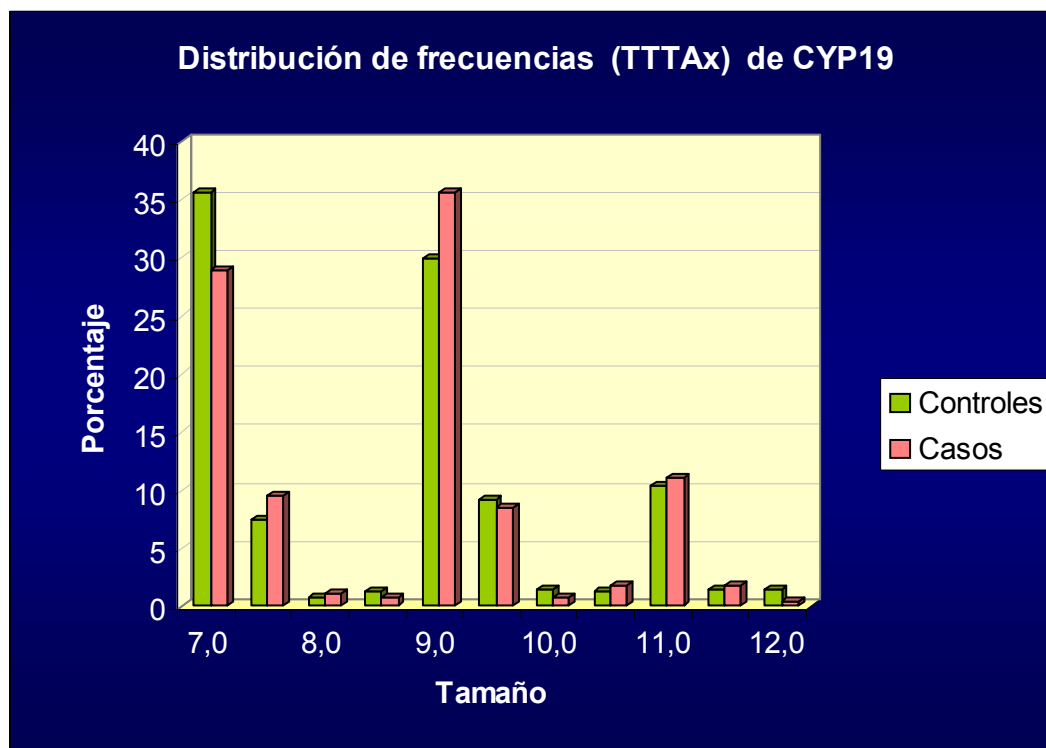


Figura II.13 Distribución de frecuencias para el alelo medio (TTTA<sub>x</sub>) del CYP19

Los análisis bivariados revelaron que para el microsatélite (CAG)<sub>n</sub> la proporción de casos pertenecientes a la categoría larga (CAG<sub>x</sub>>22) era significativamente mayor en casos que en controles, y que las mujeres portadoras de un alelo medio largo (CAG<sub>x</sub>>22) presentaban mayor riesgo de padecer cáncer de mama que las portadoras de un alelo medio corto (CAG<sub>x</sub> ≤22) (OR=1.39; CI95%=1.01-1.91; p=0.045) (Tabla II. 6). Para el microsatélite (GGC)<sub>n</sub> no se observaron diferencias significativas

En el caso del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> se observó una mayor proporción de casos con alelos medios largos (TTTA<sub>x</sub> >7) alcanzándose diferencias próximas a la significación estadística (OR=1,36; CI95%=(0.98-1.89); p=0.062).

Como se comentó con anterioridad en el grupo de casos podrían estar sobrerrepresentadas aquellas pacientes con un mejor pronóstico. En un intento por minimizar este sesgo, los análisis se repitieron tomando como casos aquellos con un



diagnóstico más reciente ( $\leq 3$  años). Los resultados obtenidos fueron similares, observándose un mayor riesgo de padecer cáncer de mama tanto para las portadoras de alelos largos de (CAG<sub>x</sub>) (OR=1.62; CI95%=(1.07-2.45); p=0.023), como de (TTTA<sub>x</sub>) (OR=1.69; CI95%= (1.07-2.65); p=0.024).

Se realizaron también análisis de regresión logística multivariados, tomando la condición de padecer o haber padecido cáncer de mama como variable dependiente, y el tamaño de los alelos medios de los microsatélites categorizados como cortos (S) o largos (L) como variables independientes. En el análisis se incluyeron otros posibles factores de riesgo para el cáncer de mama (edad, edad de menarquia, historia familiar de cáncer de mama y condición de fumador) como variables independientes. Los resultados de estos análisis señalaron nuevamente un mayor riesgo de padecer cáncer de mama para las mujeres portadoras de un alelo medio largo (CAG<sub>x</sub>>22) (OR=1,51; CI95%=1.08-2.16; p=0.018) (Tabla II. 7).

Cuando los casos se restringieron a las pacientes diagnosticadas en los últimos tres años se observó un mayor riesgo para aquellas mujeres con alelos largos para (CAG<sub>x</sub>) (OR=1,93; CI95%=1.23-3.04; p=0.004). Para (TTTA<sub>x</sub>) se obtuvieron diferencias próximas a la significación estadística (OR=1.60; CI95%=0.99-2.59; p=0.062).

En el del caso del microsatélite (GGC)<sub>n</sub> no se observaron diferencias entre casos y controles.

**Tabla II.6 Análisis bivariado entre la longitud los alelos medios (CAG<sub>x</sub>), (GGC<sub>x</sub>) y (TTTA<sub>x</sub>) y el cáncer de mama**

Categoría	Controles	Casos totales	OR (95% CI)	p	Controles	Casos ≤3 años*	OR (95% CI)	p
	n /%	n /%			n /%	n /%		
<b>CAG<sub>x</sub> ≤ 22 (S)</b>	280(67.8)	164(60.3)	1.39 (1.01-1.91)	0.045	280(67.8)	69(56.2)	1.62 (1.07-2.45)	0.023
<b>CAG<sub>x</sub> &gt; 22(L)</b>	133(32.2)	108(39.7)			133(32.2)	53(43.4)		
<b>GGC<sub>x</sub> &lt; 17(S)</b>	330(79.0)	200(73.5)	1.35 (0.94-1.93)	0.100	330(78.9)	86(74.1)	1.31 (0.81-2.11)	0.270
<b>GGC<sub>x</sub> ≥ 17 (L)</b>	88(21.0)	72(26.5)			88(21.1)	30(25.9)		
<b>TTTA<sub>x</sub> ≤ 7(S)</b>	149(35.7)	82(29.0)	1.36 (0.98-1.89)	0.062	149(35.7)	31(24.8)	1.69 (1.07-2.65)	0.024
<b>TTTA<sub>x</sub> &gt; 7(L)</b>	268(64.3)	201(71.0)			268(64.3)	94(75.2)		

\*Incluidos únicamente casos diagnosticados en los últimos 3 años.

**Tabla II.7 Análisis multivariado de regresión logística entre la longitud de los alelos medios (CAG<sub>x</sub>), (GGC<sub>x</sub>) y (TTTA<sub>x</sub>) y el cáncer de mama**

Categoría	Controles	Casos totales	OR (95% CI)	p	Controles	Casos ≤3 años *	OR (95% CI)	p
	n /%	n /%			n /%	n /%		
<b>CAG<sub>x</sub> ≤ 22 (S)</b>	274(67.8)	161(60.3)	1.51 (1.08-2.16)	0.018	274(67.8)	68(56.2)	1.93 (1.23-3.04)	0.004
<b>CAG<sub>x</sub> &gt; 22(L)</b>	130(32.2)	106(39.7)			130(32.2)	53(43.8)		
<b>GGC<sub>x</sub> &lt; 17 (S)</b>	323(79.0)	198(73.9)	1.27 (0.85-1.88)	0.241	323(79.0)	86(74.1)	1.31 (0.78-2.20)	0.310
<b>GGC<sub>x</sub> ≥ 17 (L)</b>	86(21.0)	70(26.1)			86(21.0)	30(25.9)		
<b>TTTA<sub>x</sub> ≤ 7(S)</b>	144(35.3)	81(29.0)	1.30 (0.91-1.85)	0.145	144(35.3)	31(25.0)	1.60 (0.99-2.59)	0.055
<b>TTTA<sub>x</sub> &gt; 7(L)</b>	264(64.7)	198(71.0)			264(64.7)	93(75.0)		

Análisis ajustados por edad, edad de menarquia, historia familiar de cáncer de mama y condición de fumador.

\*Incluidos únicamente casos diagnosticados en los últimos 3 años.

#### II.4.5- COMBINACIONES DE LOS MICROSATÉLITES (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> Y (TTTA)<sub>n</sub> Y CÁNCER DE MAMA

Para tratar de averiguar si la consideración conjunta del tamaño de estos microsatélites era un mejor predictor del riesgo de padecer cáncer de mama que cada uno de ellos considerado de manera independiente, se crearon cuatro categorías atendiendo a la longitud de (CAG)<sub>x</sub>, (GGC)<sub>x</sub> y (TTTA)<sub>x</sub>, según se recoge a continuación:

**1° Categoría : alelos medios cortos para los tres microsatélites**

$$CAG_x \leq 22(S), GGC_x < 17(S), TTTA_x \leq 7(S)$$
**2° Categoría: alelos medios cortos para dos de los microsatélites y largo para uno de ellos**

$$CAG_x \leq 22(S), GGC_x < 17(S), TTTA_x > 7(L)$$

$$CAG_x \leq 22(S), GGC_x \geq 17(L), TTTA_x \leq 7(S)$$

$$CAG_x > 22(L), GGC_x < 17(S), TTTA_x \leq 7(S)$$
**3° Categoría: alelos medios largos para dos de los microsatélites y corto para uno de ellos**

$$CAG_x > 22(L), GGC_x \geq 17(L), TTTA_x \leq 7(S)$$

$$CAG_x > 22(L), GGC_x < 17(S), TTTA_x > 7(L)$$

$$CAG_x \leq 22(S), GGC_x \geq 17(L), TTTA_x > 7(L)$$
**4° Categoría: alelos medios largos para los tres microsatélites**

$$CAG_x > 22(L), GGC_x \geq 17(L), TTTA_x > 7(L)$$

Al comparar la proporción de casos y controles incluidos en las distintas categorías, se observó una mayor proporción de casos con alelos medios largos para dos o tres de los microsatélites (categorías 3° y 4°). Estas diferencias resultaron ser significativas tanto para el total de pacientes ( $p=0.018$ ) como para aquellas diagnosticadas en los últimos tres años ( $p=0.015$ ) (Tabla II.8).

También se realizó un análisis de regresión logística binaria multivariado tomando la condición de padecer o haber padecido cáncer de mama como variable dependiente, y la longitud de ( $CAG_x$ ), ( $GGC_x$ ), ( $TTTA_x$ ) categorizada de la forma anteriormente descrita, como variables independientes. En el análisis también se incluyeron como variables independientes la edad, la edad de menarquia, la historia familiar de cáncer de mama y la condición de fumador.

Los resultados de este análisis mostraron que las mujeres portadoras de alelos medios largos para dos o tres de estos microsatélites tenían un mayor riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas portadoras de alelos medios cortos para los tres ( $OR=2.89$ ;  $CI_{95\%}=1.28-6.53$ ;  $p=0.011$ ), ( $OR=1,73$  ;  $CI_{95\%}=1.01-3.0$ ;  $p=0.05$ ).

Cuando el análisis se restringió a las pacientes con un diagnóstico más reciente ( $\leq 3$  años) se pudo observar un incremento del riesgo a medida que aumentaba el número de microsatélites con alelos medios largos (Tabla II.9).

**Tabla II.8 Análisis bivariado que muestra la asociación entre cáncer de mama y las combinaciones de los alelos medios CAG<sub>x</sub>, GGC<sub>x</sub> y TTTA<sub>x</sub>**

Categorías CAG <sub>x</sub> / GGC <sub>x</sub> /TTTA <sub>x</sub>	Controles	Casos	P	Controles	Casos $\leq 3$ años *	P
	n/%	n/%		n/%	n/%	
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (S)	74(19)	31(12.8)	0.018	74(19)	11(10.4)	0.015
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (L)	189 (48.5)	111(45.7)		189 (48.5)	47(44.3)	
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (L), TTTA <sub>x</sub> (S)				110 (28.2)	79(32.5)	
CAG <sub>x</sub> (L), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (S)						
CAG <sub>x</sub> (L), GGC <sub>x</sub> (L), TTTA <sub>x</sub> (S)	17 (4.4)	22 (9.1)		110 (28.2)	37(34.9)	
CAG <sub>x</sub> (L), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (L)				17 (4.4)	11 (10.4)	
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (L), TTTA <sub>x</sub> (L)						

**Tabla II. 9 Análisis multivariado de regresión logística entre las combinaciones de CAGx, GGCx, TTTAx y el cáncer de mama**

Categorías CAG <sub>x</sub> /GGN <sub>x</sub> /TTTA <sub>x</sub>	Controles	Casos	OR (95% CI)	P	Controles	Casos ≤3 años *	OR (95% CI)	P
	n/%	n/%			n/%	n/%		
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (S)	72(18.9)	31(12.9)	Referencia		72(18.9)	11(10.4)	Referencia	
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (L)	184 (48.3)	109(45.4)	1.49 (0.89–2.49)	0.131	184 (48.3)	47(44.3)	2.22 (1.04–4.75)	0.040
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (L), TTTA <sub>x</sub> (S)								
CAG <sub>x</sub> (L), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (S)								
CAG <sub>x</sub> (L), GGC <sub>x</sub> (L), TTTA <sub>x</sub> (S)	108 (28.3)	79(32.9)	1.73(1.01–3.00)	0.050	108 (28.3)	37(34.9)	2.59(1.18–5.69)	0.018
CAG <sub>x</sub> (L), GGC <sub>x</sub> (S), TTTA <sub>x</sub> (L)								
CAG <sub>x</sub> (S), GGC <sub>x</sub> (L), TTTA <sub>x</sub> (L)								
CAG <sub>x</sub> (L), GGN <sub>x</sub> (L), TTTA <sub>x</sub> (L)	17 (4.5)	21 (8.8)	2.89 (1.28–6.53)	0.011	17 (4.5)	11 (10.4)	5.24 (1.79–15.35)	0.003

Análisis ajustado por edad, edad de menarquia, historia familiar de cáncer de mama y condición de fumador.

\* Incluidos únicamente casos diagnosticados en los últimos 3 años.



## II.5- DISCUSIÓN

Las distribuciones alélicas observadas para los microsatélites  $(CAG)_n$ ,  $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  en el grupo de mujeres participantes en este estudio se asemejan a las de otras poblaciones caucásicas analizadas.<sup>66,97,98</sup>

Los resultados de este estudio muestran una asociación entre la longitud del microsatélite  $(CAG)_n$  del gen del *AR* y el cáncer de mama. Las mujeres portadoras de alelos medios largos para este microsatélite ( $CAG_x > 22$  repeticiones), parecen tener mayor riesgo de padecer esta enfermedad que las que poseen alelos medios cortos ( $CAG_x \leq 22$  repeticiones).

Estas observaciones están en consonancia con los resultados de otros trabajos que también encuentran un mayor riesgo entre las portadoras de alelos largos para  $(CAG)_n$ . En un estudio realizado en población filipina Liede y cols.<sup>60</sup> observaron que las mujeres con una media entre ambos alelos menor de 25 repeticiones tenían aproximadamente la mitad de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas con una media superior. En un grupo de mujeres caucásicas Guiguere y cols.<sup>61</sup>, también hallaron que el riesgo se reducía a la mitad cuando la suma de la longitud de ambos alelos era menor o igual a 39 repeticiones.

Otros autores también han observado un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama entre las mujeres portadoras de alelos largos con historia familiar de esta enfermedad en primer grado,<sup>63,99</sup> en portadoras de mutaciones en los genes *BRCA1/2*<sup>62</sup> e incluso en varones con cáncer de mama.<sup>100</sup>

Contrariamente a lo hallado en estos trabajos, Iobagiu y cols.<sup>64</sup> hallaron mayor riesgo de padecer esta enfermedad en mujeres con uno o dos alelos cortos para  $(CAG)_n$ . Asimismo, diversos estudios no han encontrado asociación entre la longitud de este polimorfismo y el cáncer de mama.<sup>65,66,68</sup>

En este estudio no hemos encontrado asociación entre ninguno de los alelos del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub>, y el cáncer de mama. Sin embargo hemos podido observar que aquellas mujeres con una media de ambos alelos mayor de 7 repeticiones (TTTA<sub>x</sub> > 7) parecen tener mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama que aquellas con alelos medios más cortos.

Existen trabajos previos que describen asociaciones entre casi todos los alelos conocidos de este microsatélite y el cáncer de mama, pero de todos ellos el alelo de diez repeticiones (TTTA)<sub>10</sub> es el que en más ocasiones ha mostrado asociación. Entre estos estudios se encuentran los realizados por Ribeiro y cols.<sup>91</sup> en mujeres brasileñas, Iyoshi y cols.<sup>79</sup> en japonesas o los de Haiman y cols.<sup>87</sup> y Baxter y cols.<sup>101</sup> En esta misma línea Okobia y cols.<sup>92</sup> observaron que mujeres Nigerianas portadoras de uno o más alelos mayores o iguales a 10 repeticiones mostraban un incremento en el riesgo de padecer la enfermedad. También se han descrito asociaciones con los alelos (TTTA)<sub>7</sub>,<sup>86</sup> (TTTA)<sub>11</sub><sup>88</sup> y (TTTA)<sub>12</sub><sup>89</sup>. Otros trabajos, en cambio, no hallan ninguna asociación entre la longitud del microsatélite y la enfermedad.<sup>102</sup>

Aunque la variedad de resultados impide llegar a alguna conclusión clara sobre la posible asociación del microsatélite con la enfermedad, cabe destacar que la mayoría de los estudios coinciden en señalar como alelos de riesgo aquellos con un alto número de repeticiones (10, >=10, 11 y 12); hecho que guarda cierta concordancia con nuestros resultados.

En cuanto al microsatélite (GGC)<sub>n</sub>, no hemos observado asociación entre la longitud del mismo y el cáncer de mama. Tampoco la hallaron en sus trabajos Kadouri<sup>67</sup> y cols. y Dunning y cols.<sup>66</sup>. Sin embargo, Sutter y cols.<sup>69</sup> en un estudio realizado en mujeres con diagnóstico de cáncer de mama antes de los 45 años, observaron que aquellas mujeres con un alelo largo o cuya suma de ambos era mayor o igual a 33 repeticiones, tenían un menor riesgo de padecer la enfermedad que las portadoras de alelos más cortos.

A la vista de los trabajos anteriormente mencionados parece que únicamente para el microsatélite (CAG)<sub>n</sub> hay cierta coincidencia a la hora de asignar un mayor riesgo de esta enfermedad a las mujeres portadoras de alelos largos. Por el contrario,

los trabajos realizados para los microsatélites (TTTA)<sub>n</sub> y (GGC) muestran resultados contradictorios o son insuficientes. Por lo tanto, la asociación observada entre la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> y el cáncer de mama, parece ser la más plausible de las descritas.

Cuando consideramos conjuntamente el tamaño de los tres microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub>, observamos que aquellas mujeres portadoras de las combinaciones más largas (alelos medios largos para los tres microsatélites) presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama que aquellas con la combinación más corta (alelos medios cortos para los tres microsatélites). También las portadoras de alelos medios largos para dos de los microsatélites presentan un mayor riesgo de padecer esta enfermedad, aunque inferior a aquellas con alelos medios largos para los tres microsatélites. De manera general podríamos decir que el riesgo de padecer cáncer de mama parece incrementarse a medida que aumenta el número de microsatélites con alelos medios largos.

Los resultados de los estudios funcionales señalan que largas repeticiones (CAG)<sub>n</sub> o (GGC)<sub>n</sub> podrían reducir la actividad transactivadora del receptor y/o la cantidad de proteína AR. Al mismo tiempo diversos estudios señalan la existencia de una relación inversa entre el número de repeticiones del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> y la concentración de andrógenos en suero.<sup>40,41</sup>

En cuanto al microsatélite (TTTA)<sub>n</sub>, se ha podido observar una mayor actividad aromatasa en los fibroblastos de aquellos varones con un alto número de repeticiones.<sup>81</sup> Varios trabajos describen también asociaciones entre distintos alelos del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> y las concentraciones de determinadas hormonas esteroideas.<sup>78-80</sup>

Atendiendo a los resultados estos trabajos, las mujeres portadoras de alelos largos para estos microsatélites podrían ver mermada su actividad androgénica por reunir alguna o algunas las siguientes características: un receptor de andrógenos con menor capacidad de transactivación, menores niveles de proteína AR, mayor actividad aromatasa o menores concentraciones de andrógenos.



Los trabajos publicados en líneas celulares de cáncer de mama asignan a los andrógenos un papel protector en el cáncer de mama, y respaldan la hipótesis de que los andrógenos podrían actuar contrarrestando el efecto mitogénico y promotor de los estrógenos sobre el tejido mamario.<sup>8-10</sup> Por tanto, la disminución de la actividad androgénica mediada por el AR, junto con una mayor actividad aromatasa podrían explicar, al menos en parte, el aumento del riesgo de cáncer de mama observado entre las mujeres portadoras de alelos largos para estos microsatélites.

Interesantemente estos resultados pueden contrastarse con los de otros estudios realizados en cáncer de próstata. En estos trabajos se observa que alelos cortos para los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (GGC)<sub>n</sub> incrementan el riesgo de padecer cáncer de próstata.<sup>136-138</sup> Estos resultados parecen ser justamente los contrarios a los observados para el cáncer de mama. Según los estudios anteriormente mencionados, alelos cortos para estos microsatélites se traducirían en un receptor de andrógenos más abundante y activo, condiciones que podrían favorecer el desarrollo de esta enfermedad.

En resumen: los resultados de este estudio indican que alelos medios con un alto número de repeticiones para los microsatélites polimórficos (CAG)<sub>n</sub> y (GGC)<sub>n</sub> del gen *AR* y (TTTA)<sub>n</sub> de *CYP19* podrían conferir cierta susceptibilidad a padecer cáncer de mama, y apoyan la hipótesis de que los andrógenos podrían jugar un papel protector en el desarrollo del cáncer de mama.



## II.6- BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz Chico BN. Bioquímica básica de las hormonas esteroideas: Biología y clínica del cáncer. Biocáncer 2004; 2. [www.biocancer.com](http://www.biocancer.com).
2. Amado JA y Flórez J (2003). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. *Farmacología humana* (887-912), Barcelona: Masson.
3. Burtis CA, Ashwood ER (1999). Reproductive endocrine function. *Tietz textbook of clinical chemistry* (1601-1613): Amazon.
4. Burger HG. Androgen production in women. *Fertil Steril*. 2002; 77 Suppl 4: S3-5.
5. Burger HG, Dudley EC, Cui J, Dennerstein L, Hopper JL. A prospective longitudinal study of serum testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and sex hormone-binding globulin levels through the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85 (8): 2832-8.
6. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl JMed* 2001; 344(4): 276 – 85.
7. Travis RC, Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res* 2003; 5(5): 239-47.
8. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Belanger A, Simard J, Lin SX, Pelletier G. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocr Rev* 2003; 24: 152-18.
9. Zhou J, Ng S, Adesanya-Famuyiwa O, Anderson K, Bondy CA Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB J* 2000; 14: 1725-30.
10. Dimitrakakis C, Zhou J, Bondy CA Androgens and mammary growth and neoplasia. *Fertil Steril* 2002; 77: S26-S33.

11. Boccuzzi G, Brignardello E, Di Monaco M, Gatto V, Leonardi L, Pizzini A, Gallo M. 5-En-androstene-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells when oestrogen receptors are blocked by oestradiol. *Br J Cancer* 1994; 70: 1035-9.
12. Birrell SN, Bentel JM, Hickey TE, Ricciardelli C, Weger MA, Horsfall DJ, Tilley WD. Androgens induce divergent proliferative responses in human breast cancer cell lines. *J Steroid BiochemMol Biol* 1995; 52: 459-67.
13. Li S, Yan X, Belanger A, Labrie F. Prevention by dehydroepiandrosterone of the development of mammary carcinoma induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 203-17.
14. McCormick DL, Rao KV, Johnson WD, Bowman-Gram TA, Steele VE, Lubet RA, Kelloff GJ. Exceptional chemopreventive activity of low-dose DHEP in the rat mammary gland. *Cancer Res* 1996; 56(8): 1724-6.
15. Gatto V, Aragno M, Gallo M, Tamagno E, Martini A, Di Monaco M, Brignardello E, Boccuzzi G. Dehydroepiandrosterone inhibits the growth of DMBA-induced rat mammary carcinoma via the androgen receptor. *Oncol Rep* 1998; 5(1): 241-3.
16. Dauvois S, Li SM, Martel C, Labrie F. Inhibitory effect of androgens on DMBA-induced mammary carcinoma in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 1989; 14(3): 299-306.
17. Dauvois S, Geng CS, Levesque C, Merand Y, Labrie F. Additive inhibitory effects of an androgen and the antiestrogen EM-170 on estradiol-stimulated growth of human ZR-75-1 breast tumors in athymic mice. *Cancer Res* 1991; 51(12): 3131-5.
18. Tormey DC, Lippman ME, Edwards BK, Cassidy JG. Evaluation of tamoxifen doses with and without fluoxymesterone in advanced breast cancer. *Ann Intern Med* 1983; 98(2):139-44.
19. Kennedy BJ. Fluoxymesterone therapy in treatment of advanced breast cancer. *N Engl J Med* 1958; 259: 673-5.
20. Secreto G, Toniolo P, Pisani P, Recchione C, Cavalleri A, Fariselli G, Totis A, Di Pietro S, Berrino F. Androgens and breast cancer in premenopausal women. *Cancer Res* 1989, 49: 471-6.

21. Kaaks R, Berrino F, Key T, Rinaldi S, Dossus L, Biessy C, Secreto G, Amiano P, Bingham S, Boeing H, Bueno de Mesquita HB, Chang-Claude J, Clavel-Chapelon F, Fournier A, van Gils CH, Gonzalez CA, Gurrea AB, Critselis E, Khaw KT, Krogh V, Lahmann PH, Nagel G, Olsen A, Onland-Moret NC, Overvad K, Palli D, Panico S, Peeters P, Quirós JR, Roddam A, Thiebaut A, Tjønneland A, Chirlaque MD, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tumino R, Vineis P, Norat T, Ferrari P, Slimani N, Riboli E. Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 2005; 18; 97(10): 755-65.
22. Yu H, Shu XO, Shi R, Dai Q, Jin F, Gao YT, Li BD, Zheng W. Plasma sex steroid hormones and breast cancer risk in Chinese women. *Int J Cancer* 2003; 105(1): 92-7.
23. Kaaks R, Rinaldi S, Key TJ, Berrino F, Peeters PH, Biessy C, Dossus L, Lukanova A, Bingham S, Khaw KT, Allen NE, Bueno-de-Mesquita HB, van Gils CH, Grobbee D, Boeing H, Lahmann PH, Nagel G, Chang-Claude J, Clavel-Chapelon F, Fournier A, Thiébaud A, González CA, Quirós JR, Tormo MJ, Ardanaz E, Amiano P, Krogh V, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Trichopoulou A, Kalapothaki V, Trichopoulos D, Ferrari P, Norat T, Saracci R, Riboli E. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12(4):1071-82.
24. Baglietto L, Severi G, English DR, Krishnan K, Hopper JL, McLean C, Morris HA, Tilley WD, Giles GG. Circulating Steroid Hormone Levels and Risk of Breast Cancer for Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(2): 492-502.
25. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1987; 8 (1): 1-28.
26. Pratt WB, Toft D. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997 Jun; 18(3): 306-60.
27. Kuenen-Boumeester V, Van der Kwast TH, van Putten WL, Claassen C, van Ooijen B, Henzen-Logmans SC. Immunohistochemical determination of androgen

- receptors in relation to oestrogen and progesterone receptors in female breast cancer. *Int J Cancer* 1992; 52(4): 581-4.
28. Agoff SN, Swanson PE, Linden H, Hawes SE, Lawton TJ. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol* 2003; 120(5):725-31.
29. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109(1): 25-32.
30. Kuenen-Boumeester V, Van der Kwast TH, Claassen CC, Look MP, Liem GS, Klijn JG, Henzen-Logmans SC. The clinical significance of androgen receptors in breast cancer and their relation to histological and cell biological parameters. *Eur J Cancer* 1996; 32(9):1560-5.
31. Dehm SM, Tindall DJ. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Molecular Endocrinology* 21(12): 2855-63.
32. Esteban E, Rodon N, Via M, Gonzalez-Perez E, Santamaria J, Dugoujon JM, Chennawi FE, Melhaoui M, Cherkaoui M, Vona G, Harich N, Moral P. Androgen receptor CAG and GGC polymorphisms in Mediterraneans: repeat dynamics and population relationships. *J Hum Genet* 2006; 51(2): 129-36.
33. Gilbert SM, Benson MC, McKiernan JM. Linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in the African-American population. *Curr Urol Rep* 2002; 3(3): 189-93.
34. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991; 352(6330):77-9.
35. La Spada AR, Roling DB, Harding AE, Warner CL, Spiegel R, Hausmanowa-Petrusewicz I, Yee WC, Fischbeck KH. Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet* 1992; 2(4): 301-4.

36. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(15): 3181-6.
37. Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)<sub>n</sub>-expanded neuropathies. *Hum Mol Genet* 1995; 4(4): 523-7.
38. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *Prostate* 2004; 58(1): 23-32.
39. Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(1): 85-96.
40. Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, Hellstrand M, Landén M, Jansson M, Holm G, Björntorp P, Eriksson E. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6): 2562-8.
41. Brum IS, Spritzer PM, Paris F, Maturana MA, Audran F, Sultan C. Association between androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and plasma testosterone levels in postmenopausal women. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12(2): 135-41.
42. Alevizaki M, Cimponeriu AT, Garofallaki M et al. The androgen receptor gene CAG polymorphism is associated with the severity of coronary artery disease in men. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003; 59(6): 749-55.
43. Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA et al. Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol* 2005; 98(1): 132-7.
44. Aschim EL, Nordenskjöld A, Giwercman A, Lundin KB, Ruhayel Y, Haugen TB, Grotmol T, Giwercman YL. Linkage between cryptorchidism, hypospadias, and GGN repeat length in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5105-9.

45. Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ. Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 59(1): 9-20.
46. Lundin KB, Giwercman A, Dizeyi N, Giwercman YL. Functional in vitro characterisation of the androgen receptor GGN polymorphism. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 264(1-2): 184-7.
47. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 2005; 62(2):133-9.
48. Zeegers MP, Kiemeneij LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13 (11 Pt 1): 1765-71.
49. McGrath M, Lee IM, Hankinson SE, Kraft P, Hunter DJ, Buring J, De Vivo I. Androgen receptor polymorphisms and endometrial cancer risk. *Int J Cancer* 2006; 118(5): 1261-8.
50. Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, et al. Alleles with short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *Int J Cancer* 2006; 118(6):1420-5.
51. Terry KL, De Vivo I, Titus-Ernstoff L, Shih MC, Cramer DW. Androgen receptor cytosine, adenine, guanine repeats, and haplotypes in relation to ovarian cancer risk. *Cancer Res* 2005; 65(13): 5974-81.
52. Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, et al. Associations between ERalpha, ERbeta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(12): 2936-42.
53. Dietzsch E, Laubscher R, Parker MI. Esophageal cancer risk in relation to GGC and CAG trinucleotide repeat lengths in the androgen receptor gene. *Int J Cancer* 2003; 107(1): 38-45.
54. Lillie EO, Bernstein L, Ursin G. The role of androgens and polymorphisms in the androgen receptor in the epidemiology of BC. *BC Res* 2003; 5(3): 164-73.

55. Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J. Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Hum Genet* 2002; 110(2): 122-9.
56. Forrest MS, Edwards SM, Houlston R, Kote-Jarai Z, Key T, Allen N, Knowles MA, Turner F, Ardern-Jones A, Murkin A, Williams S, Oram R, Bishop DT, Eeles RA; CR-UK/BPG UK prostate cancer study collaborators. Association between hormonal genetic polymorphisms and early-onset prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005; 8(1): 95-102.
57. Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Benichou J, Chang C. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Res.* 2000 Sep 15;60(18):5111-6.
58. Lange EM, Sarma AV, Ray A, Wang Y, Ho LA, Anderson SA, Cunningham JM, Cooney KA. The androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and prostate cancer susceptibility in African-American men: results from the Flint Men's Health Study. *Flint J Hum Genet* 2008; 53(3): 220-6.
59. Silva Neto B, Koff WJ, Biolchi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, Brum IS. Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest.* 2008; 26(1): 74-80.
60. Liede A, Zhang W, De Leon Matsuda ML, Tan A, Narod SA. Androgen receptor gene polymorphism and BC susceptibility 507 in The Philippines. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(9): 848-52.
61. Giguère Y, Dewailly E, Brisson J, Ayotte P, Laflamme N, Demers A, Forest VI, Dodin S, Robert J, Rousseau F. Short polyglutamine tracts in the androgen receptor are protective against breast cancer in the general population. *Cancer Res* 2001; 61(15): 5869-74.
62. Rebbeck TR, Kantoff PW, Krithivas K, Neuhausen S, Blackwood MA, Godwin AK, Daly MB, Narod SA, Garber JE, Lynch HT, Weber BL, Brown M. Modification of



- BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am J Hum Genet* 1999 May;64(5):1371-7.
63. Haiman CA, Brown M, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Willett WC, Kantoff PW, Hunter DJ. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and risk of breast cancer in the Nurses' Health Study. *Cancer Res.* 2002; 62(4): 1045-9.
64. Iobagiu C, Lambert C, Normand M, Genin C. Microsatellite profile in hormonal receptor genes associated with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 95(2):153-9.
65. Spurdle AB, Dite GS, Chen X, Mayne CJ, Southey MC, Batten LE, Chy H, Trute L, McCredie MR, Giles GG, Armes J, Venter DJ, Hopper JL, Chenevi. X-Trench G Androgen receptor exon 1 CAG repeat length and breast cancer in women before age forty years. *J Natl Cancer Inst* 1999 2; 91(11): 961-6.
66. Dunning AM, McBride S, Gregory J, Durocher F, Foster NA, Healey CS, Smith N, Pharoah PD, Luben RN, Easton DF, Ponder BA. No association between androgen or vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 1999 Nov; 20(11): 2131-5.
67. Kadouri L, Easton DF, Edwards S, Hubert A, Kote-Jarai Z, Glaser B, Durocher F, Abeliovich D, Peretz T, Eeles RA. CAG and GGC repeat polymorphisms in the androgen receptor gene and breast cancer susceptibility in BRCA1/2 carriers and non-carriers. *Br J Cancer.* 2001 Jul 6;85(1):36-40.
68. Menin C, Banna GL, De Salvo G, Lazzarotto V, De Nicolo A, Agata S, Montagna M, Sordi G, Nicoletto O, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E. Lack of association between androgen receptor CAG polymorphism and familial breast/ovarian cancer. *Cancer Lett* 2001; 168(1): 31-6.
69. Suter NM, Malone KE, Daling JR, Doody DR, Ostrander EA. Androgen receptor (CAG)<sub>n</sub> and (GGC)<sub>n</sub> polymorphisms and breast cancer risk in a population-based case-control study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Feb;12(2): 127-35.
70. Spurdle AB, Antoniou AC, Duffy DL, Pandeya N, Kelemen L, Chen X, Peock S, Cook MR, Smith PL, Purdie DM, Newman B, Dite GS, Apicella C, Southey MC,

- Giles GG, Hopper JL, Chenevix-Trench G, Easton DF; EMBRACE Study Collaborators. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and modification of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res* 2005; 7(2): R176-83.
71. Carpenter R, Miller WR. Role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 93(S1): S1-S5.
72. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(24): 2431-42.
73. Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev* 2005; 26(3): 331-45.
74. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86(3-5): 219-24.
75. Simpson ER, Michael MD, Agarwal VR, Hinshelwood MM, Bulun SE, Zhao Y. Cytochromes P450 11: expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB J* 1997; 11(1): 29-36.
76. Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human aromatase cytochrome P-450 gene (CYP19). *Nucleic Acids Res* 1991; 19(1): 195.
77. Kurosaki K, Saitoh H, Oota H, Watanabe Y, Kiuchi M, Ueda S. Combined polymorphism associated with a 3-bp deletion in the 5'-flanking region of a tetrameric short tandem repeat at the CYP19 locus. *Nippon Hoigaku Zasshi* 1997, 51(3): 191-95.
78. Tworoger SS, Chubak J, Aiello EJ, Ulrich CM, Atkinson C, Potter JD, Yasui Y, Stapleton PL, Lampe JW, Farin FM, Stanczyk FZ, McTiernan A. Association of CYP17, CYP19, CYP1B1, and COMT polymorphisms with serum and urinary sex hormone concentrations in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004 Jan; 13(1): 94-101.

79. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, De Vivo I, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Hunter DJ. A tetranucleotide repeat polymorphism in CYP19 and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2000; 87(2): 204-10.
80. Berstein LM, Imyanitov EN, Suspitsin EN, Grigoriev MY, Sokolov EP, Togo A, Hanson KP, Poroshina TE, Vasiljev DA, Kovalevskij AY, Gamajunova VB. CYP19 gene polymorphism in endometrial cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001; 127(2): 135-8.
81. Gennari L, Masi L, Merlotti D, Picariello L, Falchetti A, Tanini A, Mavilia C, Del Monte F, Gonnelli S, Lucani B, Gennari C, Brandi ML. A polymorphic CYP19 TTTA repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6): 2803-10.
82. Probst-Hensch NM, Ingles SA, Diep AT, Haile RW, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE. Aromatase and breast cancer susceptibility. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6(2): 165-73.
83. Travis RC, Churchman M, Edwards SA, Smith G, Verkasalo PK, Wolf CR, Wolf H, Key TJ . No Association of Polymorphisms in CYP17, CYP19, and HSD17-B1 with Plasma Estradiol Concentrations in 1,090 British Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Dec; 13(12): 2282-4.
84. Miyoshi Y, Ando A, Hasegawa S, Ishitobi M, Yamamura J, Irahara N, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of genetic polymorphisms in CYP19 and CYP1A1 with the oestrogen receptor-positive breast cancer risk. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2531-7.
85. Miyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, Egawa C, Noguchi S. Breast cancer risk associated with polymorphism in CYP19 in Japanese women. *Int J Cancer* 2000; 89(4): 325-8.
86. Siegelmann-Danieli N, Buetow KH. Constitutional genetic variation at the human aromatase gene (Cyp19) and breast cancer risk. *Br J Cancer* 1999; 79(3-4): 456-63.
87. Baxter SW, Choong DY, Eccles DM, Campbell IG. Polymorphic variation in CYP19 and the risk of breast cancer. *Carcinogenesis* 2001; 22: 347-9.

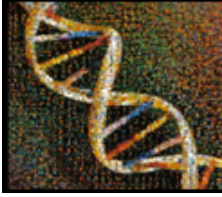
88. Ahsan H, Whittemore AS, Chen Y, Senie RT, Hamilton SP, Wang Q, Gurvich I, Santella RM. Variants in estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 and breast cancer risk: a family-based genetic association study. *Breast Cancer Res* 2005; 7(1): R71-81.
89. Kristensen VN, Andersen TI, Lindblom A, Erikstein B, Magnus P, Borresen-Dale AL. A rare CYP19 (aromatase) variant may increase the risk of breast cancer. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 43-8.
90. Han DF, Zhou X, Hu MB, Xie W, Mao ZF, Chen DE, Liu F, Zheng F. Polymorphisms of estrogen-metabolizing genes and breast cancer risk: a multigenic study. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118(18): 1507-16.
91. Ribeiro FS, de Amorim LM, de Almeida Simao T, Mendonca GA, de Moura Gallo CV, Pinto LF. CYP19 (TTTA)<sub>n</sub> polymorphism and breast cancer risk in Brazilian women. *Toxicol Lett* 2006 20; 164(1): 90-5.
92. Okobia MN, Bunker CH, Zmuda JM, Ezeome ER, Anyanwu SN, Uche EE, Ojukwu J, Kuller LH, Ferrell RE. Simple tandem repeat (TTTA)<sub>n</sub> polymorphism in CYP19 (aromatase) gene and breast cancer risk in Nigerian women. *J Carcinog* 2006; 5: 12.
93. Antonio Cabrera de León, M<sup>a</sup> del Cristo Rodríguez Pérez, Delia Almeida González, Santiago Domínguez Coello, Armando Aguirre Jaime, Buenaventura Brito Díaz, Ana González Hernández, Lina I. Pérez Méndez y el grupo CDC. Presentación de la cohorte "CDC de Canarias": objetivos, diseño y resultados preliminares. *Rev Esp Salud Publica* 2008; 82(5):519-34.
94. Sleddens HF, Oostra BA, Brinkmann AO, Trapman J. Trinucleotide (GGN) repeat polymorphism in the human androgen receptor (AR) gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2(4): 493.
95. Bharaj BS, Vassilikos EJ, Diamandis EP. Rapid and accurate determination of (CAG)<sub>n</sub> repeats in the androgen receptor gene using polymerase chain reaction and automated fragment analysis. *Clin Biochem* 1999; 32(5): 327-32.
96. Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Honjo H. Association of the CYP17 gene

- and CYP19 gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod* 2002 ; 17(4) : 897-902.
97. Kittles RA, Young D, Weinrich S, Hudson J, Argyropoulos G, Ukoli F, Adams-Campbell L, Dunston GM. Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Hum Genet* 2001; 109(3): 253-61.
98. Sasaki M, Kaneuchi M, Sakuragi N, Fujimoto S, Carroll PR, Dahiya R. The polyglycine and polyglutamine repeats in the androgen receptor gene in Japanese and Caucasian populations. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1244-7.
99. Wang W, John EM, Ingles SA. Androgen receptor and prostate specific antigen gene polymorphisms and BC in African-American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(12): 2990-4.
100. MacLean HE, Brown RW, Beilin J, Warne GL, Zajac JD. Increased frequency of long androgen receptor CAG repeats in male breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88(3): 239-46.
101. Iyoshi Y, Iwao K, Ikeda N, Egawa C, Noguchi S. Breast cancer risk associated with polymorphism in CYP19 in Japanese women. *Int J Cancer* 2000; 89(4): 325-8.
102. Kim JY, Lee CS, Kim HO, Jo YH, Lee J, Jung MH, Baik HH, Choe W, Kang I, Yoon KS. The association between genetic polymorphisms in CYP19 and breast cancer risk in Korean women. *Oncol Rep* 2009; 22(3): 487-92.



### **CAPÍTULO III**

**MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS EN LOS GENES *E2F4*, *EGFR* Y *NOTCH4*, Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA**



## III.1- INTRODUCCIÓN

### III.1.1- MICROSATÉLITES Y CÁNCER DE MAMA

Una gran parte del riesgo de padecer cáncer de mama esporádico es atribuible a variantes genéticas de baja penetrancia presentes en genes relacionados con la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN, el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas, etc. Entre las variantes más estudiadas se encuentran los SNPs y los microsatélites polimórficos.

Con respecto a estos últimos, estudios realizados sobre bases de datos de secuencias de proteínas humanas indican que aproximadamente el 20% de ellas contiene, al menos, un tracto repetitivo compuesto por cuatro o más residuos de un mismo aminoácido.<sup>1</sup> Muchos de estos tractos repetitivos están codificados por microsatélites, y las proteínas humanas que los presentan se encuentran frecuentemente relacionadas con la regulación transcripcional, la señalización celular, el desarrollo, y la actividad del sistema nervioso. Asimismo, un número considerable de estas proteínas están implicadas en enfermedades neurológicas, leucemias y varios tipos de cánceres.

Los microsatélites son secuencias particularmente susceptibles a sufrir errores durante la replicación. Las alteraciones somáticas de los mismos por aumento o disminución del número de repeticiones se conoce como inestabilidad de microsatélites (MSI+).<sup>2</sup> Este fenómeno se presenta de manera frecuente en diversos tipos de cáncer como el de endometrio, colon, ovario, etc. La inestabilidad de microsatélites está estrechamente relacionada con mutaciones en el sistema de reparación de errores mismatch (MMR).<sup>3</sup>

Como vimos en el capítulo I, la variación en el número de repeticiones de un microsatélite puede afectar a la transcripción, la estabilidad del ARNm, al splicing o la estructura y/o función de una proteína. Es posible, por tanto, que variaciones en la longitud de ciertos microsatélites situados en genes que codifican para proteínas implicadas en cáncer, puedan contribuir a la aparición y el desarrollo de esta enfermedad.

Diversos estudios han relacionado las variaciones en la longitud de algunos microsatélites con la susceptibilidad a padecer ciertos tipos de cáncer. Entre los microsatélites relacionados con el cáncer de mama se encuentran los situados en los genes que codifican para el receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos alfa (ER- $\alpha$ ), o en enzimas relacionadas con el metabolismo de las hormonas esteroideas como la aromatasa (CYP19) y la enzima que corta la cadena lateral del colesterol (CYP11A). También han sido relacionados con esta enfermedad otros microsatélites, como los situados en el gen del factor insulínico tipo I (IGF-I), el coactivador del receptor estrogénico AIB1, el interferón gamma (IFNG), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de transcripción E2F4.<sup>4</sup>

### **III.1.2- EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN E2F4**

#### **III.1.2.1- Los factores de transcripción E2F**

La familia de factores de transcripción E2F juega un papel crucial en el control de la proliferación celular en mamíferos, ya que interviene en la progresión del ciclo celular, regulando la expresión de genes esenciales para este fin.<sup>5</sup>

En mamíferos se conocen hasta el momento ocho factores de transcripción E2F (E2F1-E2F8). Los factores de transcripción E2F1-E2F6 forman complejos heterodiméricos con otra familia de factores de transcripción denominada DP (DP1 y DP2). Por el contrario, E2F7 y E2F8, no forman complejos con las proteínas DP.<sup>5-7</sup>

Las regiones carboxi-terminales de las proteínas E2F1- E2F5 contienen un potente dominio de transactivación que no poseen los factores E2F6- E2F8 ni las proteínas DP.<sup>8</sup>



La actividad de los complejos E2F-DP está controlada por su interacción con otros componentes de la maquinaria del ciclo celular, como los miembros de la familia de la proteína supresora de tumores retinoblastoma RB1(pRb), PRB1(p107) y RBL2 (p130).<sup>9-11</sup> Cuando un complejo E2F-DP se une de manera estable a alguna de estas proteínas (conocidas como proteínas bolsillo) el complejo resultante actúa como un represor de la transcripción.

Las proteínas E2F muestran preferencia por ciertos miembros de la familia pRb.<sup>5,8</sup> Los factores E2F1, E2F2, y E2F3 se unen de manera casi exclusiva a pRb, mientras que E2F5 lo hace con p130. E2F4 es capaz de unirse con alta afinidad a p107 y p130, aunque también se puede asociar con pRb en algunos tipos celulares. E2F6, E2F7 y E2F8, en cambio, no interactúan con ninguna de las tres proteínas.

Otras proteínas que intervienen en el control de la actividad de los factores E2F son las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)<sup>5</sup>. Cuando una proteína bolsillo es fosforilada por una CDK, disminuye su afinidad por el correspondiente factor E2F y éste es liberado anulándose las propiedades represoras del complejo.

Los factores E2F regulan genes muy importantes implicados en el ciclo celular. Se han identificado sitios consenso para su unión en los promotores de muchos genes necesarios para la replicación del ADN, como el de la dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa1 (TK1), DNA polimerasa alfa (POLA) y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). También en los oncogenes c-myc (MYC), N-myc (MYCN), en genes que codifican componentes básicos del reloj del ciclo celular (CD2, ciclinas A y E) y en factores de crecimiento.<sup>5,8</sup>

Los estudios publicados asignan un papel dual a la familia de factores de transcripción E2F, ya que son capaces de mediar tanto la activación como la represión transcripcional de genes involucrados en el ciclo celular. Estos factores están implicados en procesos de proliferación celular y de apoptosis, atribuyéndoseles funciones tanto oncogénicas como supresoras de tumores.<sup>12,13</sup>

Aunque el papel preciso de cada factor E2F no es totalmente conocido, pueden clasificarse, de manera general, en tres subgrupos basándose en sus homologías funcionales y estructurales.<sup>5,14</sup>

El primero de estos subgrupos está constituido por los factores E2F1, E2F2 y E2F3, que actúan principalmente como activadores transcripcionales de genes implicados en la transición entre las fases G<sub>1</sub>/S. Son necesarios para la progresión del ciclo celular y se encuentran fuertemente regulados durante el mismo. El aumento de su expresión en las células parece inducir su entrada en fase S.<sup>15,16</sup>

El segundo subgrupo lo constituyen los factores E2F4 y E2F5, que ejercen como represores transcripcionales cuando se encuentran unidos a las proteínas bolsillo. El principal papel de ambos parece ser la inducción de la salida del ciclo celular, oponiéndose a la progresión y la diferenciación celular.<sup>17-19</sup>

El tercer subgrupo está compuesto por los factores E2F6, E2F7 y E2F8, que funcionan como represores transcripcionales, aunque lo hacen de manera independiente, sin unirse a proteínas bolsillo.<sup>20-24</sup>

### **III.1.2.2- Función del factor de transcripción E2F4**

E2F4 es el factor de transcripción de la familia E2F más abundante en la mayoría de las células, donde se expresa de manera constitutiva.<sup>25</sup> Está presente tanto en células quiescentes como durante el ciclo celular, formando complejos con las proteínas pRb, p107 y p130,<sup>26</sup> aunque se ha observado que p130 es la proteína que se une predominantemente a E2F4 y a los promotores regulados por factores E2F.<sup>27,28</sup>

Los resultados de diversos estudios sugieren que los complejos E2F4-proteína bolsillo podrían funcionar en las células como represores transcripcionales de ciertos genes en fases G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> tempranas. Ensayos de inmunoprecipitación han mostrado que estos complejos se asocian con los promotores de genes diana para factores E2F durante las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular, momento en el que dichos genes se encuentran reprimidos. Por el contrario se ha observado que su unión es casi nula en

las fases G1 y S (cuando su transcripción está inducida), y que E2F4 es reemplazado rápidamente por los activadores E2F1-E2F3 entre las fases media y tardía de G1.<sup>29,30</sup>

Durante las fases G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> E2F4 se localiza principalmente en el núcleo, pasando al citoplasma al entrar en fase S. Todo parecen indicar que la salida de E2F4 del núcleo contribuye a aliviar la represión transcripcional de los genes diana E2F durante la entrada en el ciclo celular.<sup>17,18</sup> Se ha comprobado que las células que carecen de los factores E2F4 y E2F5 tienen disminuida su habilidad para salir del ciclo celular en respuesta a una variedad de señales de arresto.<sup>19,31,32</sup>

Estudios más recientes han revelado que en el mantenimiento de las células en fase G<sub>0</sub> interviene un complejo multiproteico denominado DREAM. El complejo está formado, al menos, por ocho proteínas entre las que se encuentran, DP1/2, p130, RBBP4, LIN9, LIN37, LIN52, LIN54 y E2F4/5. DREAM es capaz de unirse a más de ochocientos promotores humanos en la fase G<sub>0</sub> y es necesario para la represión de genes diana para E2F.<sup>33</sup> En líneas celulares humanas se ha podido comprobar que el factor E2F4 dirige este complejo hacia sus genes diana.<sup>34</sup>

La permanencia de las células quiescentes en fase G<sub>0</sub> es crucial para el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos, ya que la inadecuada activación de los programas de ciclo celular contribuye al desarrollo del cáncer.

### **III.1.2.3- Papel de E2F4 en el cáncer de mama**

A pesar de la importancia que el factor E2F4 tiene en el control del ciclo celular, se conoce muy poco acerca de su papel en el cáncer de mama. Una de las alteraciones más frecuentes encontradas en el carcinoma lobular invasivo de mama y no lobular de bajo grado, es la pérdida de material cromosómico localizado en la banda (16q22.1). Este hecho parece indicar la presencia de un gen supresor de tumores para este tipo de carcinomas en esta localización. Entre los genes candidatos situado en esta banda, se encuentra el factor E2F4.

En un estudio realizado por Ho y cols.<sup>35</sup> los autores observaron una disminución de la expresión de E2F4 en el 70% de los tejidos de carcinoma de mama

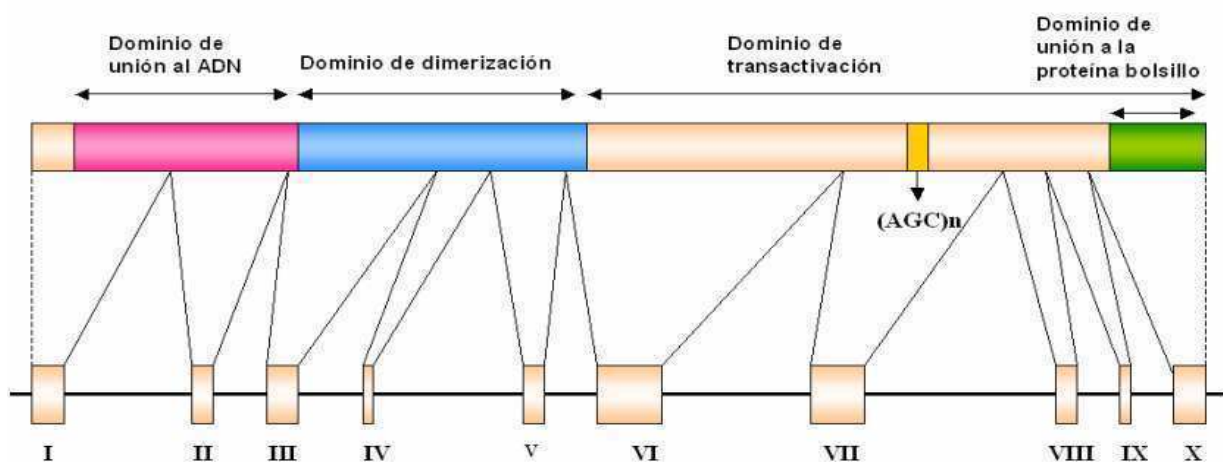
primario y en el 100% de los tejidos metastáticos ganglionares al compararlos con tejido mamario normal. Rakha y cols.<sup>36</sup> hallaron, sin embargo, que el incremento de la expresión nuclear de E2F4 se asociaba con tumores de mama más avanzados y con pobres resultados. Sus resultados indican que E2F4 podría jugar un papel en la progresión del cáncer de mama, y apoyan más el papel de E2F4 como oncogén que como supresor de tumores.

### III.1.2.4- Estructura del gen *E2F4*

El gen *E2F4* se encuentra localizado en el cromosoma 16 (16q22.1). Su región transcrita tiene un tamaño aproximado de 6 kilobases, y contiene 10 exones que codifican para una proteína de 413 aminoácidos. Las proteínas E2F contienen varios dominios conservados entre los que se incluye: un dominio de unión al ADN (codificado por los exones 1, 2 y parte del exón 3), un dominio de dimerización (exones 3,4,5 y parte del exón 6), un dominio de transactivación (exones 6-10) y un dominio de asociación a proteínas bolsillo que se encuentra englobado dentro del dominio de transactivación (exón 10)<sup>37</sup> (Figura III.1).

Debido a que el sitio de unión para la familia de proteínas pRB se encuentra englobado en el dominio de activación de la transcripción, se piensa que estas proteínas inactivan E2F al bloquear físicamente este dominio.

Figura III.1 Estructura del gen *E2F4* (adaptado de Schwemmler y cols.<sup>37</sup>)



### III.1.2.5- El microsatélite (AGC)<sub>n</sub> de E2F4

El exón 7 del gen *E2F4* contiene el microsatélite (AGC)<sub>n</sub>, que codifica para un tracto repetitivo del aminoácido serina. El microsatélite se encuentra localizado en el dominio de transactivación y no está presente en el resto de los genes que codifican factores de transcripción E2F.<sup>38-40</sup>

Aunque la función de este microsatélite es todavía desconocida, se ha demostrado que en cáncer colorrectal es una diana frecuente para la aparición mutaciones durante la replicación. Diversos trabajos han observado variaciones en el número de repeticiones de este microsatélite en tumores gastrointestinales con inestabilidad de microsatélites.<sup>39-41</sup>

Souza RF y cols.<sup>41</sup> fueron los primeros autores en describir variaciones en la longitud del tracto (AGC)<sub>n</sub> en tumores gastrointestinales. Más tarde, Zhong y cols.<sup>42</sup> también encontraron variaciones en el número de repeticiones (AGC)<sub>n</sub> en tejido de cáncer de colon, mucosa normal y muestras de sangre de individuos sanos. Ellos detectaron cinco alelos para este microsatélite, con tamaños comprendidos entre las 8 y las 17 repeticiones, y propusieron que podría tratarse de un polimorfismo.

Poco se sabe acerca de las repercusiones funcionales que podrían tener las variaciones en la longitud de este microsatélite. Un experimento *in vitro* realizado en fibroblastos por Takashima y cols.<sup>43</sup> reveló una elevada transactivación del promotor para E2F4 en aquellos mutantes que portaban alelos diferentes al de 13 repeticiones.

En cuanto al posible papel del microsatélite (AGC)<sub>n</sub> en cáncer de mama Ho y cols.<sup>35</sup> pudieron observar la adición de una unidad repetitiva (con respecto a las 13 habituales) en el 27% de las muestras de tejido tumoral como en una de las líneas celulares de cáncer de mama (8%). Estos autores, sin embargo, no pudieron hallar ninguna relación entre la variación en la longitud del microsatélite y la expresión de la proteína E2F4.

### III.1.3- EL RECEPTOR EGFR

#### III.1.3.1- Papel del receptor EGFR en el cáncer

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un miembro de la familia de receptores tirosín-quinasa ERBB, a la que también pertenecen ERBB-2, ERBB-3 y ERBB-4. Esta familia de receptores juega un importante papel en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación.<sup>44, 45</sup>

Entre las vías de señalización activadas por EGFR se encuentran importantes rutas relacionadas con el desarrollo del cáncer y su progresión, como la del fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K), la de las proteín-quinasa activadas por mitógenos (Ras/MAPKs) y la de la fosfolipasa - C $\gamma$ . La vía del PI3K conduce a la activación de la vía de señalización AKT y a la supresión de la apoptosis.<sup>46,47</sup> La ruta la de las MAP quinasa (MAPKs) se inicia por la proteína adaptadora GRB2 (proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento) que interacciona con SOS1/2 y conduce a la activación de KRAS, promoviendo el ciclo celular.<sup>48</sup> La fosfolipasa C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ ), es una enzima que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), y sus productos son el inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros regulan varios procesos que afectan al crecimiento celular, la diferenciación y la expresión.<sup>49</sup>

El 30% de los tumores humanos primarios sobreexpresan EGFR. Esta condición ha sido asociada con el estado de la enfermedad y con un pronóstico desfavorable (menor supervivencia y pobre respuesta a la quimioterapia).<sup>50-56</sup>

En lo que al cáncer de mama se refiere, diversos estudios han observado que aquellas pacientes que expresan mayores cantidades de receptor muestran una menor supervivencia, una escasa respuesta a la quimioterapia, e incluso fracaso de la terapia endocrina en cáncer de mama.<sup>57-62</sup> Por otra parte varios estudios muestran que la sobreexpresión de EGFR se relaciona con una reducida expresión de receptores de hormonas esteroideas.<sup>63-65</sup>

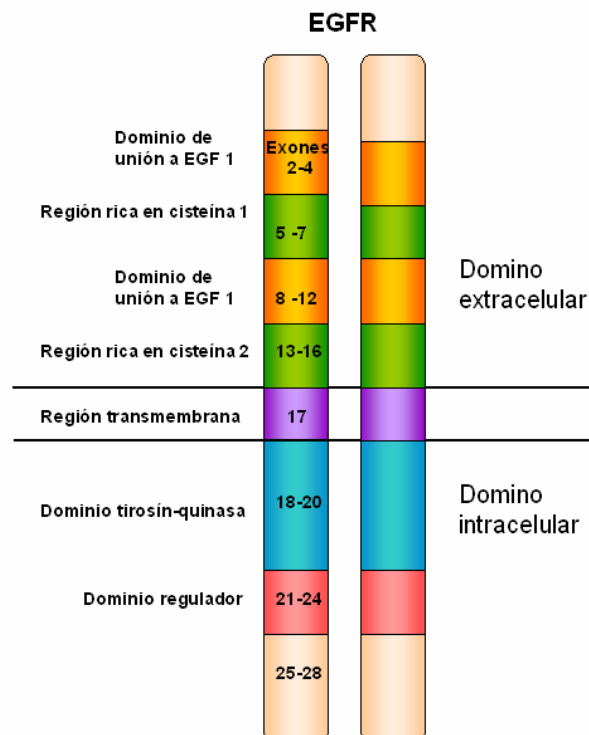
Se han desarrollado inhibidores de EGFR como terapia para el cáncer, que han demostrado alentadores resultados, como un anticuerpo monoclonal con afinidad al dominio extracelular de EGFR y dos pequeños inhibidores tirosín-quinasa específicos.<sup>66-68</sup>

### III.1.3.2- Estructura del receptor EGFR

El receptor EGFR es una glucoproteína de 1186 aminoácidos y 170 kDaltons que se expresa en la membrana celular de la mayoría de las células. La proteína está compuesta por tres dominios principales: el dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembrana y un dominio citoplasmático tirosin-quinasa.<sup>69</sup>

El dominio extracelular puede dividirse en cuatro subdominios e incluye dos regiones ricas en cisteína y dos regiones de unión al ligando. La región transmembrana cuenta con una secuencia hidrofóbica que sirve de anclaje a la membrana. En el dominio intracelular (la región carboxi-terminal del péptido) reside la actividad tirosin-quinasa (Figura III.2).

Figura III.2 Estructura del receptor EGFR



Se conocen seis ligandos para EGFR: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor transformante de crecimiento alpha (TGF $\alpha$ ), la anfirregulina (AR), el factor de crecimiento semejante a EGF de unión a la heparina (HB-EGF), la beta celulina (BTC) y la epirregulina (EPR).<sup>70,71</sup>

La unión del ligando al receptor desencadena la dimerización de EGFR, seguida de la activación de la tirosin-quinasa intrínseca y la autofosforilación cruzada de residuos específicos de tirosina localizados en el extremo carboxilo terminal del receptor. Los residuos fosforilados de tirosina, sirven como sitios de unión para diferentes proteínas adaptadoras, que se asocian con las tirosinas fosforiladas mediante la unión en los dominios SH2. La cadena continúa con la activación de una complicada red de enzimas, proteínas y pequeñas moléculas que actúan como mensajeros secundarios.<sup>72</sup>

Todo ello desencadena la activación de una variedad de rutas de transducción de las señales activadas por EGFR, que juegan un importante papel en la regulación de procesos celulares como la proliferación, diferenciación, adhesión, migración y apoptosis.<sup>73-77</sup>

### III.1.3.3- Estructura del gen *EGFR*

El gen *EGFR*, que codifica para dicho receptor se encuentra localizado en el cromosoma 7(p12.1–12.3.) y contiene 28 exones. Los exones 1-16 codifican el dominio extracelular, los exones 18-28 el dominio intracelular, y el exon 17 la región transmembrana. Al igual que ocurre con otros genes, el intrón 1 de *EGFR* tiene importantes funciones reguladoras. En la región reguladora 5' del gen, muy cercano al promotor, se encuentra situado un elemento potenciador (potenciador 1), acompañado por otros dos (potenciadores 2 y 3). El potenciador 2, localizado en el intrón 1, muestran una función cooperativa con el potenciador 3, localizado aguas arriba del promotor. El potenciador 2 sólo funciona en presencia del 3.<sup>78-81</sup>



### III.1.3.4- Microsatélite (CA)<sub>n</sub> de *EGFR*

En el intrón 1 del gen *EGFR*, próximo al potenciador 2, se encuentra situado un microsatélite polimórfico constituido por un número variable de repeticiones del dinucleótido (CA)<sub>n</sub>. Chi y cols.<sup>82</sup> encontraron ocho alelos para este microsatélite de tamaños comprendidos entre las 14-21 repeticiones. Posteriormente Brandt y cols.<sup>83</sup> hallaron tres alelos más para este microsatélite.

La proximidad del microsatélite (CA)<sub>n</sub> al potenciador 2, hace pensar que las variaciones en el número de repeticiones de este microsatélite podrían causar diferencias en los niveles de transcripción de este gen. Los resultados de algunos estudios indican que estas variaciones podrían ser, al menos parcialmente, la causa de las diferencias individuales en la expresión de *EGFR* encontradas en humanos.<sup>84</sup>

Gebhardt y cols. observaron que la actividad transcripcional in vitro del gen *EGFR* disminuía con el aumento del número de repeticiones (CA)<sub>n</sub>.<sup>85</sup> Ellos determinaron una reducción de la expresión del gen del 80% para un alelo largo (21 repeticiones) con respecto a un alelo corto (16 repeticiones).

En experimentos llevados a cabo en líneas celulares de carcinoma de mama, Buerger y cols.<sup>86</sup> también pudieron observar diferencias en los niveles de transcripción dependiendo de la longitud de este microsatélite. Ellos comprobaron que aquellos tumores heterocigotos para repeticiones cortas de (CA)<sub>n</sub> (menos de 17 repeticiones), mostraban elevados niveles de expresión de *EGFR* al compararlos con tumores portadores de repeticiones largas. Además, los autores observaron que los tumores con pérdida de heterocigocidad para el intron 1 de *EGFR* expresaban mayores niveles de *EGFR* cuando el alelo perdido era largo que cuando era corto, llegando a la conclusión de que el tamaño de (CA)<sub>n</sub> modulaba el contenido intratumoral de *EGFR* in vivo.

En lo que al cáncer de mama se refiere Tidow y cols.<sup>87</sup> observaron que aquellos tumores de cáncer de mama con pérdida de heterocigocidad (LOH) para el alelo largo de (CA)<sub>n</sub> mostraban elevados niveles de expresión de *EGFR* al compararlos con aquellos que habían perdido el alelo corto.

En un estudio de casos y controles realizado por Brandt y cols.<sup>83</sup> en población alemana, no se halló una asociación entre la longitud del microsatélite CA y el cáncer de mama en general. Si se observó, sin embargo, un mayor riesgo de cáncer de mama en aquellas mujeres con dos alelos largos (con más de 19 repeticiones) y con historia familiar de cáncer de mama en primer grado.

La longitud del microsatélite (CA)<sub>n</sub> también ha sido relacionada por algunos estudios con respuesta a terapias que tienen como diana EGFR. Según estos trabajos la longitud de (CA)<sub>n</sub>, junto con otros polimorfismos, puede predecir una pobre respuesta frente a terapias convencionales.<sup>88-90</sup>

### III.1.4- EL RECEPTOR NOTCH4

#### III.1.4.1- La ruta de señalización NOTCH y el cáncer de mama

El receptor NOTCH4 es uno de los cuatro miembros de la familia de receptores NOTCH (NOTCH1- NOTCH4) que se conocen en vertebrados.<sup>91-94</sup> Durante la vida de los mamíferos la vía de señalización de NOTCH juega un papel esencial regulando el destino celular, la apoptosis, la proliferación y la migración celular.<sup>95,96</sup>

La inapropiada activación de la ruta tiene como resultado la estimulación de la proliferación, la restricción de la diferenciación y la prevención de la apoptosis en las células cancerosas. Se ha podido observar una activación aberrante de esta ruta en distintos tipos de cánceres, como la leucemia aguda linfoblástica,<sup>97</sup> el melanoma,<sup>98</sup> el adenocarcinoma de hígado<sup>99</sup> y el cáncer de mama.<sup>100,101</sup>

Los primeros indicios de que la vía de señalización de NOTCH podría jugar un importante papel en el cáncer de mama salieron a la luz cuando se caracterizó, dentro del gen *Notch4* del ratón, un sitio frecuente de inserción del virus MMTV que causa tumores de mama en esta especie.<sup>102</sup> La inserción del provirus en este locus da lugar al oncogen *Int-3*, cuya expresión da lugar a una oncoproteína constitutivamente activa que contiene los dominios intracelulares y transmembrana de NOTCH4, pero que

excluye la mayor parte de la porción extracelular. Inserciones similares de este virus se han localizado con posterioridad en el gen *Notch1*.<sup>103</sup>

El resultado de todo ello es una ganancia de función de la proteína que produce profundos efectos en el crecimiento y la diferenciación de la glándula mamaria normal de ratón y provoca la transformación celular.<sup>104-107</sup>

Hoy se sabe que la ruta de señalización de NOTCH juega un importante papel tanto en el desarrollo de la glándula mamaria normal, como en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama en ratón. La expresión no regulada de la forma truncada del gen *Int3* en células del epitelio mamario de rata limita su capacidad para llevar a cabo las decisiones en cuestión de destino celular requeridas para la morfogénesis y la diferenciación funcional.<sup>107</sup>

En humanos se ha comprobado que los receptores NOTCH y los ligandos DSL se expresan en el epitelio luminal de la mama. La señalización de NOTCH es capaz de transformar la línea de células epiteliales de mama MCF10<sup>a</sup>, y la atenuación de esta señalización revierte el fenotipo transformado de las líneas humanas de cáncer de mama.<sup>108</sup>

Existen claras evidencias de que la vía de señalización NOTCH es relevante para la supervivencia de las 'stem cells' en cáncer de mama.<sup>109-111</sup> La inhibición farmacológica o genética de NOTCH1 o NOTCH4 reduce la actividad de las stem cells *in vitro* y la formación de tumores *in vivo*.<sup>112</sup> Se ha comprobado que la atenuación de la señalización de NOTCH por inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa pueden inhibir la proliferación de las células cancerosas mamarias mediante el arresto del ciclo celular y la apoptosis.<sup>113,114</sup>

#### III.1.4.2- Estructura del receptor NOTCH4

Los receptores NOTCH están constituidos por largas proteínas transmembrana de aproximadamente 300 kDaltons formadas por tres subunidades: una subunidad extracelular (EC), una transmembrana (TM) y otra citoplásmica (IC). La subunidad extracelular de NOTCH4 contiene un péptido señal, 29 repeticiones EGF-

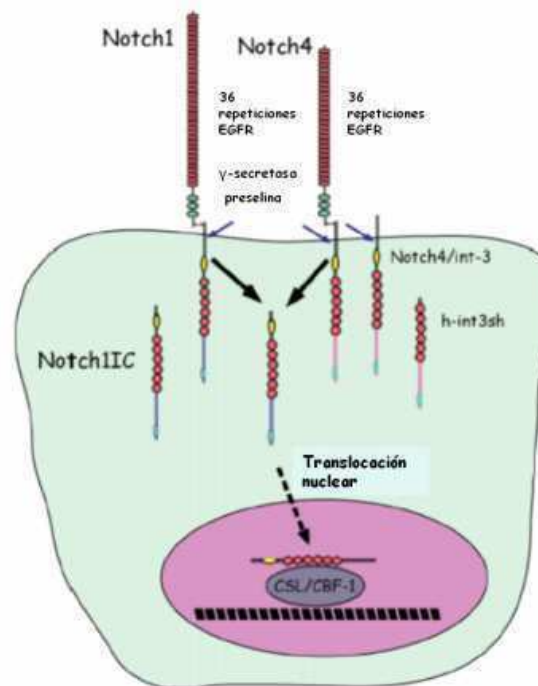
like y tres repeticiones Notch/Lin-12, que median la interacción entre el receptor y el ligando. La subunidad intracelular consta de un dominio RAM23, seis repeticiones cdc10/Ankyrin y una región conservada PEST (contiene prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T)).

La secuencia RAM23 y las repeticiones cdc10/Ankyrin interactúan con los factores de transcripción CSL (CBF-1 en mamíferos).<sup>115,116</sup>

Los receptores NOTCH4 actúan como receptores de superficie para la familia de ligandos Delta, Lag-2 y Serrate (DLS). En mamíferos se conocen cinco ligandos denominados JAG1, JAG2 y Delta like -1, -3, y -4 (DLL1, DLL3 y DLL4).<sup>117</sup> La unión de los ligandos al dominio extracelular de NOTCH produce una rotura proteolítica por un complejo preselina/gamma-secretasa generándose un fragmento intracelular que se transloca al núcleo, donde participa en la regulación transcripcional (Figura III.3). Este fragmento interactúa con factores de transcripción de la familia CLS (RBP-J kappa, CBF1, Supresor de Hairless y Lag-1). Esta interacción desplaza a ciertos correpresores como SMRT y HDAC1, y recluta coactivadores para formar un complejo transcripcional activo.<sup>118,119</sup>

Los genes diana de NOTCH incluyen represores transcripcionales pertenecientes a las familias de proteínas HES (Hairy Enhancer of Split) y HRT (HEY), y otros genes como ERBB2, la ciclina D1, etc. Sin embargo, aún no está claro cuáles de estos genes son los responsables de los efectos fenotípicos de la señal de NOTCH.<sup>120</sup>

Figura III.3 Ruta de señalización mediada por receptores NOTCH  
(adaptado de Politi y cols.<sup>119</sup>)



#### III.1.4.3- Microsatélite (CTG)<sub>n</sub> del gen *NOTCH4*

El gen *NOTCH4* está situado en el cromosoma 6 (6p21.3) y contiene 30 exones.<sup>121</sup> En el exón uno del gen se encuentra un microsatélite polimórfico constituido por repeticiones (CTG)<sub>n</sub>, que codifican para un número variable de residuos del aminoácido leucina. Dicho microsatélite se localiza en la región que codifica para el péptido señal.<sup>122</sup> Se conocen siete alelos de este microsatélite, cuyo tamaño oscila entre las 5 y las 13 repeticiones.<sup>123</sup>

Aunque se desconoce por el momento si variaciones en la longitud de este microsatélite tienen repercusiones funcionales, algunos estudios han encontrado una asociación entre la longitud de este microsatélite y la esquizofrenia.<sup>124-127</sup> No conocemos, sin embargo, estudios previos que hayan analizado la longitud del microsatélite del gen *NOTCH4* en relación con el cáncer de mama.



## III.2- OBJETIVOS

Los genes *EGFR*, *E2F4* y *NOTCH4* tienen un importante papel en distintos aspectos relacionados con el cáncer, como el control del ciclo celular y la diferenciación. Estos genes contienen microsatélites polimórficos situados en regiones fundamentales de los mismos. Como indican algunos estudios, variaciones en la longitud de los microsatélites  $(AGC)_n$  de *E2F4*,  $(CTG)_n$  de *NOTCH4* y  $(CA)_n$  de *EGFR* podrían tener efectos sobre la funcionalidad de las proteínas que codifican.

El objetivo principal de este trabajo consistió en averiguar si la longitud de estos microsatélites mostraba diferencias entre las pacientes de cáncer de mama y aquellas mujeres que no padecían la enfermedad.

Asimismo nos propusimos conocer la distribución alélica de estos microsatélites polimórficos en nuestra población, ya que algunos de ellos, a pesar de encontrarse en genes de gran importancia en el cáncer, han sido poco estudiados.



## III.3- MATERIAL Y MÉTODOS

### III.3.1- DISEÑO

Estudio de casos y controles.

#### III.3.1.1- Participantes

##### a) Características de los casos

Como casos para este estudio se seleccionaron 212 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama primario entre los meses de marzo de 2006 y marzo de 2009. Todas las participantes del estudio fueron pacientes del servicio de Oncología Médica del Hospital Insular de Gran Canaria, con diagnóstico reciente de cáncer de mama (menor a 6 meses), confirmado por examen histológico realizado por el servicio de anatomía patológica. Las edades de las pacientes estuvieron comprendidas entre los 34 y los 65 años.

##### b) Características de los Controles

Los controles del estudio fueron 308 mujeres residentes en Gran Canaria, participantes en el estudio de cohorte CDC de Canarias que no habían padecido cáncer de mama hasta el momento en el que fueron reclutadas para la cohorte (los detalles del estudio se encuentran recogidos en el capítulo II apartado 3.1. b). Las edades de los controles estuvieron comprendidas entre los 23 y los 85 años.

#### III.3.1.2- Obtención de muestras y datos relevantes para el estudio

##### a) Obtención de muestras e información relevante de los casos

Las pacientes que tras ser informadas de los objetivos del estudio accedieron a participar en el mismo, fueron citadas para la realización de una entrevista personal,

exploración física y toma de muestras. Durante la entrevista las pacientes respondieron a un cuestionario (cuestionario CDC disponible en <http://www.icic.es>) administrado por encuestadoras contratadas para el estudio. A partir de este cuestionario se obtuvieron los datos relacionados con factores de riesgo para cáncer de mama que fueron empleados en este trabajo (antecedentes familiares, edad de menarquia y menopausia, uso de anticonceptivos orales, hábitos tabáquicos, etc.).

En esta cita también se tomaron los datos referentes a medidas antropométricas de las pacientes (peso, altura, etc.). También se extrajo una muestra de sangre venosa de la que se reservó una pequeña cantidad para la obtención de ADN (200µl). Esta muestra permaneció congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción. Los datos clínicos y patológicos acerca del tamaño del tumor, grado, invasividad y receptores hormonales fueron obtenidos a partir de las historias clínicas de las pacientes.

#### b) Obtención de muestras e información relevante de los controles

La muestra de ADN que fue empleada para este estudio fue obtenida a partir de la alícuota de 200 µl de sangre que fue extraída durante el reclutamiento de la cohorte, y que se hallaba conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La información referente a los factores de riesgo para cáncer de mama se obtuvo a partir de los cuestionarios CDC administrados a los participantes de la cohorte durante el transcurso de la entrevista personal.

### III.3.2- Análisis de la longitud de los microsatélites (AGC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub> y (CTG)<sub>n</sub>

El ADN empleado en el análisis fue extraído a partir de 200 µl sangre de sangre usando el kit PCR Template preparation kit (Roche Applied Science). Mediante PCR se amplificaron los fragmentos que contenían los microsatélites (AGC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub> y (CTG)<sub>n</sub>. Los primers utilizados fueron los siguientes:



<b>E2F4</b>
F 5'TGGTCCTCCTGTGTCTGGGTT 3' R 5'AAGGAGGTAGAAGGGTTGG 3'
<b>EGFR</b>
F 5'GTTTGAAGAATTTGAGCCAACC 3' R 5'TTCTTCTGCACACTTGGCAC 3'
<b>NOTCH4</b>
F 5' CTGCCTGAAGAGGGACAG 3' R 5' CACTGAACATCCTCCTAAGG 3'

El volumen final de la reacción de amplificación fue de 25  $\mu$ L. Dicha reacción contenía: 60 ng de ADN (aproximadamente), 0,2 mM de cada dNTP, 1X Fast Start Taq DNA polimerasa buffer (Roche Applied Science), 0.25 unidades de Fast Start Taq DNA polimerasa, 3 mM de  $MgCl_2$ , y 2.4  $\mu$ M de cada primer (un primer de cada pareja marcado con un fluorocromo). Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5' seguido por 30 ciclos a 95 °C durante 45", 53 °C 45" y 72 °C 1'. Se finalizó con una extensión a 72 °C durante 7'.

A continuación el producto de PCR fue diluido 1/3 en agua destilada. Un microlitro de esta dilución se mezcló con 10  $\mu$ L de formamida y 0.3  $\mu$ L de GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). La mezcla se desnaturalizó a 95 °C durante 3' y se dejó enfriar en hielo. Los Fragmentos fueron separados mediante electroforesis capilar usando el secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

La longitud de las repeticiones fue estimada con ayuda del software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) (Figura III.4) y confirmada mediante la secuenciación de fragmentos que contenían repeticiones de diferente longitud. Para ello se usó el secuenciador automático ABI Prism 3100 y el kit comercial Big Dye Terminator Sequencing V 3.1 (Applied Biosystems).

A partir de los resultados obtenidos de la secuenciación se estableció la correspondiente relación entre el tamaño de los fragmentos amplificados y el número de repeticiones para cada microsatélite.

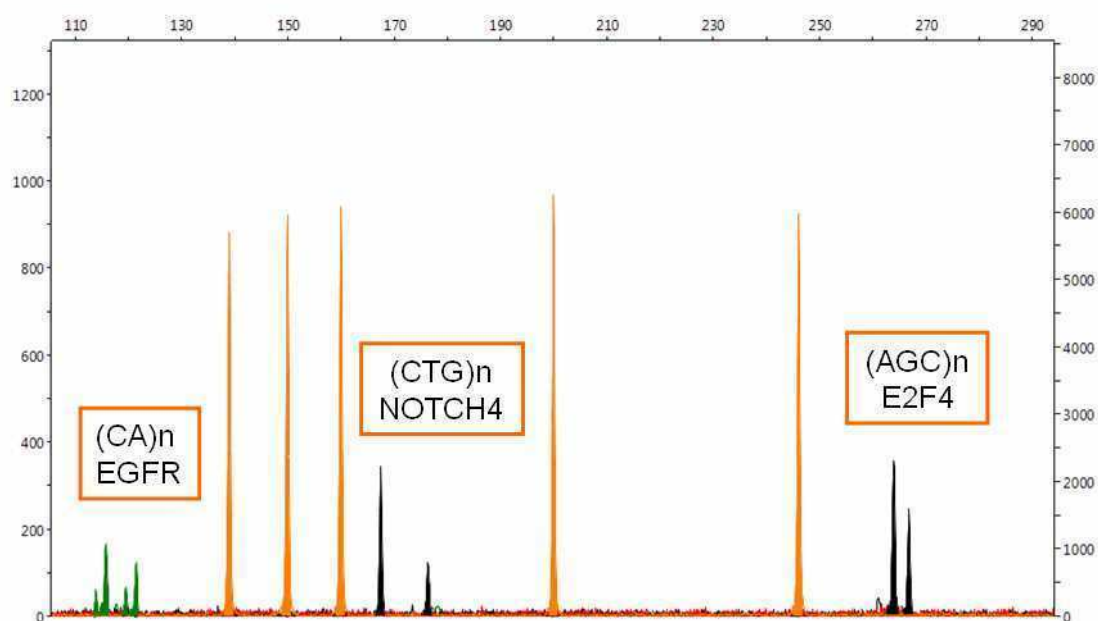
Teniendo en cuenta esta relación se estimó en las muestras restantes el número de repeticiones de los microsatélites, asignándoseles el alelo correspondiente.

Cuando se presentaron alelos de baja frecuencia, para los que no fue posible hallar individuos homocigotos, el producto de PCR se sometió previamente a una electroforesis en gel de acrilamida al 12 % para aislar los fragmentos de ADN que contenían los alelos de interés que posteriormente fueron secuenciados.

---

Figura III.4 Análisis de la longitud de los fragmentos con el software Peak Scanner

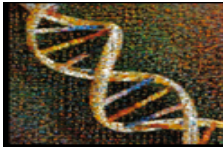
---



### III.3.3- Análisis estadístico

Las variables fueron resumidas conforme a su escala y distribución. Se empleó el test de la Chi cuadrado de Pearson para comparar proporciones y un test de la t de Student para comparar variables continuas. La significación estadística se aceptó en todos los tests al nivel del 5% bidireccional. Los análisis fueron hechos con el paquete

estadístico para ciencias sociales SPSS (versión 15.0 en español para Windows). El equilibrio Hardy-Weinber fue calculado usando el programa Arlequín (versión 2.0).



## III.4- RESULTADOS

### III.4.1- CARACTERÍSTICAS DE CASOS Y CONTROLES

La comparación entre las características de casos y controles referentes a conocidos o posibles factores de riesgo para el cáncer de mama reveló pocas diferencias entre ambos grupos (Tabla III.1).

La edad media de los casos, así como la edad a la que tuvieron el primer hijo resultó ser mayor en los casos que en los controles ( $p < 0.001$ ). La proporción de mujeres que eran o habían sido consumidoras de tabaco también fue mayor en los casos que en los controles ( $p = 0.027$ ), si bien no se detectaron diferencias en el tiempo de consumo. Entre los casos se observó un menor consumo de anticonceptivos orales que entre los controles ( $p = 0.011$ ), aunque nuevamente no se observaron diferencias en el tiempo de consumo. No se hallaron diferencias para conocidos factores de riesgo para el cáncer de mama, como los antecedentes familiares en primer grado de esta enfermedad o la edad de menarquia. Tampoco para otras variables como el número de hijos, la lactancia materna o el índice de masa corporal.

**Tabla III. 1 Características de casos y controles**

Características	Casos		Controles		p
	n	Media $\pm$ SE/ %	n	Media $\pm$ SE/ %	
<i>Edad (años)</i>	202	53.1 $\pm$ 0.8	304	47.3 $\pm$ 0.5	<0.001
<i>Antecedentes CM familiares 1º grado</i>	202	11.4	304	16.4	0.122
<i>Edad de menarquia (años)</i>	202	12.7 $\pm$ 0.1	304	12.6 $\pm$ 0.1	0.770
<i>Consumo de anticonceptivos orales</i>	110	55.0	202	66.4	0.011
<i>Tiempo consumo de anticonceptivos (años)</i>	110	6.6 $\pm$ 0.6	202	6.1 $\pm$ 0.4	0.502
<i>Número de hijos</i>	202	2.3 $\pm$ 0.1	304	2.4 $\pm$ 0.1	0.291
<i>Edad a la que tuvieron primer hijo(años)</i>	165	25.6 $\pm$ 0.4	269	23.6 $\pm$ 0.3	<0.001
<i>Han amamantado a sus hijos</i>	118	72.0	174	64.7	0.139
<i>Tiempo de lactancia (meses)</i>	165	8.8 $\pm$ 1.0	269	6.52 $\pm$ 0.6	0.053
<i>Fumadoras o exfumadoras</i>	80	39.6	91	29.9	0.027
<i>Tiempo de consumo tabaco(años)</i>	80	20.3 $\pm$ 1.3	91	22.9 $\pm$ 1.5	0.196
<i>IMC(kg/m<sup>2</sup>)</i>	202	27.4 $\pm$ 0.4	304	27.8 $\pm$ 0.3	0.468

### III.4.2- Características clínicas de los casos de cáncer de mama

Los datos referentes a las características clínicas e inmunohistoquímicas de los casos de este estudio se encuentran recogidos en la tabla III.2. El porcentaje de pacientes que presentan tumores con estadio temprano (T1,N0,M0) es elevado. La proporción de tumores con expresión de receptores de estrógenos positivos con un mejor pronóstico es del 64,3%, mientras que un 22% presentan sobreexpresión de ErbB2. Estos datos concuerdan con los datos reales habituales en el servicio de oncología, por lo que podría tratarse de una muestra bastante representativa.

<b>Tabla III. 2 Características clínicas de los casos de cáncer de mama</b>		
<b>Características</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>T(tamaño del tumor)</b>		
T1	63	49.2
T2	44	34.4
T3	15	11.7
T4	6	4.7
<b>N (invasión ganglionar)</b>		
N0	42	32.8
N1	73	57.0
N2	10	7.8
N3	3	2.3
<b>M (estadio metastásico)</b>		
M0	124	96.9
M1	4	3.1
<b>Grado del tumor</b>		
1	9	7.8
2	48	41.4
3	59	50.9
<b>Estadio del tumor</b>		
I	16	12.4
II	79	61.2
III	30	23.3
IV	4	3.1
<b>Receptor de estrógenos</b>		
Positivo	83	64.3
Negativo	46	35.7
<b>Receptor de progesterona</b>		
Positivo	71	55
Negativo	58	45
<b>ErbB2</b>		
Positivo	28	22.0
Negativo	99	48.0

### III.4.3- DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS MICROSATÉLITES (AGC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub> Y (CTG)<sub>n</sub> EN CASOS Y CONTROLES

La distribución de frecuencias alélicas de los microsatélites (AGC)<sub>n</sub> de *E2F4*, (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* y (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* fueron bastante similares en casos y controles.

Para el microsatélite (AGC)<sub>n</sub> de *E2F4* se obtuvieron los datos genotípicos de 503 participantes (202 casos y 301 controles), hallándose nueve alelos de longitudes comprendidas entre las 7 y las 18 repeticiones. El alelo con mayor frecuencia, tanto en casos como en controles fue el de 13 repeticiones, alcanzando en ambos grupos una frecuencia superior al 90 %. La frecuencia del resto de los alelos fue muy baja, no llegando a superar para la mayoría de ellos el 2%. Con respecto a los alelos minoritarios sólo se encontró una mujer homocigota para el alelo de 11 repeticiones. En el resto de las participantes estuvo siempre presente el alelo de 13 repeticiones (Tabla III.3 y figura III.5 ). La heterocigosidad observada fue del 0,13.

Para el microsatélite (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* se obtuvieron los datos genotípicos de 489 participantes (206 casos y 283 controles) que mostraron ocho alelos diferentes, con tamaños comprendidos entre las 14 y las 21 repeticiones. El alelo más frecuente fue el de 16 repeticiones, alcanzando una frecuencia de alrededor del 50% tanto en casos como en controles (Tabla III.3 y figura III.6). La heterocigosidad observada fue del 0,73.

En el caso del microsatélite (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* se obtuvieron datos genotípicos para 505 participantes (207 casos y 298 controles). Este microsatélite mostró siete alelos con tamaños comprendidos entre las 5 y 13 repeticiones. El alelo más frecuente, tanto en los casos como en los controles, fue el de 9 repeticiones, seguido en frecuencia por los alelos de 10 y 6 repeticiones (Tabla III.3 y figura III.7). La heterocigosidad observada fue del 0,72.

Las frecuencias alélicas no se desviaron del equilibrio Hardy- Weinberg para ninguno de los tres microsatélites ni en casos ni en controles.

**Tabla III.3 Frecuencias alélicas para los microsatélites (AGC)*n* de E2F4, (CTG)*n* de NOTCH4 y (CA)*n* de EGFR en casos y controles**

Número de repeticiones /Alelo	E2F4 (AGC) <i>n</i>				NOTCH4 (CTG) <i>n</i>				EGFR (CA) <i>n</i>			
	Controles		Casos		Controles		Casos		Controles		Casos	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
5	-	-	-	-	2	0.3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	85	14.3	66	15.9	-	-	-	-
7	5	0.8	-	-	1	0.2	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	5	0.8	2	0.5	234	39.3	160	38.6	-	-	-	-
10	7	1.2	-	-	137	23.0	111	26.8	-	-	-	-
11	12	2.0	2	0.5	83	13.9	43	10.4	-	-	-	-
12	-	-	-	-	46	7.7	31	7.5	-	-	-	-
13	559	92.9	390	96.5	8	1.3	3	0.7	-	-	-	-
14	7	1.2	8	2.0	-	-	-	-	-	-	2	0.5
15	-	-	-	-	-	-	-	-	20	3.5	10	2.4
16	2	0.3	-	-	-	-	-	-	276	48.8	217	52.6
17	1	0.2	-	-	-	-	-	-	53	9.4	19	4,6
18	4	0.7	2	0.5	-	-	-	-	65	11.5	56	13,6
19	-	-	-	-	-	-	-	-	22	3.9	13	3,2
20	-	-	-	-	-	-	-	-	102	18,0	68	16,5
21	-	-	-	-	-	-	-	-	20	3,5	20	4,9
22	-	-	-	-	-	-	-	-	8	1,4	7	1,7

**Figura III.5 Distribución de frecuencias alélicas para el microsatélite (AGC)*n* de E2F4.**

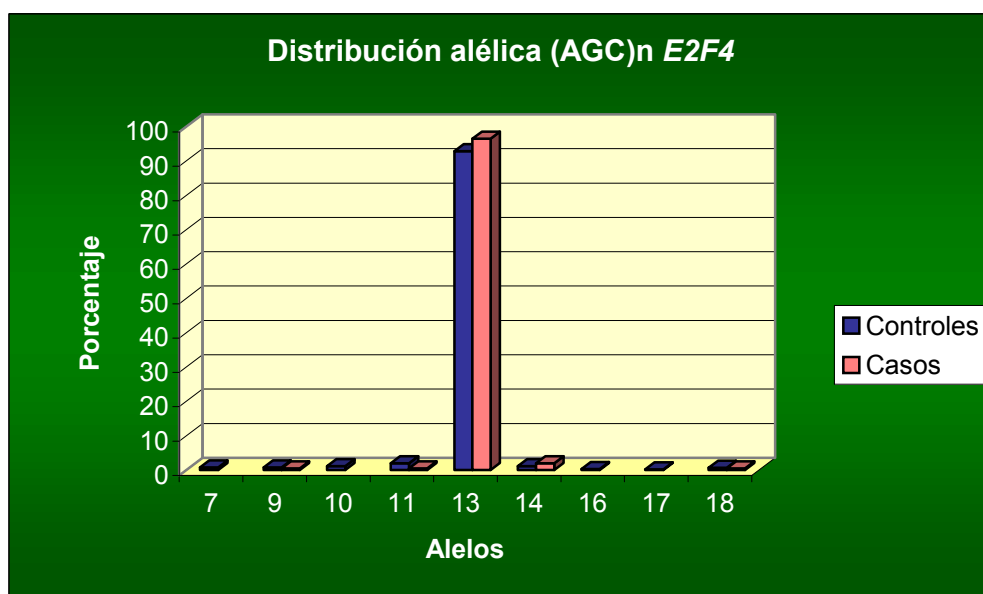


Figura III.6 Distribución de frecuencias alélicas para el microsatélite (CA)<sub>n</sub> de EGFR.

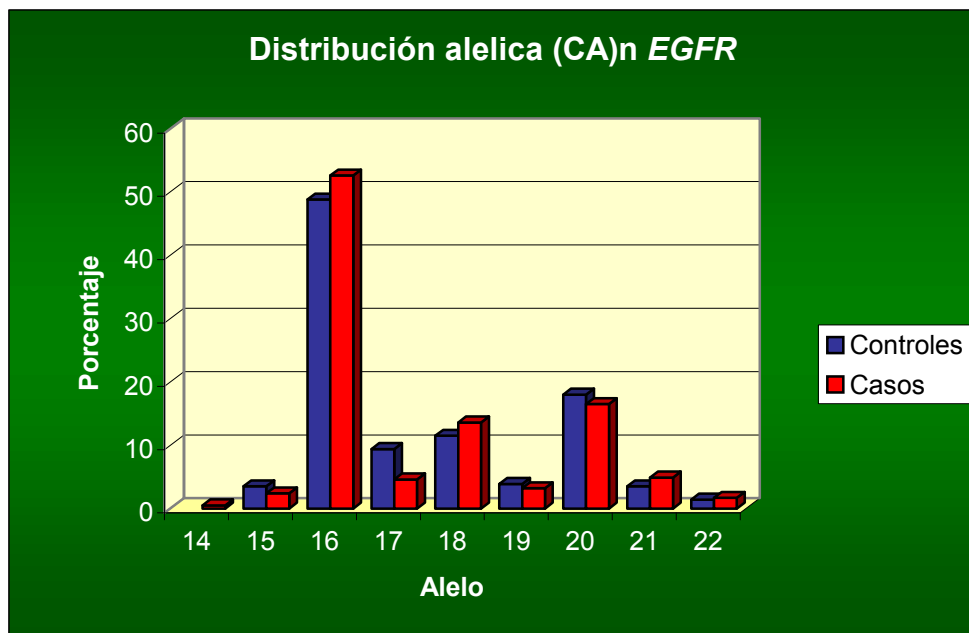
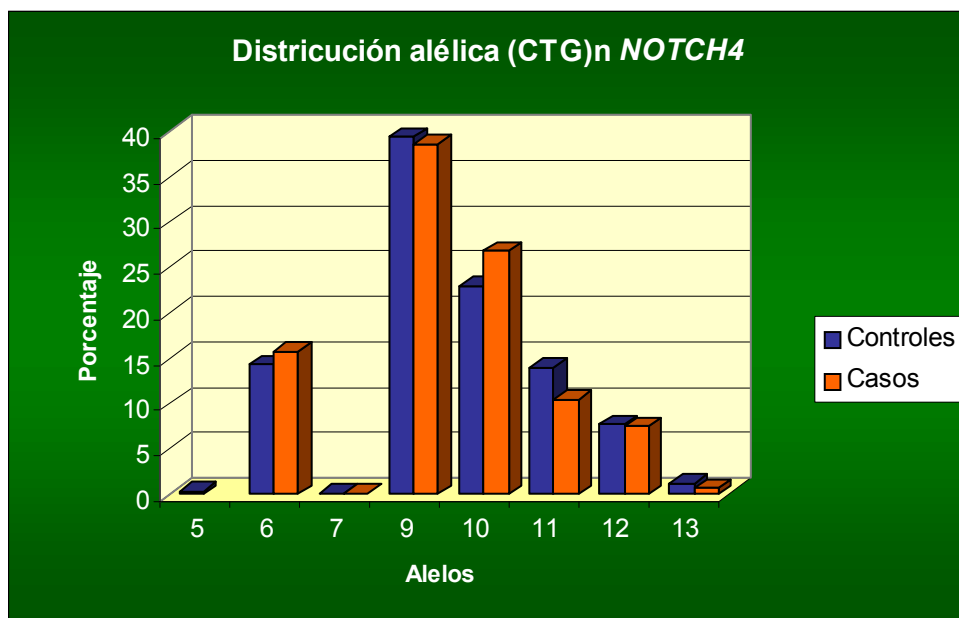


Figura III.7 Distribución de frecuencias alélicas para el microsatélite (CTG)<sub>n</sub> de NOTCH4.





### III.4.4- COMPARACIÓN DE LA LONGITUD DE LOS MICROSATÉLITES (AGC)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub> Y (CTG)<sub>n</sub> EN CASOS Y CONTROLES

Al comparar la longitud media de los alelos cortos y largos para los microsatélites (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* Y (CA)<sub>n</sub> de *E2F4* no se observaron diferencias significativas entre casos y controles (en el caso de participantes heterocigotas se consideró como alelo corto el de menor número de repeticiones y como alelo largo el de mayor número de ellas). Tampoco se observaron diferencias para el alelo medio (se consideró alelo medio al número medio de repeticiones calculado a partir de la longitud los dos alelos (alelo corto+ alelo largo/2)) (Tabla II.4). No se realizaron comparaciones para el microsatélite (AGC)<sub>n</sub> de *E2F4*, al mostrar los alelos minoritarios muy baja frecuencia.

**Tabla III.4 Comparación de la longitud media de alelos (CA)<sub>n</sub> de EGFR y (CTG)<sub>n</sub> de NOTCH4 entre casos y controles.**

Alelo	Casos	Controles	p
	Media ± SE	Media ± SE	
<b>(CA)<sub>n</sub> EGFR</b>			
Alelo corto	16.39 ± 0.1	16.39 ± 0.1	NS
Alelo largo	18.38 ± 0.1	18.39 ± 0.1	NS
Alelo medio	17.39 ± 0.1	17.38 ± 0.1	NS
<b>(CTG)<sub>n</sub> NOTCH4</b>			
Alelo corto	8.48 ± 0.1	8.49 ± 0.1	NS
Alelo largo	10.02 ± 0.1	10.21 ± 0.1	NS
Alelo medio	9.25 ± 0.1	9.35 ± 0.1	NS

Cuando se compararon las distribuciones de frecuencias de los alelos medios de (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* y (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* en casos y controles (Figuras III.8 y III.9), se pudieron apreciar algunas diferencias entre los grupos, más acusadas en el caso de (CA)<sub>n</sub>. A pesar de ello en la distribución no se observó la existencia de una tendencia en los casos a poseer alelos medios más largos o más cortos que los controles.

Figura III.8 Distribución de frecuencias del alelo medio para el microsatélite (CA)<sub>n</sub> de *EGFR*.

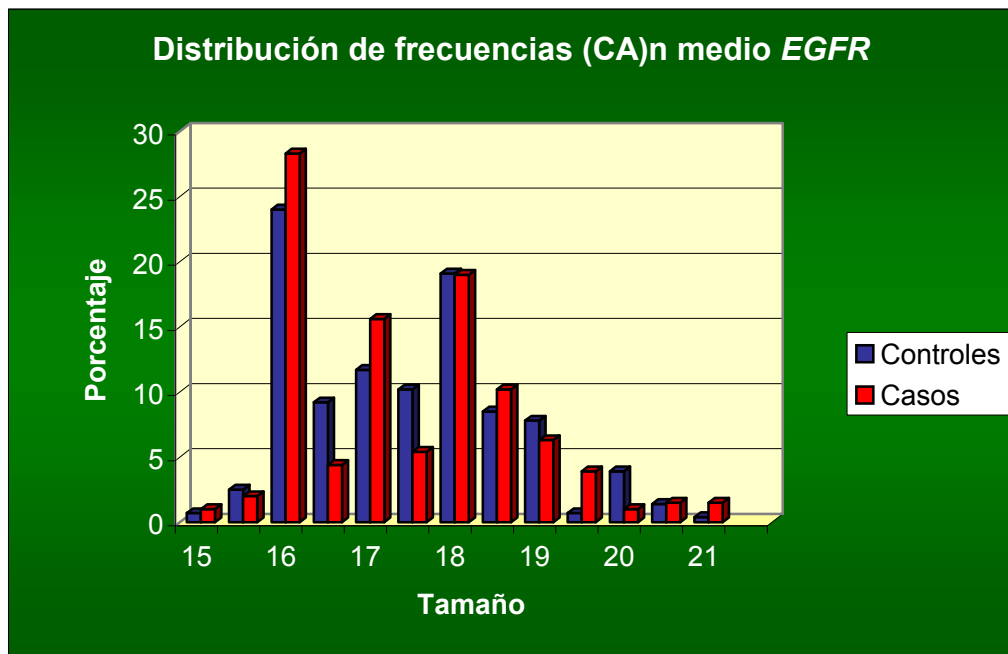
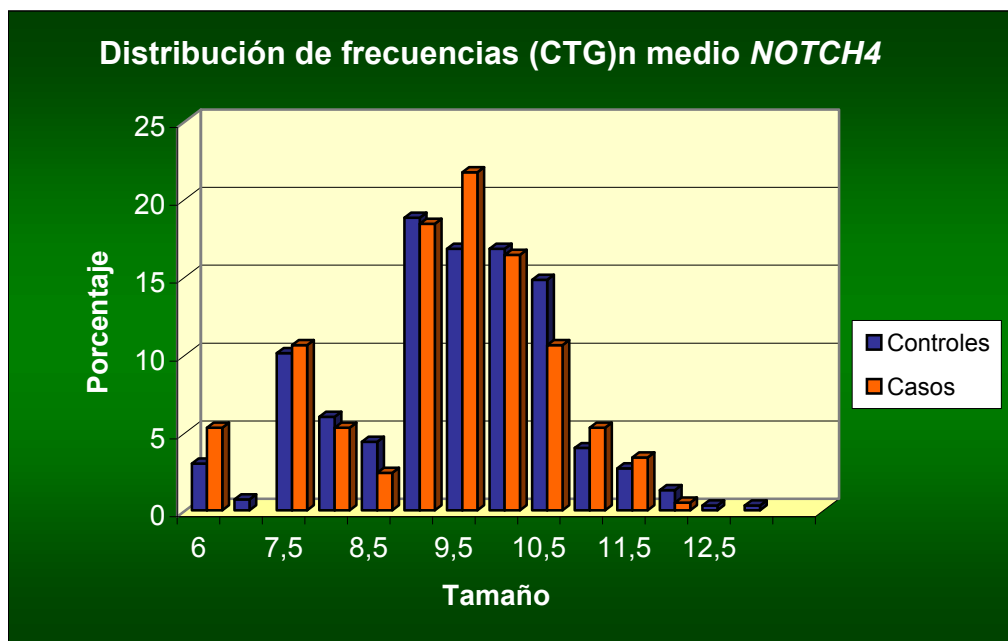


Figura III.9 Distribución de frecuencias del alelo medio para el microsatélite (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4*.



También se procedió a categorizar la longitud de los microsatélite en tres categorías. En la categoría corta (SS) se incluyó a aquellas mujeres cuyos dos alelos tenía una longitud igual o inferior a la media (17 repeticiones para *EGFR* y 9 repeticiones para *NOTCH4*), en la categoría media (SL) a las portadoras de un alelo con una longitud igual o inferior a la media y un alelo mayor que la media. En la categoría larga (LL) se incluyó a aquellas mujeres cuyos dos alelos mostraban longitudes por encima de la media.

Tampoco en este caso la distribución de frecuencias para las tres categorías mostró diferencias entre casos y controles (Figuras III.10 y III.11).

Figura III.10 Distribución de frecuencias para las tres categorías de (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4*.

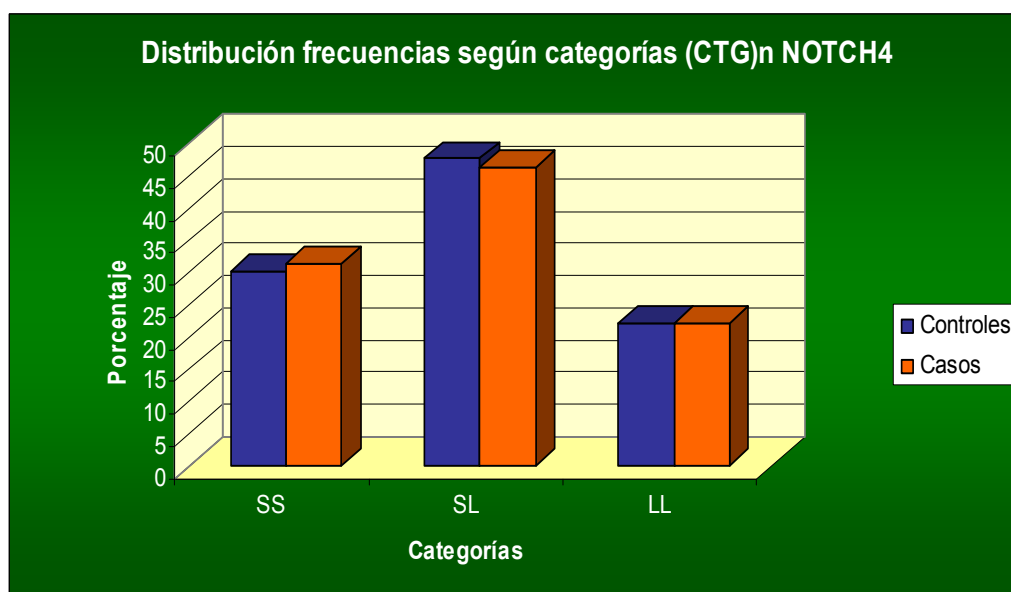
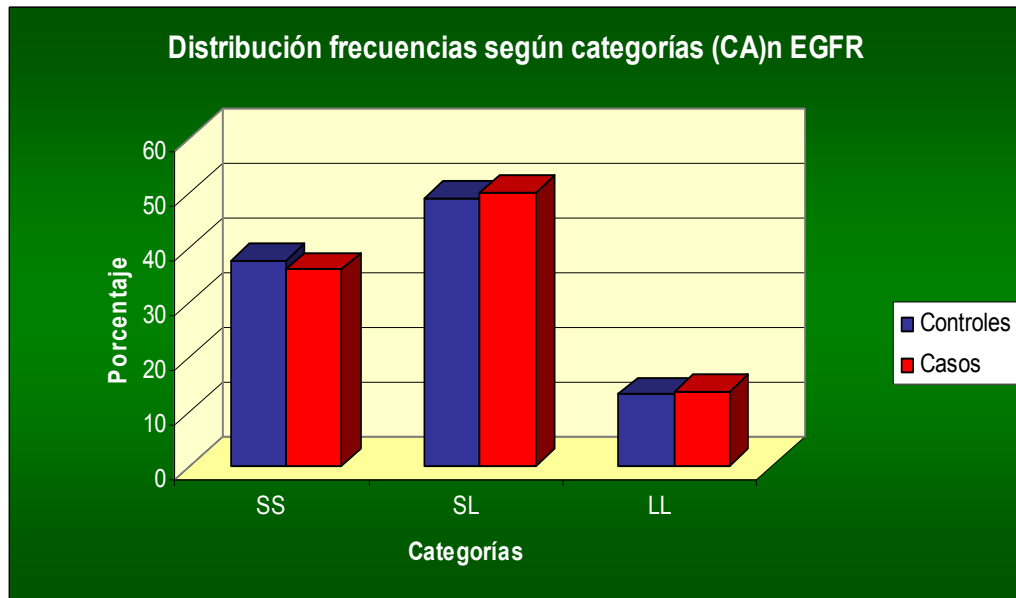
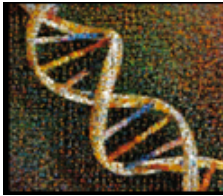


Figura III.11 Distribución de frecuencias para las tres categorías de  $(CA)_n$  EGFR.



### III.5- DISCUSIÓN

Las distribuciones alélicas para los microsatélites  $(AGC)_n$  de *E2F4*,  $(CA)_n$  de *EGFR* y  $(CTG)_n$  de *NOTCH4* que hemos observado entre las participantes de este estudio (casos y controles) se asemejan a las halladas en otras poblaciones analizadas.<sup>42,82,83,123,128</sup>

Para el microsatélite  $(AGC)_n$  de *E2F4* hemos hallado nueve alelos diferentes, con longitudes comprendidas entre entre las 7 y las 18 repeticiones. Zhong y cols.<sup>42</sup> habían descrito previamente la presencia de seis alelos de longitudes comprendidas entre las 8 y las 17 repeticiones en tejido de colon sano y tumoral, llegando a la conclusión de que podía tratarse de un polimorfismo. Los resultados de nuestro estudio confirman este hecho e incorporan tres nuevos alelos de 7, 9 y 18 repeticiones a los ya conocidos.

El alelo de 13 repeticiones, tal y como habían descrito previamente estos autores resultó ser el mayoritario, alcanzando una alta frecuencia entre las participantes del estudio (superior al 90%). El resto de los alelos mostraron una baja frecuencia, hallándose tan sólo una participante homocigota para el alelo de 11 repeticiones. No se detectó en los casos ningún alelo que no presente que no estuviera en los controles.

En cuanto al posible papel de este microsatélite en el cáncer de mama. Ho y cols. observaron una repetición adicional en el 8% de las líneas de cáncer de mama y en el 27% de las muestras de tejido procedente de tumores de mama. La baja frecuencia que presentaron la mayoría de los alelos de este microsatélite, no nos permitió alcanzar la suficiente potencia estadística para realizar las comparaciones correspondientes entre casos y controles

Con respecto a la distribución alélica del microsatélite (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* hemos hallado 8 alelos con longitudes comprendidas entre las 14 y las 21 repeticiones, observaciones que coinciden con las realizadas previamente por Chi y cols.<sup>82</sup> Un estudio posterior, llevado a cabo por Brandt y cols.<sup>83</sup> en población alemana describe la presencia de otros tres alelos de 8,13 y 22 repeticiones. Sin embargo no hemos podido hallar ninguno de estos alelos entre las participantes de nuestro estudio.

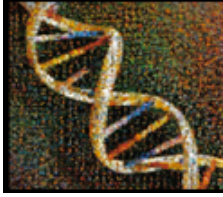
Las distribuciones de frecuencias alélicas de los trabajos citados muestran algunas diferencias con las observadas por nosotros, si bien los tres estudios coinciden en señalar como alelo mayoritario el de 16 repeticiones.

Aunque observamos pequeñas diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles, no hemos hallado diferencias en la longitud de este microsatélite entre ambos grupos. Por lo tanto, a pesar del importante papel de este gen en el desarrollo del cáncer y del efecto que este microsatélite parece tener sobre la expresión de *EGFR*, no parece existir una asociación de la longitud del mismo con la enfermedad. Brandt y cols.<sup>83</sup> habían señalado previamente que la longitud del microsatélite (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* podría incrementar el riesgo de cáncer de entre aquellas mujeres con antecedentes familiares de la enfermedad. Debido al tamaño de la muestra no hemos podido realizar este análisis en nuestro grupo de pacientes. Estos autores tampoco observaron diferencias generales en la longitud del microsatélite entre mujeres jóvenes con cáncer de mama y sus correspondientes controles.

En cuanto al microsatélite (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* hemos hallado ocho alelos de tamaños comprendidos entre las 5 y las 13 repeticiones. En un estudio para comprobar si existía asociación entre la longitud de este microsatélite y la esquizofrenia Imai y cols.<sup>128</sup> hallaron cinco alelos de tamaños entre las 6 y las 13 repeticiones. Rozanska y cols.<sup>123</sup> en mujeres polacas sanas hallaron siete alelos con longitudes también comprendidas entre las 5 y las 13 repeticiones. A diferencia de ambos estudios, donde el alelo de 10 repeticiones resultó ser el mayoritario, entre las participantes de nuestro estudio el alelo con mayor frecuencia fue el de 9 repeticiones, mientras que el alelo de 10 repeticiones fue el siguiente en frecuencia.

A pesar del importante papel que la ruta de señalización de los receptores NOTCH tiene en la progresión del cáncer de mama no conocemos estudios previos que hayan analizado a longitud de este microsatélite en relación con cáncer mama. Tampoco conocemos estudios que hayan analizado los posibles efectos funcionales que puedan tener las variaciones en la longitud de este microsatélite.

En este estudio no hemos hallado diferencias en la longitud del microsatélite (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* entre casos y controles, por lo que la longitud de este microsatélite no parece estar asociada con esta enfermedad. Sin embargo permanece la duda sobre la posible relación entre la longitud de este microsatélite y la esquizofrenia. Los resultados de los trabajos publicados muestran resultados discordantes, y mientras unos autores encuentran una asociación entre la longitud del microsatélite y la enfermedad,<sup>124-127</sup> otros descartan dicha relación.<sup>129,130</sup>



### III.6- BIBLIOGRAFÍA

1. Karlin S, Brocchieri L, Bergman A, Mrazek J, Gentles AJ. Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(1): 333-8.
2. De la Chapelle A. Microsatellite Instability. *N Engl J Med* 2003; 349(3): 209-10.
3. Päivi Peltomäki. Role of DNA Mismatch Repair Defects in the Pathogenesis of Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(6) 1174-79.
4. Zhang W, Yu YY. Polymorphisms of short tandem repeat of genes and breast cancer susceptibility. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33(5): 529-34.
5. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998; 12(15): 2245-62.
6. Girling R, Partridge JF, Bandara LR, Burden N, Totty NF, Hsuan JJ, La Thangue NB. A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature* 1993; 362(6415): 83-7.
7. Zhang Y, Chellappan SP. Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene* 1995; 10(11): 2085-93.
8. McClellan KA, Slack RS. Specific In Vivo Roles for E2Fs in Differentiation and Development. *Cell Cycle* 2007; 6(23): 2917-27.
9. Cobrinik D, Whyte P, Peeper DS, Jacks T, Weinberg RA. Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding domain. *Genes Dev* 1993; 7(12A): 2392-404.
10. Shirodkar S, Ewen M, DeCaprio JA, Morgan J, Livingston DM, Chittenden T. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner *Cell* 1992; 68(1): 157-166.



11. Cao L, Faha B, Dembski M, Tsai LH, Harlow E, Dyson N. Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature* 1992; 355: 176-179.
12. DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94 (14): 7245–50.
13. Helin, K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998; 8(1): 28-35.
14. Attwooll C, Denchi EL, Helin K. The E2F family: Specific functions and overlapping interests. *Embo J* 2004; 23(24): 4709-16.
15. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365: 349-52.
16. Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16<sup>INK4A</sup>-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* 1996; 16(3): 1047-57.
17. Lindeman J G, Gaubatz S, Livingston D M, Ginsberg D. The subcellular localization of E2F-4 is cell cycle dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5095-100.
18. Verona R, Moberg K, Estes S, Starz M, Vernon J P, Lees J A. E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol* 1997; 17 (12):7268-82.
19. Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S, Jakoi L, Nevins JR, Livingston DM, Rempel RE. E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell* 2000; 6(3): 729-35.
20. Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J.* 2003; 22(23): 6289-98.
21. De Bruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R, Leone G. Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem.* 2003; 278(43): 42041-9.

22. Trimarchi J, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, Lees JA. E2F-6 a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(6): 2850-5.
23. Cartwright P, Müller H, Wagener C, Holm K, Helin K. E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene* 1998; 17(5): 611-24.
24. Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, Heeran M, Di Stefano L, Helin K. Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res* 2000; 33(17): 5458-70.
25. Ikeda MA, Jakoi L, Nevins JR. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (8): 3215-20.
26. Moberg K, Starz MA, Lees JA. E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 1996; 16 (4): 1436-49.
27. Balciunaite E, Spektor A, Lents NH, Cam H, Te Riele H, Scime A, Rudnicki MA, Young R, Dynlacht BD. Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(18): 8166-78.
28. Smith EJ, Leone G, DeGregori J, Jakoi L, Nevins JR. The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol Cell Biol* 1996; 16(12): 6965-76.
29. Cam H, Balciunaite E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, Young R, Kluger Y, Dynlacht BD. A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* 2004; 16(3): 399-411.
30. Takahashi Y, Rayman JB, Dynlacht BD. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 2000; 14(7): 804-16.
31. Bruce JL, Hurford RK Jr, Classon M, Koh J, Dyson N. Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol Cell*. 2000; 6(3): 737-42.

32. Hurford RK, Cobrinik D, Lee MH, Dyson N. pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev.* 1997; 11(11):1447-63.
33. Litovchick L, Sadasivam S, Florens L, Zhu X, Swanson SK, Velmurugan S, Chen R, Washburn MP, Liu XS, DeCaprio JA. Evolutionarily Conserved Multisubunit RBL2/p130 and E2F4 Protein Complex Represses. Human Cell Cycle-Dependent Genes in Quiescence. *Mol Cell* 2007; 26(4): 539-51.
34. Conboy CM, Spyrou C, Thorne NP, Wade EJ, Barbosa-Morais NL, Wilson MD, Bhattacharjee A, Young RA, Tavaré S, Lees JA, Odom DT. Cell cycle genes are the evolutionarily conserved targets of the E2F4 transcription factor. *PLoS One* 2007; 2(10): e1061.
35. Ho GH, Calvano JE, Bisogna M, Van Zee KJ. Expression of E2F-1 and E2F-4 is reduced in primary and metastatic breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 69(2):115-22.
36. Rakha EA, Pinder SE, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO. Expression of E2F-4 in invasive breast carcinomas is associated with poor prognosis. *J Pathol* 2004; 203(3): 754-61.
37. Schwemmle S, Pfeifer GP. Genomic structure and mutation screening of the *e2f4* gene in human tumors. *Int J Cancer* 2000; 86(5): 672-7.
38. Pfeifer GP .Genomic structure and mutation screening of the E2F4 gene in human tumors. Schwemmle S, Pfeifer GP. *Int J Cancer.* 2000; 86(5): 672-7.
39. Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, Tanaka N, Shimada T, Kimura A, Shimizu K. Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1998; 58 (4):594-8.
40. Yoshitaka T, Matsubara N, Ikeda M, Tanino M, Hanafusa H, Tanaka N, Shimizu K. Mutations of E2F-4 trinucleotide repeats in colorectal cancer with microsatellite instability. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 227(2): 553-7.
41. Souza RF, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Wang S, Shi YQ, Rhyu MG, Cottrell J, Abraham JM, Biden K, Simms L, Leggett B, Bova GS, Frank T, Powell SM,

- Sugimura H, Young J, Harpaz N, Shimizu K, Matsubara N, Meltzer SJ. Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 1997; 57(12): 2350-3.
42. Zhong X, Hemmi H, Koike J, Tsujita K, Shimatake H. Various AGC repeat numbers in the coding region of the human transcription factor gene E2F-4. *Hum Mutat* 2000; 15(3): 296-7.
43. Takashima H, Matsumoto Y, Matsubara N, Shirakawa Y, Kawashima R, Tanino M, Ito S, Isozaki H, Ouchida M, Meltzer SJ, Shimizu K, Tanaka N. Effect of naturally occurring E2F-4 alterations on transcriptional activation and proliferation in transfected cells. *Lab Invest* 2001; 81(11): 1565-73.
44. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield M D. Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erb-B* oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307 (5951), 521-7.
45. Ullrich A, Coussens L, Hayflick J S, Dull T J, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Downward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfield MD, Seeburg PH. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; 309 (5967): 418-25.
46. Bjorge JD, Chan TO, Antczak M, Kung HJ, Fujita DJ. Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(10): 3816-20.
47. Mattoon DR, Lamothe B, Lax I, Schlessinger J. The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol* 2004; 2: 24.
48. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 1999; 71 (3-4): 479-500.
49. Haugh JM, Schooler K, Wells A, Wiley HS, Lauffenburger DA. Effect of epidermal growth factor receptor internalization on regulation of the phospholipase C-gamma1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274(13): 8958-65.

50. Veale D, Kerr N, Gibson GJ, Kelly PJ, Harris AL. The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Br J Cancer* 1993; 68(1): 162-5.
51. Glynne-Jones E, Goddard L, Harper ME. Comparative analysis of mRNA and protein expression for epidermal growth factor receptor and ligands relative to the proliferative index in human prostate tissue. *Hum Pathol.* 1996; 27(7): 688-94.
52. Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of *ERBB-1*, *VEGF*, *cyclin A*, *FOS*, *JUN* and *MYC* in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1998; 77(4): 663-9.
53. Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, Speiser P, Czerwenka K, Sevela P, Zeillinger R. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res* 1997; 17(1B): 613-9.
54. Niikura H, Sasano H, Sato S, Yajima A. Expression of epidermal growth factor-related proteins and epidermal growth factor receptor in common epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16(1): 60-8.
55. Neskovic-Konstantinovic Z, Nikolic-Vukosavljevic D, Brankovic- Magic M, Kanjer K, Gavrilovic D, Mitrovic L, Borojevic N, Vukotic D, Spuzic I. Expression of epidermal growth factor receptor in breast cancer, from early stages to advanced disease. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18(3): 347-55.
56. Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Nishigaki Y, Ishida S, Nagase A, Miyokawa N, Hirata S, Kikuchi K. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol Rep* 2000; 7(3): 603-7.
57. Bolufer P, Miralles F, Rodriguez A, Vazquez C, Lluch A, Garcia-Conde J, Olmos T. Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with cytosolic and nuclear estrogen receptors and with biological and histological tumour characteristics. *Eur J Cancer* 1990; 26(3):283-90.
58. Barrett-Lee PJ. Growth factor signalling in clinical breast cancer and its impact on response to conventional therapies: a review of chemotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12 Suppl1:S125-33.

59. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 12; 244(4905):707-12.
60. Klijn JG, Look MP, Portengen H, Alexieva-Figusch J, van Putten WL, Foekens JA. The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29(1): 73-84.
61. Lacroix H, Iglehart JD, Skinner MA, Kraus MH. Overexpression of erbB-2 or EGF receptor proteins present in early stage mammary carcinoma is detected simultaneously in matched primary tumors and regional metastases. *Oncogene* 1989; 4(2): 145-51.
62. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992; 13(1): 3-17.
63. Wrba F, Reiner A, Ritzinger E, Holzner JH, Reiner G. Expression of epidermal growth factor receptors (EGFR) on breast carcinomas in relation to growth fractions, estrogen receptor status and morphological criteria. An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 1988; 183(1): 25-9.
64. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Hachitanda Y, Oda S. Prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its relationship to the estrogen receptor status in 1029 patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71(1): 67-75.
65. Khazaie K, Schirmacher V, Lichtner RB. EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12(3-4): 255-74.
66. Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardello F, Tortora G. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(7-8):1416–31.
67. Bates SE, Fojo T. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a moving target? *Clin Cancer Res* 2005; 11(20): 7203-5.

68. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11(4): 689-708.
69. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265 (14): 7709-12.
70. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embriogénesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410(1): 83-6.
71. Carpenter G. Employment of epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol* 1999; 146(4): 697-702.
72. Mass RD. The HER receptor family: a rich target for therapeutic development. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58(3): 932-40.
73. Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1766(1): 120-39.
74. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(2): 127-37.
75. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19(13): 3159-67.
76. Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(11): 2445-59.
77. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano. Comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *H.Mol Syst Biol* 2005; 1: 2005.0010.
78. Chrysogelos SA. Chromatin structure of the EGFR gene suggests a role for intron 1 sequences in its regulation in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 1993; 21(24): 5736-41.
79. Ishii S, Xu Y-H, Stratton RH, Roe BA, Merlino GT, Pastan I. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(15): 4920-4.

80. Hudson LG, Thompson KL, Xu J, Gill GL. Identification and characterization of a regulated promoter element in the epidermal growth factor receptor gene. Proc Natl Acad Sci US A 1990; 87(19): 7536-40.
81. Maekawa T, Imamoto F, Merlino GT, Pastan I, Ishii S. Cooperative function of two separate enhancers of the human epidermal growth factor receptor protooncogene. J Biol Chem 1989; 264(10): 5488-94.
82. Chi DD, Hing AV, Helms C, Steinbrueck T, Mishra SK, Donis-Keller H. Two chromosome 7 dinucleotide repeat polymorphisms at gene loci epidermal growth factor receptor (EGFR) and pro $\alpha$ 2 (1) collagen (COL1A2). Hum Mol Genet. 1992; 1(2):135.
83. Brandt B, Hermann S, Straif K, Tidow N, Buerger H, Chang-Claude J. Modification of breast cancer risk in young women by a polymorphic sequence in the *egfr* gene. Cancer Res 2004; 64(1): 7-12.
84. Liu WQ, Innocenti F, Chen PX, Das S, Cook EH, Ratain MJ. Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism. Clin Cancer Res 2003 ; 9(3):1009-12.
85. Gebhardt F, Zänker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. J Biol Chem 1999; 274(19): 13176-80.
86. Buerger H, Gebhardt F, Schmidt H, Beckmann A, Hutmacher K, Simon R, Lelle R, Boecker W, Brandt B. Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of *egfr* is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression. Cancer Res 2000; 60(4): 854-7.
87. Tidow N, Boecker A, Schmidt H, Agelopoulos K, Boecker W, Buerger H, Brandt B. Distinct amplification of an untranslated regulatory sequence in the *egfr* gene contributes to early steps in breast cancer development. Cancer Res 2003; 63(6): 1172-78.
88. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusatis G, Iacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M. An epidermal growth



- factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* 2004; 64(24): 9139-43.
89. Zhang W, Stoecklacher J, Park DJ, Yang D, Borchard E, Gil J, Tsao-Wei DD, Yun J, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Groshen S, Lenz HJ. Gene polymorphisms of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, interleukin-8, predict oxaliplatin efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5(2): 124-31.
90. Zhang W, Gordon M, Press OA, Rhodes K, Vallböhmer D, Yang DY, Park D, Fazzone W, Schultheis A, Sherrod AE, Iqbal S, Groshen S, Lenz HJ. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16(7): 475-83.
91. Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G. A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 1991; 113(1):199-205.
92. Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G. Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 1992; 116(4): 931-41.
93. Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U. The novel Notch homologue mouse Notch3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* 1994; 46(2):123-36.
94. Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 1996; 122(7): 2251-9.
95. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284 (5415): 770-6.
96. Gridley T. Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 1:R9-13.
97. Roy M, Pear WS, Aster JC. The multifaceted role of Notch in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17(1): 52-9.

98. Pinnix CC, Herlyn M. The many faces of Notch signaling in skin-derived cells. *Pigment Cell Res* 2007; 20(6): 458-65.
99. Chen Y, De Marco MA, Graziani I, Gazdar AF, Strack PR, Miele L et al. (2007). Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH-1 signaling in adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 2007; 67(17): 7954-9.
100. Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCreedy DR et al. (2005). High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* 65: 8530-7.
101. Dickson BC, Mulligan AM, Zhang H, Lockwood G, O'Malley FP, Egan SE, Reedijk M. High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2007; 20(6): 685-93.
102. Gallahan D, Kozak C, Callahan R. A new common integration region (int-3) for mouse mammary tumor virus on mouse chromosome 17. *J Virol* 1987; 61(1): 218-20.
103. Dievart A, Beaulieu N, Jolicoeur P. Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. *Oncogene* 1999; 18(44): 5973-81.
104. Robbins J, Blondel BJ, Gallahan D, Callahan R. Mouse mammary tumor gene int-3: a member of the notch gene family transforms mammary epithelial cells. *J Virol* 1992; 66(4): 2594-9.
105. Nusse R. The int genes in mammary tumorigenesis and in normal development. *Ciba Found Symp* 1990; 150: 212-22.
106. Gallahan D, Callahan R. The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 1997; 14(16): 1883-90.
107. Smith GH, Gallahan D, Diella F, Jhappan C, Merlino G, Callahan R. Constitutive expression of a truncated INT3 gene in mouse mammary epithelium impairs differentiation and functional development. *Cell Growth Differ* 1995; 6(5): 563-77.
108. Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant Activation of Notch Signaling in Human Breast Cancer. *Cancer Res*. 2006; 66(3): 1517-25.

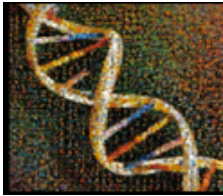
109. Farnie G, Clarke RB, Spence K, Pinnock N, Brennan K, Anderson NG, Bundred NJ. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(8): 616-27.
110. Farnie G, Clarke RB. Mammary stem cells and breast cancer - role of Notch signalling. *Stem Cell Rev* 2007; 3(2): 169-75.
111. Sansone P, Storci G, Giovannini C, Pandolfi S, Pianetti S, Taffurelli M, Santini D, Ceccarelli C, Chieco P, Bonafé M. p66Shc/Notch-3 interplay controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded in vitro as mammospheres. *Stem Cells* 2007; 25(3): 807-15.
112. Harrison H, Farnie G, Howell SJ, Rock RE, Stylianou S, Brennan KR, Bundred NJ, Clarke RB. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res* 2010; 70(2):709-18.
113. Zang S, Ji Ch, Qu X, Dong X, Ma D, Ye J, Ma R, Dai J, Guo D. A study on Notch signaling in human breast cancer. *Neoplasma* 2007; 54(4): 304-10.
114. Santos L, León-Galván MF, Marino-Marmolejo EN. Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer. *Salud Pública Mex* 2006; 48:155-65.
115. Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H) *Curr Biol* 1995 ;5(12):1416-23.
116. Aster JC, Robertson ES, Hasserjian RP, Turner JR, Kieff E, Sklar J. Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J Biol Chem* 1997; 272(17):11336-43.
117. Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol* 1999; 154(3):785-94.
118. Nam Y, Weng AP, Aster JC, Blacklow SC. Structural requirements for assembly of the CSL intracellular Notch1 Mastermind-like 1 transcriptional activation complex. *J Biol Chem* 2003; 278(23): 21232-9.

119. Politi K, Feirt N, Kitajewski J. Notch in mammary gland development and breast cancer *Semin Cancer Biol* 2004;14(5):341-7.
120. Callahan R, Egan SE. J Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9(2): 145-63.
121. Li L, Huang GM, Banta AB, Deng Y, Smith T, Dong P, Friedman C, Chen L, Trask BJ, Spies T, Rowen L, Hood L. Cloning, Characterization, and the Complete 56.8-Kilobase DNA Sequence of the Human NOTCH4 Gene. *Genomics* 1998; 51(1): 45-58.
122. Sugaya K, Sasanuma S, Nohata J, Kimura T, Fukagawa T, Nakamura Y, Ando A, Inoko H, Ikemura T, Mita K. Gene organization of human NOTCH4 and (CTG)<sub>n</sub> polymorphism in this human counterpart gene of mouse proto-oncogene *Int3*. *Gene* 1997; 189(2): 235-44.
123. Rozanska M, Sobczak K, Jasinska A, Napierala M, Kaczynska D, Czerny A, Koziel M, Kozlowski P, Olejniczak M, Krzyzosiak WJ. CAG and CTG repeat polymorphism in exons of human genes shows distinct features at the expandable loci. *Hum Mutat.* 2007 May;28(5):451-81.
124. Wei J, Hemmings GP. The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nat Genet* 2000; 25(4): 376-7.
125. Skol AD, Young KA, Tsuang DW, Faraone SV, Haverstock SL, Bingham S, Prabhudesai S, Mena F, Menon AS, Yu CE, Rundell P, Pepple J, Sauter F, Baldwin C, Weiss D, Collins J, Keith T, Boehnke M, Schellenberg GD, Tsuang MT. Modest evidence for linkage and possible confirmation of association between NOTCH4 and schizophrenia in a large Veterans Affairs Cooperative Study sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 118B(1): 8-15.
126. Kaneko N, Muratake T, Amagane H, Sakurai M, Tanaka T, Tsuji S, Someya T. Transmission disequilibrium test and haplotype analysis of the NOTCH4 gene in Japanese patients with schizophrenia *Psychiatry Clin Neurosci* 2004; 58(2):199-205.

127. Glatt SJ, Wang RS, Yeh YC, Tsuang MT, Faraone SV. Five NOTCH4 polymorphisms show weak evidence for association with schizophrenia: evidence from meta-analyses. *Schizophr Res* 2005; 73(2-3): 281-90.
128. Imai K, Harada S, Kawanishi Y, Tachikawa H, Okubo T, Suzuki T. The (CTG)<sub>n</sub> polymorphism in the NOTCH4 gene is not associated with schizophrenia in Japanese individuals. *BMC Psychiatry* 2001; 1:1.
129. Ujike H, Takehisa Y, Takaki M, Tanaka Y, Nakata K, Takeda T, Kodama M, Fujiwara Y, Yamamoto A, Kuroda S. NOTCH4 gene polymorphism and susceptibility to schizophrenia and schizoaffective disorder. *Neurosci Lett* 2001; 301(1): 41-4.
130. Tochigi M, Zhang X, Umekage T, Ohashi J, Kato C, Marui T, Otowa T, Hibino H, Otani T, Kohda K, Liu S, Kato N, Tokunaga K, Sasaki T. Association of six polymorphisms of the NOTCH4 gene with schizophrenia in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 128B (1): 37-40.



**CAPÍTULO IV**  
**MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS**  
**Y LA ENZIMA AROMATASA: RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA**  
**INSULINA**



## IV.1 - INTRODUCCIÓN

### IV.1.1- HORMONAS SEXUALES ESTEROIDEAS Y METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Al margen del importante papel que las hormonas sexuales esteroideas desempeñan en la reproducción, existen evidencias de su implicación en el metabolismo de la glucosa. Datos clínicos y epidemiológicos han relacionado las concentraciones de andrógenos y estrógenos con la resistencia a insulina (RI) y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Numerosos estudios señalan que bajos niveles de testosterona en los varones se asocian con una mayor RI, y que aquellos hombres con menores niveles de esta hormona tienen alto riesgo de desarrollar DM2.<sup>1-11</sup> Algunos trabajos indican, además, que la concentración de testosterona puede predecir la aparición de esta enfermedad en los varones.<sup>3,4</sup>

Diversos ensayos clínicos han mostrado que la privación de andrógenos incrementa la adiposidad y la RI en los hombres.<sup>13,14</sup> Por el contrario, la administración de andrógenos a varones con hipogonadismo parece mejorar su sensibilidad a la misma.<sup>15-18</sup> Estudios llevados a cabo en ratas también han mostrado la capacidad de la testosterona para modular la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Aunque aún no está claro el mecanismo que se encuentra tras esta relación, la testosterona parece tener efecto sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos aislados de ratas.<sup>19</sup>

La testosterona también podría modular la sensibilidad a la insulina a través de cambios relacionados con la adiposidad y en el metabolismo de las grasas. Los resultados de estudios *in vitro* han señalado que la testosterona es capaz de regular la vía de diferenciación de células madres en adipocitos y en células musculares.<sup>20</sup>

En las mujeres la relación entre RI y los andrógenos parece ser la contraria a la observada en los varones, y condiciones hiperandrogénicas como el síndrome del ovario poliquístico han sido fuertemente asociadas con intolerancia a la glucosa y la RI.<sup>4,21-25,27,29</sup>

En cuanto al estradiol varios trabajos han mostrado una asociación entre altas concentraciones de esta hormona y la RI en las mujeres.<sup>4,24,26,28</sup> Esta asociación, sin embargo, no se ha observado en los varones.<sup>4,28,30-32</sup>

#### **IV.1.2- CITOQUINAS, RESISTENCIA A LA INSULINA Y HORMONAS SEXUALES**

Las citoquinas son proteínas o glucoproteínas solubles de bajo peso molecular esenciales para la comunicación intercelular. Son producidas por varios tipos celulares, pero sobre todo por células pertenecientes al sistema inmunitario, como macrófagos y linfocitos T. Las citoquinas actúan como mediadores celulares controlando muchas funciones fisiológicas, como la diferenciación y maduración celular, la inflamación y la respuesta inmune, la reparación tisular, la hematopoyesis, la apoptosis, y otros muchos procesos biológicos.<sup>33</sup>

Por lo general las citoquinas ejercen su acción de forma local mediante un mecanismo autocrino (cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora) o paracrino (sobre células vecinas). En algunos casos las citoquinas pueden ejercer también una acción endocrina, liberándose a la circulación sanguínea o linfática, y ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos de forma parecida a como lo hacen las hormonas.

Ciertas citoquinas como la leptina, la adiponectina, TNF- $\alpha$ , IL-6, y la resistina han sido asociadas con la resistencia a insulina. Trabajos recientes han identificado varias señales de transducción activadas por citoquinas, que podrían impedir la señalización del receptor en el músculo esquelético, en el hígado y en las células adiposas.<sup>34</sup>



### IV.1.2.1- Resistina y resistencia a la insulina

La resistina es una citoquina perteneciente a la familia de las pequeñas proteínas ricas en cisteína, que es producida principalmente por los adipocitos en ratones, y por macrófagos y monocitos en humanos. Actualmente existe una gran controversia con respecto al papel fisiológico de la resistina, que ha sido relacionada con la obesidad, la RI, la DM2 y la inflamación.<sup>35</sup>

Los primeros estudios llevados a cabo sobre la resistina señalaron que esta citoquina podía ejercer un efecto antagónico a la acción de la insulina.<sup>36,37</sup> En estos primeros estudios se observó que los niveles de esta citoquina se encontraban elevados en ratones obesos y diabéticos, y que sus niveles podrían disminuir por el uso de rosiglitazona y otras tiazolidinas que incrementan la sensibilidad a la insulina. También se observó que la administración de resistina recombinante a animales normales producía RI, mientras que la neutralización inmune de la resistina mejoraba la sensibilidad a la insulina.

Estas observaciones hicieron pensar que la resistina podría ser el nexo entre la obesidad y RI. Sin embargo, estudios posteriores realizados tanto en ratas como en humanos han mostrado resultados diversos. Mientras que muchos trabajos apuntan a una relación directa de la resistina con la RI, la obesidad y la DM2,<sup>38-43</sup> en otros no se encuentra ninguna relación<sup>44,45</sup> o es inversa a la observada por otros estudios.<sup>46-48</sup> Tampoco se ha podido identificar hasta el momento un receptor para la resistina que ayude a aclarar la función de esta citoquina y despejar las dudas sobre su papel en la RI.

### IV.1.2.2- Resistina y hormonas sexuales

Aunque se desconocen los factores implicados en la regulación de la resistina, algunos estudios indican que las hormonas sexuales podrían modular de alguna manera su expresión.<sup>49-51</sup>

Estudios *in vivo* llevados a cabo en roedores sugieren que los andrógenos son capaces de aumentar la expresión de la resistina en el tejido adiposo.<sup>49,52</sup> En humanos

también se ha observado una relación directa entre las concentraciones séricas de la testosterona y la resistina en mujeres con el síndrome del ovario poliquístico.<sup>53,54</sup>

Otras hormonas sexuales, como la dehidroepiandrosterona y el estradiol, también podrían tener influencia en los niveles de resistina. Así, mientras la dehidroepiandrosterona parece ser capaz de aumentar la expresión génica de la resistina en tejido adiposo,<sup>50</sup> el tratamiento de adipocitos de rata con estradiol podría disminuir los niveles de ARN<sub>m</sub> de la resistina y el contenido intracelular de la proteína tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>51</sup>

### IV.1.2.3- Leptina y resistencia a insulina

La leptina es una citoquina secretada principalmente por los adipocitos, que interviene en la regulación del metabolismo de la glucosa y de las grasas.<sup>55</sup> Está implicada en la homeostasis del peso corporal y actúa disminuyendo la ingesta de alimentos y aumentando el gasto energético. Sus niveles en suero muestran una relación directa con el índice de masa corporal y la cantidad de tejido adiposo.<sup>56</sup>

Las interacciones entre la leptina y la insulina han sido exploradas extensamente, y todo parece indicar que la leptina puede jugar un papel destacado en la fisiopatología de la RI relacionada con la obesidad. Se ha observado que existe una fuerte correlación positiva entre las concentraciones de leptina y las de insulina,<sup>57-61</sup> y que los niveles de leptina se asocian con la RI.<sup>62,63</sup> Existen indicios de que la leptina y la insulina son capaces de regularse mutuamente. Se ha sugerido que la leptina disminuye la síntesis de insulina y su secreción por las células  $\beta$  pancreáticas.<sup>58,64-67</sup> Al mismo tiempo la insulina parece estimular la producción de leptina en el adipocito, aunque sólo a largo plazo, por lo que permanece la duda de si este efecto es mediado por un incremento del tejido adiposo.

La fuerte asociación entre la leptina y la obesidad, así como el efecto de la obesidad sobre la sensibilidad a la insulina, hace difícil discernir si la relación entre la leptina y RI es independiente de la adiposidad. Así, mientras algunos estudios afirman que la relación entre ambas es independiente,<sup>62,68</sup> otros apuntan a que está mediada por la obesidad.<sup>69,70,72,81</sup>

#### IV.1.2.4- Relación entre la leptina y las hormonas sexuales

Los primeros indicios sobre la posible relación entre la leptina y las hormonas sexuales surgieron cuando se comprobó que los niveles séricos de leptina eran de dos a tres veces más elevados en las mujeres que en los hombres. Se pensó entonces que estas diferencias podían deberse a efectos directos de las hormonas sexuales sobre la producción de leptina (inductores en el caso de los gestágenos o estrógenos y/o supresores para los andrógenos), pero estudios posteriores apuntan a que probablemente estas diferencias en los niveles de leptina se deban a efectos indirectos de estas hormonas.<sup>73,74</sup>

No obstante los resultados de varios trabajos indican que tanto los andrógenos como los estrógenos son capaces de modular la expresión de la leptina. Así, mientras los estrógenos parecen incrementar la expresión del ARN<sub>m</sub> de la leptina,<sup>75</sup> la testosterona podría inhibir su expresión (tanto *in vitro* como *in vivo*) y su secreción por el tejido adiposo.<sup>76-78</sup> En este sentido diversos estudios han señalado la existencia de una asociación negativa entre la testosterona y la leptina sérica independiente de la grasa corporal.<sup>79-82</sup> También se ha comprobado que las concentraciones de leptina aumentan en varones con hipogonadismo,<sup>83-85</sup> y que estos niveles pueden restablecerse a valores normales al administrar testosterona.<sup>86</sup>

Al mismo tiempo, niveles elevados de leptina podrían ejercer efectos negativos sobre la producción de andrógenos y estrógenos. Se ha comprobado que la leptina es capaz de inhibir la secreción de testosterona en cultivos de células de Leyding de rata<sup>87,88</sup> y la producción de testosterona en los varones.<sup>89</sup> La leptina también parece disminuir la producción de estradiol en cultivos de células de la granulosa humana.<sup>77,90</sup>

### IV.1.3- MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y LA ENZIMA AROMATASA: SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

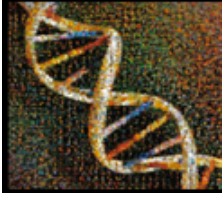
Como vimos en el capítulo I, tanto el receptor de andrógenos como la enzima aromatasa tienen un papel fundamental en el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas.

El primer exón del gen *AR* contiene dos microsatélites polimórficos,  $(CAG)_n$  y  $(GGC)_n$ , que codifican para un tracto repetitivo de residuos de glutaminas y glicinas respectivamente. Diversos estudios han mostrado que el número de repeticiones de estos microsatélites, situados en el dominio de transactivación del gen *AR*, se relacionan con la actividad transactivadora del receptor y el nivel de expresión del mismo.<sup>91-93</sup> Asimismo son varios los estudios que han relacionado la longitud de estos microsatélites con la concentración de andrógenos en suero.<sup>94-96</sup>

El gen que codifica para la enzima aromatasa (*CYP19*) posee en el intrón 4 el microsatélite polimórfico  $(TTTA)_n$ . Al igual que ocurre con los microsatélites del *AR*, la longitud de este polimorfismo ha sido relacionada con la actividad de esta enzima y las concentraciones de hormonas esteroideas.<sup>97,98</sup>

Algunos estudios han analizado el efecto de las variaciones en la longitud del microsatélite  $(CAG)_n$  sobre algunas variables relacionadas con la resistencia a insulina. En un estudio realizado en varones sanos, Zitzmann y cols.<sup>99</sup> observaron una correlación directa entre el número de repeticiones  $(CAG)_n$  y las concentraciones de insulina y leptina en suero. También Stanworth y cols.<sup>100</sup> hallaron una asociación positiva de la longitud del microsatélite  $(CAG)_n$  con los niveles de leptina y la obesidad en varones con diabetes tipo 2. Mohlig y cols. observaron que la longitud de este microsatélite era capaz de ejercer un efecto modificador de la RI en mujeres con síndrome del ovario poliquístico.<sup>101</sup> Rodríguez y cols.<sup>12</sup> observaron, en población canaria, una relación inversa entre la longitud del microsatélite  $(GGN)_n$  y las concentraciones de insulina e índice HOMA2IR en varones.

No conocemos estudios que hayan analizado la posible influencia del microsatélites  $(TTTA)_n$ .

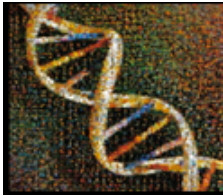


## IV.2- OBJETIVOS

Dadas las evidencias que relacionan las hormonas sexuales esteroideas con la RI, y papel que los microsatélites  $(CAG)_n$ ,  $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  podrían tener en la actividad del AR y la enzima aromatasa, nos propusimos conocer si la longitud de estos microsatélites mostraba alguna relación con variables fuertemente ligadas con la RI como el péptido C, la glucosa o el índice HOMA2IR.

También pretendíamos comprobar si la longitud de estos microsatélites guardaba alguna relación con otros factores asociados a la RI, como algunas medidas antropométricas (cintura abdominal, índice de masa corporal y el cociente entre la cintura abdominal y la pélvica) y las concentraciones de ciertas citoquinas (leptina y resistina).

Por último nos propusimos averiguar si existía alguna relación entre la longitud de estos microsatélites y las concentraciones en suero de testosterona y  $17\beta$ -estradiol.



## IV.3- MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.3.1- DISEÑO DEL ESTUDIO

#### IV.3.1.1- Participantes

Los participantes de este estudio fueron los primeros 1580 participantes reclutados por el estudio CDC de Canarias (los detalles sobre el estudio CDC de Canarias se encuentran recogidos en capítulo III el apartado 3.1.1 b).

#### IV.3.1.2- Recogida de los datos antropométricos

Los datos antropométricos empleados en este estudio fueron tomados durante la exploración física realizada a los participantes de la cohorte, procediendo de la siguiente manera:

- Peso: fue medido en posición erecta y sin calzado.
- Talla: fue medida en posición erecta y sin calzado.
- Cintura pélvica: circunferencia medida en posición erecta, a la altura de las caderas sobre las prominencias de los trocánteres mayores de ambos fémures y haciendo uso de una cinta métrica inextensible.
- Cintura abdominal: circunferencia trazada a nivel umbilical tomando como referencia la mitad de la distancia entre el margen costal inferior y las crestas iliacas.

El índice de masa corporal fue calculado a partir del peso del participante y la altura. El cociente entre la cintura abdominal y la pélvica fue usado como indicador de obesidad abdominal.

### IV.3.1.3- Mediciones bioquímicas

Las concentraciones de glucosa en suero fueron medidas dentro de las veinticuatro horas después de la extracción de sangre utilizando el test enzimático Gluco-quant Glucose/HK de Roche y el equipo Hitachi 917 autoanalyzer (coeficiente de variación intraensayo 1%, coeficiente de variación interensayo 1.8%).

Para determinar las concentraciones de péptido C, resistina y leptina se usó una alícuota de suero conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estas concentraciones fueron medidas mediante la técnica de ELISA basada en el principio de unión competitiva, usando para ello el autoanalizador Zenit de MENARINI y los siguientes kits comerciales:

- Péptido C: C-peptide-EASIA de Biosource (coeficiente de variación intraensayo 6.3%, coeficiente de variación interensayo 4.7%)
- Resistina: Resistin Human ELISA de BioVendor (coeficiente de variación intraensayo 7.0%, coeficiente de variación intersensayo 7.2%)
- Leptina: Leptin Serum-EASIA de Biosource (coeficiente de variación intraensayo 3.6%, coeficiente de variación intersensayo 6.8%).

La resistencia a la insulina fue estimada a partir de las concentraciones séricas de glucosa y péptido C. Para ello se usó el programa HOMA2 Calculator, proporcionado por el Oxford Centre for Diabetes Endocrinology and Metabolism (Universidad de Oxford) que se encuentra disponible en la página web (<http://www.dtu.ox.ac.uk/homa>). Este modelo está basado en el modelo matemático de homeostasis para la resistencia a insulina HOMA 2.

Las concentraciones de hormonas sexuales (17beta-estradiol estradiol y testosterona) fueron medidas a partir de alícuota de suero almacenada  $-80^{\circ}\text{C}$  mediante la técnica de ELISA basada en el principio de unión competitiva. Para ello se empleó el autoanalizador “Zenit” de MENARINI y los siguientes kits comerciales:

- Testosterona: Testosterone ELISA IBL (CV: intra ensayo: 3,6 %; inter ensayo: 6,1 %)
- 17beta-estradiol: 17β-Estradiol ELISA IBL (CV: intra ensayo: 3,7%; inter ensayo: 7,8 %)

#### IV.3.1.4- Medición de la longitud de los microsatélites

El ADN empleado para la medición de la longitud de los microsatélites se extrajo a partir de 200 µl de sangre usando el kit comercial PCR Template preparation (Roche). Mediante PCR se amplificaron, los fragmentos de los genes *AR* y *CYP19* donde se encuentran localizados los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub>.

Para esta amplificación se usaron parejas de primers que habían sido empleadas con anterioridad en otros estudios.<sup>102-104</sup> La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, conteniendo aproximadamente 60 ng de ADN, 200 µM de cada dNTP, 1X Fast Start Taq DNA polymerase buffer (Roche Applied Science), 1X GC-rich buffer solution (esta solución no fue usada para la amplificación del microsatélite TTTA<sub>n</sub>), 0.25 unidades de Fast Start Taq DNA polymerase, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1.2 µM de cada primer (un primer de cada pareja marcado con un fluorocromo). Las condiciones bajo las que se llevó a cabo la amplificación fueron las siguientes:

(CAG)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub>: 95 °C 5', (95 °C 45", 56 °C 30", 72 °C 30") 30 ciclos, 72 °C 7.'  
(GGC): 95 °C 5', (95 °C 1', 55 °C 2," 72 °C 30") 30 ciclos, 72 °C 7.'

A continuación el producto de PCR fue diluido 1:50-1:100 en agua destilada. Un microlitro de esta dilución se mezcló con 10 µL de formamida y 0.3 µL de GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). La mezcla se desnaturalizó a 95 °C durante 3' y se dejó enfriar en hielo. Los Fragmentos fueron separados mediante electroforesis capilar usando el analizador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos fue estimado con ayuda del software Gene Scan Analysis V 3.7 (Applied Biosystems).



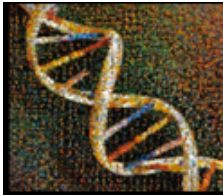
Posteriormente se procedió a la amplificación y secuenciación de estos microsatélites en diversas muestras para las que los fragmentos amplificados mostraron tamaños diferentes. Las condiciones de amplificación fueron idénticas a las descritas anteriormente, a excepción de que los primers utilizados no estaban marcados con fluorocromos. Para la reacción de secuenciación se empleó el kit comercial Big Dye Terminator Sequencing V3.1 (Applied Biosystems). La electroforesis capilar se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI Prism 3100. Los resultados fueron analizados con el programa sequencing análisis 3.7 (Applied Biosystems).

A partir de los resultados obtenidos se estableció la correspondiente relación entre el tamaño de los fragmentos amplificados y el número de repeticiones para cada microsatélite.

Teniendo en cuenta esta relación se estimó en las muestras restantes el número de repeticiones de los microsatélites, asignándoseles el alelo correspondiente.

### **IV.3.2- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las características generales de la población estudiada se reflejaron como la media  $\pm$  la desviación estándar. Las comparaciones de media entre grupos fueron realizadas mediante el test de la t de Student. Las correlaciones fueron estimadas mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $r_o$ ). Las asociaciones bivariadas encontradas fueron corroboradas mediante análisis de regresión lineal múltiple. La significación estadística se aceptó en todos los test al nivel del 5% bidireccional. Todos los análisis fueron hechos con el paquete estadístico para ciencias sociales (SPSS) (v. 13.0 para Windows).



## IV.4- RESULTADOS

### IV.4.1- CARACTERÍSTICAS DE LA PARTICIPANTES

Las características generales de los participantes de este estudio se encuentran recogidas en la tabla IV.1. Todas las variables analizadas mostraron diferencias significativas entre hombres y mujeres, excepto la concentración de resistina sérica, que resultó semejante en ambos sexos. Las mujeres, con una edad media mayor que la de los hombres, presentaron mayor índice de masa corporal, péptido C, leptina, índice HOMA2-IR y estradiol. Los varones presentaron mayor cintura abdominal, mayor cociente abdomen-pelvis, mayores concentraciones de glucosa y testosterona.

**Tabla IV. 1 Características generales de los participantes**

	<b>Hombres</b>		<b>Mujeres</b>		<b>p</b>
	<b>n</b>	<b>Media ± SD</b>	<b>n</b>	<b>Media ± SD</b>	
<b>Edad (años)</b>	680	49.8 ±0.4	900	52.8 ±0.3	<0.001
<b>Cintura (cm)</b>	679	96.5±0.5	896	91.0±0.4	<0.001
<b>Cintura/Cadera</b>	679	1.0±0.0	896	0.9±0.0	<0.001
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	676	28.0±0.2	893	29.1.±0.2	<0.001
<b>Glucosa (mmol/L)</b>	670	5.85±0.06	895	5.57±0.05	<0.001
<b>Peptido C (mg/dL)</b>	366	1.6±0.1	311	1.7±0.1	0.026
<b>HOMA2-IR</b>	355	3.6±0.1	303	4.1±0.2	0.035
<b>Leptina (ng/mL)</b>	406	2.5±0.2	348	11.8±0.5	<0.001
<b>Resistina (ng/mL)</b>	302	3.1±0.1	281	3.3±0.2	0.579
<b>Testosterona(ng/mL)</b>	283	4.62±0.1	364	0.36±0.02	<0.001
<b>17β-estradiol (pg/mL)</b>	283	23.62±1.1	364	40.89±4.1	<0.001

#### **IV.4.2- DISTRIBUCIÓN ALÉLICA PARA LOS MICROSATÉLITES (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> Y (TTTA)<sub>n</sub>**

Con respecto al microsatélite (CAG)<sub>n</sub> la población estudiada mostró 23 alelos diferentes, con tamaños comprendidos entre las 10 y las 36 repeticiones. La distribución alélica se aproximó a la normal. Los alelos más frecuentes fueron aquellos con 21 (18%), 19 (13%) y 24 repeticiones (13%). Para el microsatélite (GGC)<sub>n</sub> se hallaron 19 alelos de tamaños comprendidos entre 6 y 23 repeticiones. Los alelos más frecuentes fueron los de 16 repeticiones (54%) y 17 repeticiones (26%). Para la aromatasa se observaron 8 alelos de tamaños comprendidos entre 5 y 13 repeticiones. Los alelos más frecuentes fueron aquellos con 7 (56%) y 11 repeticiones (32%).

#### **IV.4.3- RELACIÓN ENTRE LA LONGITUD DE LOS MICROSATÉLITES (CAG)<sub>n</sub> Y (GGC)<sub>n</sub> Y (TTTA)<sub>n</sub> Y VARIABLES RELACIONADAS CON LA RI**

Para conocer si existía alguna relación entre la longitud de estos microsatélites y distintas variables relacionadas con la RI se llevaron a cabo análisis bivariados de correlación entre la longitud de los distintos microsatélites y las concentraciones en suero de glucosa, péptido C, leptina, resistina, índice HOMA2-IR y distintos índices antropométricos (Tablas IV.2 y IV.3).

En los varones la longitud del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> fue tomada como la media entre el número de repeticiones de los dos alelos. En el caso de las mujeres la longitud de los tres microsatélites fue tomada de dicha manera.

En estos análisis, tanto la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> del *AR* como la del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> de *CYP19*, mostraron para los varones una correlación inversa con los valores del péptido C ( $r_0 = -0.13$ ;  $r_0 = -0.21$ ) y el índice HOMA2-IR ( $r_0 = -0.12$ ;  $r_0 = -0.19$ ). En los varones la longitud de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> también se correlacionó de manera directa con las concentraciones de resistina sérica ( $r_0 = 0.13$ ;  $r_0 = 0.15$ ), mientras que la longitud del microsatélite (GGC)<sub>n</sub> lo hizo de manera inversa ( $r_0 = -0.15$ ).

En las mujeres la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> se correlacionó débilmente y de manera inversa con la glucosa sérica ( $r_0 = -0,09$ ), mientras que el número de

repeticiones (GGC)<sub>n</sub> mostró una correlación inversa con la concentración de resistina próxima a la significación estadística ( $r_0 = -0,12$ ).

Entre todas las medidas e índices antropométricos estudiados, sólo el cociente entre la cintura abdominal y la pélvica se correlacionó débilmente con el número medio de repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> en las mujeres ( $r_0 = -0,08$ ), aproximándose a la significación estadística en varones ( $r_0 = -0,08$ ). El resto de las variables analizadas no mostraron ninguna correlación con la longitud de estos microsatélites.

**Tabla IV.2 Análisis de correlación entre el número de repeticiones de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y distintas variables bioquímicas y antropométricas (varones)**

		Cintura	Cintura/ Cadera	IMC	Glucosa	Peptido C	HOMA2- IR	Resistina	Leptina
<b>Repeticiones (CAG)<sub>n</sub></b>	$r_0$	NS	NS	NS	NS	-0.13 <sup>†</sup>	-0.12 <sup>†</sup>	0.13 <sup>†</sup>	NS
	n	653	653	653	646	360	348	299	397
<b>Repeticiones (GGC)<sub>n</sub></b>	$r_0$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.15 <sup>†</sup>	NS
	n	580	580	580	575	291	280	218	318
<b>Repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> (Media)</b>	$r_0$	NS	-0.08 <sup>*</sup>	NS	NS	-0.21 <sup>§</sup>	-0.19 <sup>§</sup>	0.15 <sup>‡</sup>	NS
	n	566	566	566	560	289	278	220	315

Los superíndices (\*, †, ‡, §) indican  $p$  valores por debajo de 0.07, 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.

NS=no significativo

**Tabla IV. 3 Análisis de correlación entre el número de repeticiones de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y distintas variables bioquímicas y antropométricas (mujeres)**

		Cintura	Cintura/ Cadera	IMC	Glucosa	Peptido C	HOMA2- IR	Resistina	Leptina
<b>Repeticiones (CAG)<sub>n</sub> (Media)</b>	<i>r<sub>o</sub></i>	NS	NS	NS	-0.09 <sup>†</sup>	NS	NS	NS	NS
	n	829	829	829	831	297	289	273	333
<b>Repeticiones (GGC)<sub>n</sub> (Media)</b>	<i>r<sub>o</sub></i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-0.12 <sup>*</sup>	NS
	n	855	855	855	855	296	288	270	333
<b>Repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> (Media)</b>	<i>r<sub>o</sub></i>	NS	-0.08 <sup>†</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	n	850	850	850	850	301	296	277	338

Los superíndices (\*, †, ‡, §) indican *p* valores por debajo de 0.07, 0.05, 0.01 y 0.001, respectivamente.  
NS=no significativo

Para los varones también se realizaron diferentes análisis de regresión lineal multivariados, tomando como variables dependientes las concentraciones de péptido C, resistina e índice HOMA2IR, y como variables independientes la longitud de cada uno de estos microsatélites, así como otras variables relacionadas con la RI como la edad y el cociente abdomen-pelvis (Tablas IV.4-VI.6).

En los distintos modelos multivariados elaborados para la resistina, las longitudes de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (GGC)<sub>n</sub> mostraron nuevamente una asociación con las concentraciones de esta citoquina, tanto cuando se incluyó el péptido C como variable explicatoria ( $\beta=0.128$ ;  $p=0.030$ ) ( $\beta= -0.149$ ;  $p=0.032$ ), como cuando se empleó en su lugar el índice HOMA2IR ( $\beta=0.127$ ;  $p=0.036$ ) ( $\beta= -0.148$ ,  $p=0.038$ ). La longitud del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub> se asoció con los niveles de resistina cuando incluyó en el modelo el índice HOMA2IR como variable explicatorio ( $\beta=0.148$ ,  $p=0.039$ ), permaneciendo próxima a la significación estadística cuando en su lugar se incluyó el péptido C ( $\beta=0.128$ ,  $p=0.07$ ) (Tabla IV.4).

**Tabla IV.4 Modelos multivariados de regresión lineal con la resistina como variable dependiente (varones)**

<i>Variables explicatorias</i>	<i>Modelo 1</i>		<i>Modelo 2</i>		<i>Modelo 3</i>	
	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p
<i>PeptidoC</i>	-0.243	0.001	-0.204	0.005	-0.182	0.012
<i>Cintura/Cadera</i>	-0.186	0.004	-0.169	0.020	-0.172	0.019
<i>Edad</i>	0.043	0.496	0.043	0.540	0.063	0.372
<i>Repeticiones (CAG)<sub>n</sub></i>	0.128	0.030	NI	NI	NI	NI
<i>Repeticiones (GGC)<sub>n</sub></i>	NI	NI	-0.149	0.032	NI	NI
<i>Repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> (media)</i>	NI	NI	NI	NI	0.128	0.070
<i>Variables explicatorias</i>	<i>Modelo 4</i>		<i>Modelo 5</i>		<i>Modelo 6</i>	
	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p
<i>HOMA2IR</i>	-0.202	0.002	-0.198	0.007	-0.177	0.017
<i>Cintura/Cadera</i>	-0.184	0.005	-0.167	0.026	-0.169	0.025
<i>Edad</i>	0.052	0.432	0.050	0.493	0.070	0.333
<i>Repeticiones (CAG)<sub>n</sub></i>	0.127	0.036	NI	NI	NI	NI
<i>Repeticiones (GGC)<sub>n</sub></i>	NI	NI	-0.148	0.038	NI	NI
<i>Repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> (media)</i>	NI	NI	NI	NI	0.148	0.039

Los modelos (1-3) incluyen al péptido C como variable explicatoria

Los modelos (4-6) incluyen al índice HOMA2 como variable explicatoria

NI = no incluido

En los modelos multivariados no se observó asociación entre la longitud de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (GGC)<sub>n</sub> y los niveles de péptido C e índice HOMA2IR, aunque el número de repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> mostró una asociación con el péptido C próxima a la significación estadística (Tablas IV.5 y IV.6).

Estos modelos también mostraron una relación inversa entre la resistina y el péptido C, así como entre la resistina y la RI estimada mediante el índice HOMA2IR. De igual forma quedó patente la relación directa de la obesidad (cociente cintura/cadera) con el péptido C y la RI (índice HOMA2IR).

**Tabla IV. 5 modelos multivariados de regresión lineal con el Péptido C como variable dependiente (varones)**

Variables explicatorias	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p
<b>Resistina</b>	-0.202	0.001	-0.205	0.005	-0.179	0.012
<b>Cintura/Cadera</b>	0.106	0.100	0.168	0.021	0.181	0.012
<b>Edad</b>	0.170	0.007	0.108	0.126	0.070	0.317
<b>Repeticiones (CAG)<sub>n</sub></b>	-0.034	0.566	NI	NI	NI	NI
<b>Repeticiones (GGC)<sub>n</sub></b>	NI	NI	0.026	0.715	NI	NI
<b>Repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> (media)</b>	NI	NI	NI	NI	-0.130	0.062

NI = no incluido

**Tabla IV.6 Modelos multivariados de regresión lineal con el índice HOMA2IR como variable dependiente (varones)**

Variables explicatorias	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
	$\beta$	p	$\beta$	p	$\beta$	p
<b>Resistina</b>	-0.188	0.002	-0.187	0.010	-0.165	0.020
<b>Cintura/Cadera</b>	0.112	0.079	0.174	0.017	0.191	0.008
<b>Edad</b>	0.202	0.001	0.131	0.064	0.094	0.177
<b>Repeticiones (CAG)<sub>n</sub></b>	-0.037	0.533	NI	NI	NI	NI
<b>Repeticiones (GGC)<sub>n</sub></b>	NI	NI	0.037	0.599	NI	NI
<b>Repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> (media)</b>	NI	NI	NI	NI	-0.110	0.114

NI = no incluido

#### **IV.4.4- LONGITUD DE LOS MICROSATÉLITES (CAG)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub> Y (TTTA)<sub>n</sub> Y HORMONAS SEXUALES**

Para comprobar si existía alguna relación entre la concentración de hormonas sexuales (testosterona y 17  $\beta$ -estradiol) y la longitud de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, y (GGC)<sub>n</sub> del AR y (TTTA)<sub>n</sub> de la enzima aromatasa se realizaron análisis de correlación (ajustados por edad) entre las concentraciones de estas hormonas y la longitud de los distintos microsatélites (Tablas III.6 y III.7).

En estos análisis se observó una correlación positiva, próxima a la significación estadística entre la concentración de testosterona y la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub>

en los varones ( $r=0.11$ ;  $p=0.06$ ). La longitudes de los microsatélites  $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  no mostraron asociación con las concentración de testosterona ni de estradiol en ninguno de los dos sexos. Tampoco aparecieron diferencias cuando los análisis se hicieron de manera independiente en el grupo de mujeres pre- y post-menopáusicas.

Se realizaron, además, diferentes análisis de regresión lineal, tomando la concentración de hormonas (testosterona o estradiol) como variables dependientes y como variables explicatorias la edad, el índice masa corporal y la longitud de los distintos microsatélites categorizada en terciles. En estos análisis se observó nuevamente una asociación directa entre la concentración de testosterona y la longitud del microsatélite  $(CAG)_n$  en varones (coeficiente de correlación estandarizado  $\beta=0.134$ ;  $p=0.025$ ). No se observó ninguna asociación entre la longitud de los microsatélites  $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  y la concentración de testosterona o estradiol en ninguno de los dos sexos.

**TABLA IV. 7 Correlaciones parciales entre los microsatélites  $(CAG)_n$   $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  y hormonas sexuales en los varones.**

Microsatélites	n	Testosterona		Estradiol	
		r	p	r	p
<b>Repeticiones <math>(CAG)_n</math></b>	268	0.11	0.06	–	–
<b>Repeticiones <math>(GGC)</math></b>	197	-0.26	0.26	–	–
<b>Repeticiones <math>(TTTA)_n</math> (Media)</b>	198	0.03	0.65	0.03	0.67

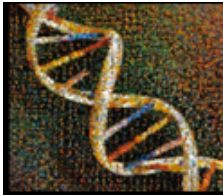
Correlaciones ajustadas por edad.



**TABLA IV. 8 Correlaciones parciales entre los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> (GGC)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y hormonas sexuales en las mujeres**

<i>Microsatélites</i>	<i>n</i>	<i>Testosterona</i>		<i>Estradiol</i>	
		<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>Repeticiones (CAG)<sub>n</sub> (media)</i>	243	-0.73	0.26	–	–
<i>Repeticiones (GGC)<sub>n</sub> (media)</i>	241	-0.95	0,14	–	–
<i>Repeticiones (TTTA)<sub>n</sub> (media)</i>	246	0.03	0.65	-0,24	0.71

Correlaciones ajustadas por edad.



## IV.5- DISCUSIÓN

Como hemos visto con anterioridad, diversos estudios y evidencias clínicas confirman la existencia de una relación entre las hormonas sexuales esteroideas y la RI. A pesar de ello, pocos trabajos han examinado la posible influencia de variaciones en genes implicados en el metabolismo de las hormonas sexuales sobre la misma. En este estudio hemos analizado las relaciones entre la longitud de los microsatélites polimórficos  $(CAG)_n$ ,  $(GGC)_n$  del gen del receptor de andrógenos y  $(TTTA)_n$  de la enzima aromatasa con el índice HOMA2IR y otras variables bioquímicas y antropométricas que han sido relacionadas con la RI.

Estos análisis mostraron la existencia de correlaciones entre el número de repeticiones de estos microsatélites y las concentraciones de péptido C, resistina e índice HOMA2-IR. En los análisis multivariados se pudo observar que la longitud de los microsatélites  $(CAG)_n$ ,  $(GGC)_n$  y  $(TTTA)_n$  se asociaba con las concentraciones de resistina en los varones. Sin embargo no se pudieron confirmar las asociaciones entre la longitud de los microsatélites  $(CAG)_n$  y  $(TTTA)_n$  con el péptido C e índice HOMA2-IR.

En las mujeres, al contrario que en los varones, no se observó una relación clara entre la longitud de estos microsatélites y las distintas variables relacionadas con la RI. Ello podría deberse a las diferencias entre sexos en las concentraciones, función y metabolismo de hormonas sexuales esteroideas (particularmente de los andrógenos). Otra posible explicación podría ser la desviación de los resultados hacia la nulidad en las mujeres, debida al empleo en el análisis del valor medio de los dos alelos (al estar situado el gen AR en el cromosoma X los varones poseen un único alelo para  $(CAG)_n$  y  $(GGC)_n$ , mientras que las mujeres poseen dos).

Los resultados de este estudio difieren de los hallados por Zitzmann y cols.<sup>99</sup> quienes observaron una correlación directa entre la longitud de las repeticiones  $(CAG)_n$  y las concentraciones de insulina en varones.<sup>99</sup> Aunque también nosotros hallamos

una correlación entre la longitud de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> y el péptido C en varones, esta resultó ser inversa, y no directa.

En cuanto al microsatélite (GGC)<sub>n</sub>, Rodríguez y cols.<sup>12</sup> en un trabajo realizado en población canaria, observaron una correlación inversa entre la longitud de este microsatélite y la concentración de insulina e índice HOMA en varones. En este estudio no pudimos observar una correlación equivalente para el microsatélite (GGC)<sub>n</sub>, no obstante los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> sí mostraron una correlación negativa con la concentración de péptido C y el índice HOMA2IR en los varones. La longitud del microsatélite (GGC)<sub>n</sub> se correlacionó negativamente con la concentración de resistina en varones, aproximándose a la significación estadística en las mujeres.

Contrariamente a lo observado en sus trabajos por Zitzman y cols.<sup>99</sup> y Stanworth y cols.<sup>100</sup> no hemos hallado ninguna relación entre el número de repeticiones (CAG)<sub>n</sub> y las concentraciones de leptina. Las discrepancias entre los resultados de estos estudios podrían deberse a diferencias en las características de la población estudiada, sexo, etc.

Con respecto a la relación observada entre la longitud de los microsatélites y la concentración de resistina, cabe señalar que los resultados de algunos estudios llevados a cabo en roedores indican que los andrógenos podrían ser capaces de regular la expresión de resistina en el tejido adiposo. Ling y cols.<sup>52</sup> hallaron un incremento de la expresión de la resistina en ratones con elevadas concentraciones de andrógenos. También Nogueiras y cols.<sup>49</sup> observaron un descenso en los niveles de ARNm de la resistina en ratones orquidectomizados.

A su vez Munir y cols.<sup>54</sup> encontraron que la resistina es capaz de aumentar la producción de andrógenos por el ovario humano, mientras que Nogueiras y cols.<sup>105</sup> observaron que esta citoquina puede incrementar la secreción de testosterona en el testículo de rata. En mujeres con el síndrome de ovario poliquístico también se ha hallado una correlación directa entre la concentración de testosterona y la de resistina sérica.<sup>53,54</sup>

Todo ello ha llevado a Nogueiras y cols.<sup>105</sup> a sugerir que andrógenos y resistina podrían regularse mutuamente, y que la resistina podría ser el nexo entre la RI y los andrógenos.

El hecho de que la asociación entre los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> con el péptido C e índice HOMA2-IR desaparezca al introducir en los modelos de regresión la concentración de resistina como variable explicatoria, podría indicar que dicha asociación está mediada por esta citoquina.

Nuestros resultados, por tanto, apoyan las observaciones de otros estudios que indican que los andrógenos son capaces de regular las concentraciones de resistina. Asimismo respaldan la hipótesis de Nogueiras y cols.<sup>105</sup> de que la resistina podría ser el nexo entre andrógenos y resistencia a insulina.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta sobre la resistina es su elevada heredabilidad. Un estudio realizado en baduinos<sup>106</sup> y otros dos estudios en humanos<sup>107,108</sup> han señalado que el background genético tiene una gran influencia en los niveles de esta citoquina. Se ha estimado que la contribución de los factores hereditarios a la variación de los niveles de resistina podría estar en torno al 70% en humanos.

Según los estudios realizados por Menzaghi y cols.<sup>107</sup> los niveles de resistina podrían estar regulados no solo por genes relacionados con las vías de resistencia a la insulina, sino otros genes ajenos a la misma. Dada la aparente relación existente entre andrógenos y resistina, es posible que variaciones en genes directamente relacionados con la actividad y el metabolismo de las hormonas sexuales, como es el caso de estos microsatélites polimórficos, pudieran tener influencia sobre las concentraciones de la misma.

Estudios previos indican que la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> tiene influencia sobre la actividad transactivadora del AR<sup>92,93</sup> disminuyendo a medida que aumenta el número de repeticiones del mismo.

La longitud del microsatélite (GGC)<sub>n</sub> también podría mostrar una correlación inversa con la concentración de proteína AR.<sup>109</sup> Además se ha encontrado una asociación directa entre la longitud de este microsatélite y el riesgo de desarrollar criptorquidismo, condición que ha sido relacionada con una baja androgenicidad.<sup>110</sup>

Con respecto al microsatélite (TTTA)<sub>n</sub>, se ha observado una mayor actividad de la aromatasa en fibroblastos de individuos portadores de alelos con alto número de repeticiones.<sup>97</sup>

La asociación de estos polimorfismos con la resistina es compleja de interpretar, pues mientras los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> y (TTTA)<sub>n</sub> se asocian a ella de manera directa, (GGC)<sub>n</sub> lo hace de forma inversa. El hecho de que varones menores concentraciones del receptor AR (debida a repeticiones cortas del microsatélite (GGC)<sub>n</sub>) o una menor actividad de la enzima aromatasa (debida a repeticiones largas del microsatélite (TTTA)<sub>n</sub>) presenten mayores concentraciones de resistina, parece estar en consonancia las observaciones de estudios previos que relacionan altas concentraciones de andrógenos con elevados niveles de resistina.<sup>49,52-54</sup>

Sin embargo la observación de que los varones con una reducida actividad del receptor de andrógenos (dada por un alto número de repeticiones en el microsatélite (CAG)<sub>n</sub>) presenten mayores niveles de resistina parece contradecir las observaciones de estos mismos estudios. No obstante, cabe la posibilidad de en un mismo individuo coexistan altas concentraciones de andrógenos con un AR de actividad reducida.

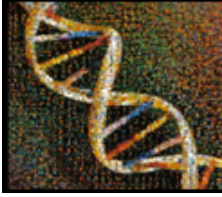
Dos estudios realizados por Crabbe y cols.<sup>96</sup> y Walsh y cols.<sup>111</sup> hallaron que la longitud de (CAG)<sub>n</sub> estaba positivamente asociada con la testosterona libre en varones. También nosotros hemos observado una asociación positiva entre la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> y la concentración de testosterona total en los varones. En otros estudios, sin embargo no se ha hallado dicha asociación,<sup>112,113</sup> e incluso trabajos como los de Westberg y cols.<sup>114</sup> y Brum y cols.<sup>95</sup> describen una relación inversa entre el número de repeticiones del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> y la concentración sérica de andrógenos en mujeres.

Por analogía con otros procesos fisiológicos cabría la posibilidad de que una menor actividad del AR pudiera generar cierto estado de resistencia a los andrógenos, lo cual explicaría la mayor concentración de los mismos. En este sentido se ha observado una marcada elevación de los niveles de testosterona al administrar antagonistas del AR,<sup>115</sup> y una reducción de la producción de andrógenos endógenos después de la administración de andrógenos exógenos.<sup>116</sup>

Aunque nuestros resultados parecen indicar la existencia de una relación entre la longitud de estos microsatélites y la RI en los varones mediada por la resistina, las asociaciones aquí encontradas resultan difíciles de interpretar, dado que todavía no se han establecido firmemente las relaciones entre andrógenos, resistina y resistencia a la insulina, ni tampoco entre la longitud de estos microsatélites y las concentraciones séricas de andrógenos.

En resumen: en este estudio hemos observado que el número de repeticiones de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub> del gen receptor de andrógenos y (TTTA)<sub>n</sub> de la enzima aromatasa, se asocia directamente con la concentración de resistina sérica en varones, mientras que la del microsatélite (GGC)<sub>n</sub> lo hace de manera inversa. A su vez hemos hallado que la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> se asocia positivamente con los niveles de testosterona en los varones.

Estos resultados apoyan los resultados de otros trabajos que indican la existencia de una relación entre la resistina y los andrógenos, y refuerzan la hipótesis de que la resistina podría ser un nexo entre andrógenos y resistencia a insulina.



## IV.6- BIBLIOGRAFÍA

1. Simon D, Preziosi P, Barrett-Connor E, Roger M, Saint-Paul M, Nahoul K, Papoz L. Interrelation between plasma testosterone and plasma insulin in healthy adult men: the Telecom Study. *Diabetologia* 1992; 35(2): 173-7.
2. Haffner SM, Shaten J, Stern MP, Smith GD, Kuller L. Low levels of sex hormone-binding globulin and testosterone predict the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in men. MRFIT Research Group. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996; 143 (9): 889–97.
3. Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O, Horton ES, McKinlay JB. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Diabetes Care* 2000; 23(4): 490-4.
4. Oh JY, Barrett-Connor E, Wedick NM, Wingard DL. Endogenous sex hormones and the development of type 2 diabetes in older men and women: the Rancho Bernardo study. *Diabetes Care* 2002; 25 (1): 55-60.
5. Rhoden EL, Ribeiro EP, Teloken C, Souto CA. Diabetes mellitus is associated with subnormal serum levels of free testosterone in men. *BJU Int* 2005; 96(6):867-70.
6. Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, Elahi D, Hayes FJ. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5): 2636-41.
7. Osuna JA, Gomez-Perez R, Arata-Bellabarba G, Villaroel V. Relationship between BMI, total testosterone, sex hormonebinding- globulin, leptin, insulin and insulin resistance in obese men. *Arch Androl* 2006; 52(5): 355–61.
8. Ding EL, Song Y, Malik VS, Liu S. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2006; 295(11): 1288–99.

9. Selvin E, Feinleib M, Zhang L, Rohrmann S, Rifai N, Nelson WG, Dobs A, Basaria S, Golden SH, Platz EA. Androgens and diabetes in men: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Diabetes Care* 2007; 30(2): 234-8.
10. Fukui M, Soh J, Tanaka M, Kitagawa Y, Hasegawa G, Yoshikawa T, Miki T, Nakamura N. Low serum testosterone concentration in middle-aged men with type 2 diabetes. *Endocr J* 2007; 54(6): 871-7.
11. Grossman M, Thomas MC, Panagiotopoulos S, Sharpe K, Macisaac RJ, Clark S, Zajac JD, Jerums G. Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(5): 1834-40.
12. Rodríguez-González G, Ramírez-Moreno R, Pérez P, Bilbao C, López-Ríos L, Díaz-Chico JC, Lara PC, Serra-Majem L, Chirino R, Díaz-Chico BN. The GGN and CAG repeat polymorphisms in the exon-1 of the androgen receptor gene are, respectively, associated with insulin resistance in men and with dyslipidemia in women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 113 (3-5): 202-8.
13. Smith JC, Bennett S, Evans LM, Kynaston HG, Parmar M, Mason MD, Cockcroft JR, Scanlon MF, Davies JS. The effects of induced hypogonadism on arterial stiffness, body composition, and metabolic parameters in males with prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(9): 4261-7.
14. Smith JC, Bennett S, Evans LM, Kynaston HG, Parmar M, Mason MD, Cockcroft JR, Scanlon MF, Davies JS. Insulin sensitivity during combined androgen blockade for prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(9): 4261-7.
15. Mårin P, Holmäng S, Jönsson L, Sjöström L, Kvist H, Holm G, Lindstedt G, Björntorp P. The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1992; 16(12): 991-7.
16. Simon D, Charles MA, Lahlou N, Nahoul K, Oppert JM, Gouault-Heilmann M, Lemort N, Thibault N, Joubert E, Balkau B, Eschwege E. Androgen therapy improves insulin sensitivity and decreases leptin level in healthy adult men with low plasma



- total testosterone: a 3-month randomized placebocontrolled trial. *Diabetes Care* 2001; 24(12): 2149- 51.
17. Pagotto U, Gambineri A, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Otto B, Castañeda T, Tschöp M, Pasquali R. Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9): 4139-43.
  18. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH .Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2006; 154(6): 899-906.
  19. Álvarez A, Díaz E, Huguez B, González RM. Glucemia, insulinemia y secreción de insulina en ratas hipoandrogenizadas e hiperandrogénicas. *Rev Cubana Endocrinol* 1999; 10(2): 133-19.
  20. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens Stimulate Myogenic Differentiation and Inhibit Adipogenesis in C3H 10T1/2 Pluripotent Cells through an Androgen Receptor-Mediated Pathway *Endocrinology* 2003; 144 (11): 5081-8.
  21. Toprak S, Yöнем A, Cakir B, Güler S, Azal O, Ozata M, Corakçi A. Insulin resistance in non obese patients with polycystic ovary syndrome. *Horm Res* 2001; 55(2): 65-70.
  22. Weerakiet S, Srisombut C, Bunnag P, Sangtong S, Chuangsoongnoen N, Rojanasakul A. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 75(2): 177-84.
  23. Park KH, Kim JY, Ahn CW, Song YD, Lim SK, Lee HC. Polycystic ovarian syndrome (PCOS) and insulin resistance. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 74(3): 261-67.
  24. Tok EC, Ertunc D, Evruke C, Dilek S. The androgenic profile of women with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Reprod Med* 2004; 49(9): 746-52.
  25. Gambineri A, Pelusi C, Manicardi E, Vicennati V, Cacciari M, Morselli-Labate AM, Pagotto U, Pasquali R. Glucose intolerance in a large cohort of mediterranean

- women with polycystic ovary syndrome: phenotype and associated factors. *Diabetes* 2004; 53(9): 2353-58.
26. Kalish GM, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Gulanski BI. Association of endogenous sex hormones and insulin resistance among postmenopausal women: results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(4): 1646-52.
27. Ciampelli M, Fulghesu AM, Cucinelli F, Pavone V, Ronsisvalle E, Guido M, Caruso A, Lanzone A. Impact of insulin and body mass index on metabolic and endocrine variables in polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999; 48(2):167-72.
28. Goodman-Gruen D, Barrett-Connor E. Sex differences in the association of endogenous sex hormone levels and glucose tolerance status in older men and women. *Diabetes Care* 2000; 23(7): 912-18.
29. Andersson B, Marin P, Lissner L, Vermeulen A, Bjorntorp P. Testosterone concentrations in women and men with NIDDM. *Diabetes Care* 1994; 17(5): 405-11.
30. Haffner SM, Karhapaa P, Mykkanen L, Laakso M. Insulin resistance, body fat distribution, and sex hormones in men. *Diabetes* 1994; 43(2): 212-19.
31. Muller M, Grobbee DE, den Tonkelaar I, Lamberts SWJ, van der Schouw YT. Endogenous sex hormones and metabolic syndrome in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5): 2618-23.
32. Haffner SM, Valdez RA, Mykkanen L, Stern MP, Katz MS. Decreased testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate concentrations are associated with increased insulin and glucose concentrations in nondiabetic men. *Metabolism* 1994; 43(5): 599-603.
33. K-abbas Abul K, Lichtman Andrew H., Poher Jordan S. (1995) *Inmunología celular y molecular* (268-291) Madrid:interamericana-McGraw-Hill.
34. Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(2):447-52.

35. Pang SS, Le YY. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol* 2006; 3(1): 29-34.
36. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409(6818): 307-12.
37. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Stepan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*. 2004; 303(5661):1195-8.
38. Osawa H, Tabara Y, Kawamoto R, Ohashi J, Ochi M, Onuma H, Nishida W, Yamada K, Nakura J, Kohara K, Miki T, Makino H. Plasma resistin, associated with single nucleotide polymorphism is correlated with insulin resistance, lower HDL cholesterol, and high-sensitivity C-reactive protein in the Japanese general population. *Diabetes Care* 2007; 30(6): 1501-6.
39. Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 2007; 156(2): 279-84.
40. Bo S, Gambino R, Pagani A, Guidi S, Gentile L, Cassader M, Pagano GF. Relationships between human serum resistin, inflammatory markers and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29(11): 1315-20.
41. Fujinami A, Obayashi H, Ohta K, Ichimura T, Nishimura M, Matsui H, Kawahara Y, Yamazaki M, Ogata M, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Nakano K, Ohta M. Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating human resistin: resistin concentrations in normal subjects and patients with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2004; 339(1-2): 57-63.
42. Hivert MF, Sullivan LM, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Meigs JB. Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor-alpha with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(8): 3165-72.

43. Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 2003; 149(4): 331-5.
44. Farvid MS, Ng TW, Chan DC, Barrett PH, Watts GF. Association of adiponectin and resistin with adipose tissue compartments, insulin resistance and dyslipidaemia. *Diabetes Obes Metab* 2005; 7(4): 406-13.
45. Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, Orlova C, Mantzoros CS. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(10): 4848-56.
46. Domínguez Coello S, Cabrera de León A, Almeida González D, González Hernández A, Rodríguez Pérez MC, Fernández Ramos N, Brito Díaz B, Castro Fuentes R, Aguirre Jaime A. Inverse association between serum resistin and insulin resistance in humans. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 82(2): 256-61.
47. Perseghin G, Burska A, Lattuada G, Alberti G, Costantino F, Ragogna F, Oggioni S, Scollo A, Terruzzi I, Luzi L. Increased serum resistin in elite endurance athletes with high insulin sensitivity *Diabetologia*. 2006; 49(8): 1893-900.
48. Haluzik MM, Lacinova Z, Dolinkova M, Haluzikova D, Housa D, Horinek A, Vernerova Z, Kumstyrova T, Haluzik M. Improvement of insulin sensitivity after peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment is accompanied by paradoxical increase of circulating resistin levels. *Endocrinology* 2006; 147(9): 4517-24.
49. Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res* 2003; 11(3): 408-14.
50. Kochan Z, Karbowska J. Dehydroepiandrosterone up-regulates resistin gene expression in white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 218(1-2): 57-64.

51. Huang SW, Seow KM, Ho LT, Chien Y, Chung DY, Chang CL, Lai YH, Hwang JL, Juan CC. Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 2005; 579(2): 449-54.
52. Ling C, Kindblom J, Wennbo H, Billig H. Increased resistin expression in the adipose tissue of male prolactin transgenic mice and in male mice with elevated androgen levels. *FEBS Lett.* 2001; 507(2): 147-50.
53. Panidis D, Koliakos G, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rousso D. Serum resistin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004(2); 81: 361-6.
54. Munir I, Yen HW, Baruth T, Tarkowski R, Azziz R, Magoffin DA, Jakimiuk AJ. Resistin stimulation of 17alpha-hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(8): 4852-7.
55. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995; 377(6549): 530-2.
56. Friedman JM. Leptin and the regulation of body weight. *Harvey Lect* 1999-2000; 95: 107-36.
57. Zimmet P, Hodge A, Nicolson M, Staten M, de Courten M, Moore J, Morawiecki A, Lubina J, Collier G, Alberti G, Dowse G. Serum leptin concentration, obesity, and insulin resistance in Western Samoans: cross sectional study. *BMJ* 1996; 313(7063): 965-9.
58. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 1996; 45(5): 699-701.
59. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996; 45(10): 1435-38.
60. Girard J. Is leptin the link between obesity and insulin resistance? *Diabetes Metab* 1997; 23 Suppl 3: 16-24.

61. Dagogo-Jack S, Fanelli C, Paramore D, Brothers J, Landt M. Plasma leptin and insulin relationships. *Diabetes* 1996; 45(5): 695-8.68
62. Segal KR, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes* 1996; 45(7): 988-991. 69.
63. Wannamethee SG, Tchernova J, Whincup P, Lowe GD, Kelly A, Rumley A, Wallace AM, Sattar N Plasma leptin: associations with metabolic, inflammatory and haemostatic risk factors for cardiovascular disease..*Atherosclerosis* 2007; 191(2): 418-26.
64. Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J* 2002; 16(10): 1163–76.
65. Covey SD, Wideman RD, McDonald C, Unniappan S, Huynh F, Asadi A, Speck M, Webber T, Chua SC, Kieffer TJ. The pancreatic beta cell is a key site for mediating the effects of leptin on glucose homeostasis. *Cell Metab* 2006; 4: 291–302.
66. Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic  $\beta$ -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(1): E1–E14.
67. Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S152-8.
68. Zimmet PZ, Collins VR, de Courten MP, Hodge AM, Collier GR, Dowse GK, Alberti KG, Tuomilehto J, Hemraj F, Gareeboo H, Chitson P, Fareed D. Is there a relationship between leptin and insulin sensitivity independent of obesity? A population-based study in the Indian Ocean nation of Mauritius. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998 Feb; 22(2): 171-7.
69. Havel P, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson P, Gingerich R, Stern J. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: Effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(12): 4406-13.

70. Dua A, Hennes M, Hoffman R, Maas D, Krakower G, Sonnenberg G, Kissebah A. Leptin: A significant indicator of total body fat but not of visceral fat and insulin insensitivity in African-American women. *Diabetes* 1996; 45(11): 1635-7.
71. Larsson H, ElmstaÉhl S, AhreÂn B. Plasma leptin levels correlate to islet function independently of body fat in postmenopausal women. *Diabetes* 1996; 45(11): 1580-4.
72. Turpeinen A, Haffner S, Louheranta A, Niskanen L, Miettinen H, Uusitupa M. Serum leptin in subjects with impaired glucose tolerance in relation to insulin sensitivity and first-phase insulin response. *Int J Obes* 1997; 21(4): 284-7.
73. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, Heymsfield SB, Gallagher D, Chu F, Leibel RL. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentration of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9): 3424-7.
74. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V. Sexual dimorphism in plasma leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(2): 579-84.
75. Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, Mori M. Oestrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 1997; 154(2): 285-92.
76. Wabitsch M, Blum WF, Muehle R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner H. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 1997; 100(4): 808-13.
77. Ostlund RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(11): 3909-13.
78. Machinal F, Dieudonne MN, Leneuve MC, Pecquery R, Giudicelli Y. *In vivo* and *in vitro* gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology* 1999; 140(4): 1567-74.
79. Vettor R, De Pergola G, Pagano C, Englaro P, Laudadio E, Giorgino F, Blum WF, Giorgino R, Federspil G. Gender differences in serum leptin in obese people.

- Relationships with testosterone, body fat distribution and insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest* 1997; 27(12): 1016–24.
80. Haffner SM, Miettinen H, Karhapaa P, Mykkanen L, Laakso M. Leptin concentrations, sex hormones, and cortisol in non-diabetic men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6): 1807–09.
81. Sih R, Morley JE, Kaiser FE, Perry III HM, Patrick P, Ross C. Testosterone replacement in older hypogonadal men: a 12-month randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6): 1661–67.
82. Arslanian S, Suprasongsin C. Testosterone treatment in adolescent with delayed puberty: changes in body composition, protein, fat, and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(10): 3123–220.
83. Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF. Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics* 1996; 98 (2 Pt 1): 201–03.
84. Wabitsch M, U. Braun, E. Heinze, R. Mucbe, H. Mayer, W. Teller, and C. Fusch. Body composition in 5–18-y-old obese children and adolescents before and after weight reduction as assessed by deuterium dilution and bioelectrical impedance analysis. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(1):1–6.
85. Wabitsch M, Braun U, Heinze E, Mucbe R, Mayer H, Teller W, Fusch C. Promoting effects of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 1989; 84(5): 1663–70. 94.
86. JockenhoÈvel F, Blum W, Vogel E, Englaro P, MuÈller-Wieland D, Dankwart R, Rascher W, Krone W. Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. *Clin Endocrinol and Metab* 1997; 82(8): 2510-13.
87. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau M, Fabbri A. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 1999; 140(11); 4939–47.
88. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis *in vitro*. *J Endocrinol* 1999; 161(2): 211–18. 97.



89. Isidori AM, Caprio M, Strollo F, Moretti C, Frajese G, Isidori A, Fabbri A. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgens levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(10): 3673–80.
90. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM & Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82(12): 4144-41.
91. Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(1): 85-96.
92. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *Prostate* 2004; 58(1): 23-32.
93. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(15): 3181-6.
94. Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, Hellstrand M, Landén M, Jansson M, Holm G, Björntorp P, Eriksson E. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(6): 2562-8.
95. Brum IS, Spritzer PM, Paris F, Maturana MA, Audran F, Sultan C. Association between androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and plasma testosterone levels in postmenopausal women. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12(2): 135-41.
96. Crabbe P, Bogaert V, De Bacquer D, Goemaere S, Zmierzak H, Kaufman JM. Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback setpoint : contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(9): 3604-10. 107.
97. Gennari L, Masi L, Merlotti D, Picariello L, Falchetti A, Tanini A, Mavilia C, Del Monte F, Gonnelli S, Lucani B, Gennari C, Brandi ML. A polymorphic CYP19 TTTA

- repeat influences aromatase activity and estrogen levels in elderly men: effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6): 2803-10.
98. Baghaei F, Rosmond R, Westberg L, Hellstrand M, Eriksson E, Holm G, Björntorp P. The CYP19 gene and associations with androgens and abdominal obesity in premenopausal women. *Obes Res* 2003; 11(4): 578-85.
99. Zitzmann M, Gromoll J, von Eckardstein A, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of leptin and insulin in men. *Diabetologia* 2003; 46(1): 31-9.
100. Stanworth RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2008; 159(6): 739-46.
101. Möhlig M, Jürgens A, Spranger J, Hoffmann K, Weickert MO, Schlösser HW, Schill T, Brabant G, Schüring A, Pfeiffer AF, Gromoll J, Schöfl C. The androgen receptor CAG repeat modifies the impact of testosterone on insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2006; 155(1): 127-30.
102. Sleddens HF, Oostra BA, Brinkmann AO, Trapman J. Trinucleotide (GGN) repeat polymorphism in the human androgen receptor (AR) gene. *Hum Mol Genet.* 1993; 2(4): 493.
103. Bharaj BS, Vassilikos EJ, Diamandis EP Rapid and accurate determination of (CAG)<sub>n</sub> repeats in the androgen receptor gene using polymerase chain reaction and automated fragment analysis. *Clin Biochem* 1999; 32(5): 327-32.
104. Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiba H, Kusuki I, Tsukamoto K, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Honjo H. Association of the CYP17 gene and CYP19 gene polymorphisms with risk of endometriosis in Japanese women. *Hum Reprod* 2002; 17(4) : 897-902 .
105. Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytán F, Suominen JS, Navarro VM, Casanueva FF, Aguilar E, Toppari J, Diéguez C, Tena-Sempere M. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 15):: 3247-57. 121.

106. Tejero ME, Freeland-Graves JH, Proffitt JM, Peebles KW, Cai G, Cole SA, Comuzzie AG. Adiponectin but not resistin is associated with insulin resistance-related phenotypes in baboons. *Obes Res* 2004; 12(5): 871-7.
107. Menzaghi C, Coco A, Salvemini L, Thompson R, De Cosmo S, Doria A, Trischitta V. Heritability of serum resistin and its genetic correlation with insulin resistance-related features in nondiabetic Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(7): 2792-5.
108. Pantsulaia I, Livshits G, Trofimov S, Kobylansky E. Genetic and environmental determinants of circulating resistin level in a community-based sample. *Eur J Endocrinol* 2007; 156(1): 129-35.
109. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 2005; 62(2): 133-9.
110. Aschim EL, Nordenskjöld A, Giwercman A, Lundin KB, Ruhayel Y, Haugen TB, Grotmol T, Giwercman YL. Linkage between cryptorchidism, hypospadias, and GGN repeat length in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10): 5105-9.
111. Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, Metter EJ, Hurley BF, Ferrell RE, Roth SM1. Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol* 2005; 98(1):132-7.
112. Van Pottelbergh I, Lumbroso S, Goemaere S, Sultan C, Kaufman JM. Lack of influence of the androgen receptor gene CAG-repeat polymorphism on sex steroid status and bone metabolism in elderly men. *Clin Endocrinol(Oxf)* 2001;55(5):659–66.
113. Canale D, Caglieresi C, Moschini C, Liberati CD, Macchia E, Pinchera A, Martino E. Androgen receptor polymorphism (CAG repeats) and androgenicity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63(3):356–361.
114. Westberg L, Baghaei F, Rosmond R et al. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2562-8.

115. Brufsky A, Fontaine-Rothe P, Berlane K, Rieker P, Jiroutek M, Kaplan I, Kaufman D, Kantoff P. Finasteride and flutamide as potency-sparing androgen-ablative therapy for advanced adenocarcinoma of the prostate. *Urology*; 49(6):913–20.
116. Cooper CS, Perry PJ, Sparks AE, MacIndoe JH, Yates WR, Williams RD. Effect of exogenous testosterone on prostate volume, serum and semen prostate specific antigen levels in healthy young men. *J Urol* 1998; 159(2):441–43.



**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES**



## V. CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo sobre los microsatélites polimórficos situados en los genes *AR*, *CYP19*, *E2F4*, *EGFR* y *NOTCH4* descritos en esta memoria nos permite concluir:

1. Las distribuciones de frecuencias alélicas observadas entre las participantes de este estudio para los microsatélites  $(CAG)_n$  y  $(GGC)_n$  del gen receptor de andrógenos y  $(TTTA)_n$  de la enzima aromatasa fueron similares a las halladas en otras poblaciones caucásicas.
2. Las mujeres portadoras de alelos con una longitud media superior a las 22 repeticiones para el microsatélite  $(CAG)_n$  del receptor de andrógenos presentan mayor riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas con una longitud igual o inferior a este número de repeticiones.
3. La longitud de los microsatélites  $(GGC)_n$  del receptor de andrógenos y  $(TTTA)_n$  de la enzima aromatasa, no se asoció con el cáncer de mama cuando la longitud de ambos microsatélites fue considerada de manera independiente.
4. Las mujeres que presentan una combinación larga para la longitud media de los tres microsatélites ( $CAG > 22$  repeticiones,  $GGC \geq 17$  repeticiones y  $TTTA > 7$  repeticiones) presentan mayor riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas con la combinación más corta ( $CAG \leq 22$ ,  $GGC < 17$  y  $TTTA \leq 7$  repeticiones). Estas observaciones apoyan la hipótesis del papel protector que los andrógenos juegan en el desarrollo del cáncer de mama.
5. Hemos hallado nuevos alelos para el microsatélite  $(AGC)_n$  situado en el gen *E2F4*. Confirmamos por tanto que se trata de un microsatélite polimórfico, aunque la mayoría de sus alelos presentan una baja frecuencia en la población.

6. La distribución de frecuencias alélicas observadas para los microsatélites (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* y (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* son similares a la observadas en otras poblaciones.
7. No encontramos asociación entre la longitud de los microsatélites (CA)<sub>n</sub> de *EGFR* y (CTG)<sub>n</sub> de *NOTCH4* y el cáncer de mama.
8. La longitud de los microsatélites (CAG)<sub>n</sub>, y (TTTA)<sub>n</sub> del receptor de andrógenos y la enzima aromatasa se asocia de manera directa con la concentración de resistina sérica en varones, mientras que el microsatélite (GGC)<sub>n</sub> del receptor de andrógenos lo hace de manera inversa. Estos resultados apoyan la existencia de una relación entre la resistina y los andrógenos, y refuerzan la hipótesis de que la resistina podría ser un nexo entre los andrógenos y la resistencia a insulina.
9. La longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> se asocia de manera directa a la concentración de testosterona sérica en los varones.