



Pineda-Moncusi M¹, Rodríguez-Sanz M¹, Díez-Pérez A^{1,2}, Aymar I^{1,2}, Martos T³, Servitja S³, Tusquets I³, García-Giralt N¹, Nogués X^{1,2}

¹ IMIM (Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas) - Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF) - Instituto de Salud Carlos III FEDER - Barcelona (España)

² Departamento de Medicina Interna - Parque de Salud Mar - Universidad Autónoma de Barcelona - Barcelona (España)

³ IMIM (Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas) - Departamento de Oncología Médica - Medical Oncology Department - Parque de Salud Mar - Barcelona (España)

Análisis genético de enzimas de la vía esteroidal asociadas a efectos adversos musculoesqueléticos de los inhibidores de la aromatasa

Correspondencia: Natalia García-Giralt - Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM) - Carrer del Dr. Aiguader, 88 - 08003 Barcelona (España)
Correo electrónico: ngarcia@imim.es

Fecha de recepción: 20/12/2016

Fecha de aceptación: 09/03/2017

Trabajo remitido como prestación de una beca de Investigación Básica FEIOMM 2012.

Resumen

Objetivos: Identificar putativas variantes funcionales en los genes *CYP11A1* y *CYP17A1* asociadas a efectos musculoesqueléticos (pérdida acelerada de la masa ósea y artralgias) derivados del tratamiento con inhibidores de la aromatasa (IA).

Material y métodos: La cohorte B-ABLE es un estudio prospectivo de mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama en tratamiento con IA. La densidad mineral ósea en columna lumbar y cuello femoral se midió mediante densitometría, y el dolor articular mediante escala analógica visual. A partir de polimorfismos de cambio de un nucleótido (SNPs) en los genes *CYP11A1* (rs4077581, rs11632698 y rs900798) y *CYP17A1* (rs4919686, rs4919683, rs4919687, rs3781287, rs10786712, rs6163, rs743572), asociados previamente con eventos musculoesqueléticos, se construyeron los haplotipos para cada paciente de la cohorte, y se seleccionaron aquellos que mostraron mayor diferencia fenotípica ($p < 0,05$). Dentro de cada haplotipo, se eligieron aquellas pacientes con fenotipos extremos para la secuenciación de los respectivos genes y la identificación de variantes genéticas funcionales. Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple contemplando los modelos de herencia genética dominante, recesivo y aditivo.

Resultados: No se encontró ninguna mutación en las regiones codificantes. En la región del promotor basal del gen *CYP11A1* se encontró una variante genética (D15S520) asociada a la pérdida de masa ósea del cuello de fémur a los 24 meses de tratamiento con IA.

Conclusiones: Variantes en regiones reguladoras del gen *CYP11A1* podrían modular la expresión de este gen, explicando así parte de la variabilidad fenotípica encontrada en la pérdida de hueso de las pacientes en tratamiento con IA.

Palabras clave: *inhibidores de la aromatasa, cáncer de mama, artralgia, densidad mineral ósea, CYP11A1, CYP17A1, estudio de asociación genética.*



Genetic analysis of steroid pathway enzymes associated with adverse musculoskeletal effects of aromatase inhibitors

Summary

Objetives: Identify putative functional variants in the *CYP11A1* and *CYP17A1* genes associated with musculoskeletal effects (accelerated bone mass loss and arthralgia) derived from treatment with aromatase inhibitors (AI).

Material and methods: The B-ABLE cohort is a prospective study of postmenopausal women with breast cancer undergoing AI treatment. Bone mineral density in the lumbar spine and femoral neck was measured by densitometry and joint pain using visual analogue scale. From single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes *CYP11A1* (rs4077581, rs11632698 and rs900798) and *CYP17A1* (rs4919686, rs4919683, rs4919687, rs3781287, rs10786712, rs6163, rs743572), previously associated with musculoskeletal events, haplotypes were constructed for each patient from the cohort, and those haplotypes that showed greatest phenotypic differences were chosen ($p < 0.05$). Within each haplotype, patients with extreme phenotypes were chosen for the sequencing of respective genes and identifying functional genetic variants. Finally, a multiple linear regression analysis was carried out considering the models of dominant, recessive and additive genetic inheritance.

Results: No mutation was found in coding regions. A genetic variant (D15S520), in the basal promoter region of gene *CYP11A1*, was found associated with femoral neck bone loss at 24 month of AI treatment.

Conclusions: Variants in regulatory regions of the *CYP11A1* gene could modulate the expression of this gene, thus explaining part of the phenotypic variability found in bone loss of patients undergoing AI treatment.

Key words: aromatase inhibitors, breast cancer, arthralgia, bone mineral density, *CYP11A1*, *CYP17A1*, genetic association study.

Introducción

El uso de los inhibidores de la aromatasa (IA) como terapia coadyuvante después de la cirugía, y/o la radioterapia, y/o la quimioterapia, ha logrado un aumento significativo de la supervivencia en mujeres postmenopáusicas diagnosticadas de cáncer de mama con receptores hormonales (estrógenos y/o progesterona) positivos (RH), en estadios iniciales^{1,2}.

La acción de la aromatasa sobre la testosterona y la androstendiona produce estradiol y estrona³. Estos dos componentes constituyen la principal fuente de estrógenos en la mujer postmenopáusica. Este proceso de aromatización se realiza en los tejidos periféricos, como el tejido adiposo y el músculo. Aproximadamente dos terceras partes de los tumores mamarios han demostrado tener actividad aromatasa, produciendo localmente estrógenos en el propio tumor que estimulan el crecimiento de las células mamarias tumorales⁴. Los IA bloquean directamente la producción de estrógenos en el tumor y además provocan una drástica reducción de los niveles de estrógenos circulantes⁵.

La sostenida privación estrogénica derivada de la terapia con IA provoca una pérdida acelerada de la masa ósea, aumentando el riesgo de sufrir una fractura osteoporótica⁶. Asimismo, los IA también pueden producir otros efectos adversos musculoesqueléticos como artralgias y dolores musculares, que pueden afectar al cumplimiento de la terapia durante los años de tratamiento prescrito^{7,8}.

Por otro lado se ha observado que las pacientes tratadas con IA muestran una gran variabilidad interindividual en la aparición e intensidad de los síntomas musculoesqueléticos, sugiriendo que exis-

ten factores que pueden aumentar su aparición. En este sentido, los niveles de vitamina D (Vit D) se han relacionado con la aparición de artralgias⁹. Asimismo, probablemente también existe una base genética que modularía, en parte, el efecto de los IA. Diversos estudios han relacionado variantes genéticas asociadas al aumento de dolor y la pérdida de masa ósea en mujeres tratadas con IA de la cohorte B-ABLE^{10,11}.

Concretamente, polimorfismos de cambio de un nucleótido (SNPs) en el gen *CYP11A1*: rs4077581, rs11632698 y rs900798 se asociaron con la pérdida de densidad mineral ósea (DMO) en cuello femoral (CF) a los 2 años de tratamiento con IA¹¹. El gen *CYP11A1* codifica la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (nombre alternativo: P450scc) que cataliza el paso primero y limitante de la esteroidogénesis, convirtiendo el colesterol en pregnenolona. Además, la P450scc también puede hidroxilar la vitamina D₂, D₃ y sus precursores^{12,13}, sugiriendo un amplio espectro de funciones en el metabolismo celular.

Por otro lado, siete SNPs del gen *CYP17A1* (rs4919686, rs4919683, rs4919687, rs3781287, rs10786712, rs6163, rs743572) se asociaron con el aumento de dolor al año de tratamiento con IA¹⁰. El *CYP17A1* (17 α -hidroxilasa/17,20 liasa) es una enzima clave en la vía esteroidogénica que produce progestinas, mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos, y estrógenos.

Ninguno de los SNPs de los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*, previamente genotipados, provocan cambios no sinónimos en la proteína, ni se conoce que tengan ninguna función reguladora de la expresión génica.



Es posible que variantes funcionales de los genes implicados, tanto en la región codificante, que modificarían la actividad del enzima, como en regiones reguladoras, que regularían los niveles de expresión génica, pudieran estar implicadas en los efectos secundarios de los IA. Por ello, el objetivo del estudio es la identificación de variantes putativamente funcionales en los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*.

Material y métodos

Población de estudio

La cohorte B-ABLE (Barcelona – *Aromatase induced Bone Loss in Early breast cancer*) es la población de un estudio prospectivo donde se incluyen pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama RH positivo, y tratadas en el Hospital del Mar de Barcelona. Las participantes reciben IA (letrozol, exemestano o anastrozol) durante 5 años, o de manera alternativa después de 2 ó 3 años de tratamiento con tamoxifeno (3 y 2 años de IA, respectivamente), de acuerdo a las recomendaciones de la *American Society of Clinical Oncology*, empezando dentro de las 6 semanas después de la cirugía ó 1 mes después del último ciclo de quimioterapia¹⁴.

Los criterios de exclusión fueron: alcoholismo, insuficiencia renal de grado superior al 3b, artritis reumatoide, enfermedades metabólicas óseas diferentes a la osteoporosis, enfermedad de Paget, osteomalacia, hiperparatiroidismo primario, hipertiroidismo, diabetes *mellitus* insulino dependiente, tratamiento previo o en curso con antirresortivos, corticosteroides orales o cualquier otro fármaco que pudiera afectar el metabolismo óseo, excepto tamoxifeno.

Mediciones

Densidad mineral ósea

Al inicio y cada 12 meses hasta la finalización del tratamiento se midió la DMO a nivel lumbar (CL L1–L4), cuello femoral (CF) y cadera total (CT) utilizando el densitómetro de energía dual de rayos X (DXA) QDR 4500 SL® (Hologic, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). El coeficiente de variación para esta técnica en nuestro centro es del 1% en CL y del 1,65% en CF. Se excluyeron en el seguimiento aquellas densitometrías cuyas imágenes presentaban artefactos, enfermedad degenerativa del disco con osteofitos, artrosis con hiperostosis de las articulaciones facetarias, fracturas vertebrales y/o calcificaciones aórticas, y todas aquellas que pudieran causar un falso aumento de la DMO, de acuerdo a la descripción de Blake *et al.*¹⁵. Posteriormente se analizó mediante el valor de pérdida relativa de masa ósea.

Escala visual analógica

El dolor articular se midió utilizando la escala visual analógica (EVA), medido al inicio, a los 3 meses y cada 12 meses hasta el final del estudio. Se valoró el dolor de las articulaciones: manos, hombros, rodillas, caderas, tobillos y pies, en una escala del 1 al 10 con decimales. Posteriormente se analizó mediante el cambio absoluto de EVA.

Variables demográficas

Se recogió información de un gran número de variables clínicas en el momento del reclutamiento, incluyendo la edad, las edades de menarquia y menopausia, el tiempo de lactancia, el número de partos, la quimioterapia y radioterapia previa, tratamientos adyuvantes, el peso, la talla, el tabaquismo y la ingesta de calcio mediante la encuesta INDICAD¹⁶.

Construcción de haplotipos

En estudios previos en la cohorte B-ABLE se genotiparon SNPs localizados en los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*^{10,11}. Los SNPs que mostraron una asociación estadísticamente significativa con los fenotipos evaluados se escogieron para la construcción de los haplotipos (Figura 1).

Para establecer la relación de los haplotipos del gen *CYP11A1* con los SNPs rs4077581, rs11632698 y rs900798 en la cohorte B-ABLE, se calcularon las frecuencias haplotípicas con el análisis haplo.em y se escogieron los haplotipos más comunes (frecuencia >0,01).

Los haplotipos del gen *CYP17A1* se construyeron de la misma manera con los SNPs rs743572, rs6163, rs10786712, rs3781287, rs4919687, rs4919686 y rs4919683.

A cada haplotipo se le asignó un código para facilitar su nomenclatura durante el estudio.

Extracción de ADN y secuenciación Sanger

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre periférica empleando el kit de purificación de ADN Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA). Se amplificaron las regiones codificantes, 5'UTR, 3'UTR y promotor proximal (hasta el -601 pb para el *CYP11A1* y -589 pb para el *CYP17A1*) con los *primers* descritos en la tabla 1.

La secuenciación se efectuó mediante el método de Sanger. Las secuencias fueron analizadas con el programa *Sequence Scanner* (v1.0) y el alineamiento con la secuencia de referencia (NCBI Reference Sequence: *CYP11A1* NG_007973.1 y *CYP17A1* NG_007955.1) se llevó a cabo a través del *Multiple Sequence Alignment* (EMBL-EBI).

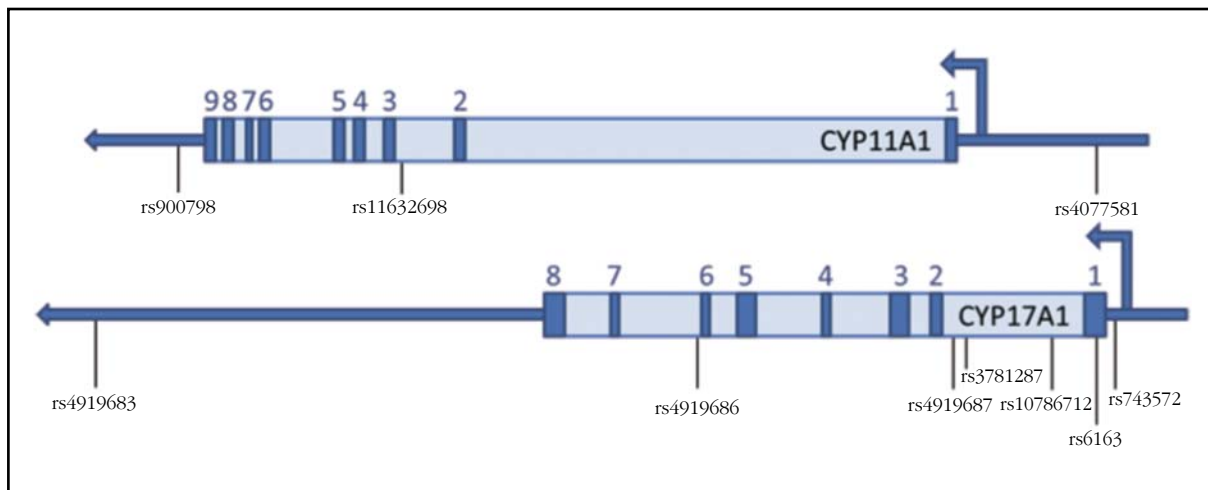
Análisis estadísticos

La frecuencia de los SNPs del *CYP11A1* y *CYP17A1* fue estimada con el algoritmo esperanza-maximización. La asociación entre los haplotipos y los fenotipos (cambio de DMO en CF y aumento de dolor) se analizó con el *haplo.glm*, basado en análisis de regresión glm, ajustando por edad, índice de masa corporal (IMC), terapia previa con tamoxifeno y quimioterapia. El haplotipo más común fue utilizado como haplotipo de referencia y se asumió el modelo aditivo obteniendo un valor p y el β -coeficiente respecto el haplotipo de referencia.

Las potenciales diferencias entre las características de las pacientes seleccionadas según su haplotipo y con fenotipos extremos fueron evaluadas con la prueba t de Student para muestras independientes.



Figura 1. SNPs seleccionados para la construcción de los haplotipos



La asociación entre las variantes genéticas encontradas en la secuenciación y los fenotipos extremos se analizaron mediante regresión lineal múltiple, contemplando los modelos de herencia genética dominante, recesivo y aditivo.

Todos los análisis estadísticos fueron definidos como significativos con $P < 0,05$. Estos se realizaron mediante programa estadístico SPSS (versión 22) y R para Windows (versión 2.15.2) usando los *packages*, *foreign*, *rms*, *multtest*, *plyr*, *boot*, *haplo.stats* y *SNPassoc*.

Declaración de ética

Los protocolos del estudio han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Parque de Salud Mar (2013/5283/I). Los protocolos aprobados para la obtención de ADN de muestras de sangre se explicaron a las potenciales participantes, que firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidas en el estudio.

Resultados

Características basales de las pacientes de la cohorte B-ABLE

En la tabla 2 se muestran las características demográficas, los valores de DMO y la evolución de la sintomatología musculoesquelética mediante EVA, para los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*, en las que se procedió a la construcción de los haplotipos.

El esquema del procedimiento para llegar al análisis final de asociación genética con los fenotipos extremos de DMO y sintomatología musculoesquelética mediante EVA se muestra en la figura 2.

Construcción de los haplotipos del gen *CYP11A1* y del gen *CYP17A1*

En la tabla 3 se muestran los haplotipos construidos y el análisis de asociación de los genes *CYP11A1* y *CYP17A1* con el cambio de DMO en CF a los 2 años y el aumento de dolor a los 12 meses de tratamiento con IA, respectivamente.

En el gen *CYP11A1*, el haplotipo que mostró una mayor diferencia fenotípica respecto el haplotipo de referencia (11.1) fue el 11.2, donde las pacientes por-

tadoras del haplotipo 11.1 en homocigosis tenían una pérdida de DMO de 4,41 veces mayor que las portadoras del haplotipo 11.2 en homocigosis (Tabla 4).

En el caso del gen *CYP17A1*, los haplotipos 17.3 y 17.4 mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto el haplotipo de referencia (17.1). Las pacientes homocigotas para el haplotipo 17.1 mostraron un aumento del dolor 3,26 veces más que las pacientes homocigotas para el haplotipo 17.4 (Tabla 4).

Selección de pacientes para el estudio genético por secuenciación Sanger

A partir de los resultados del análisis de asociación con haplotipos, se seleccionaron las pacientes de la cohorte B-ABLE portadoras de los haplotipos (con un 99% de probabilidad) que mostraban mayores diferencias fenotípicas: para el gen *CYP11A1* se seleccionaron las pacientes portadoras de los haplotipos 11.1 y 11.2 en homocigosis. Para el gen *CYP17A1*, se seleccionaron aquellas pacientes portadoras de los haplotipos 17.3 y 17.4, tanto en homocigosis como en heterocigosis. Además se seleccionaron las pacientes portadoras del haplotipo 17.1 y cualquier otro haplotipo (a excepción de los 17.3 y 17.4) (Figura 2 y Tabla 3).

Posteriormente, dentro de cada grupo haplotípico del gen *CYP11A1* se escogieron a las pacientes que mostraban un fenotipo extremo en la DMO de CF (mayor o menor pérdida de DMO a los 24 meses de tratamiento) ($n=40$). El mismo proceso se llevó a cabo para los grupos haplotípicos del gen *CYP17A1* en que se seleccionaron aquellas pacientes con el fenotipo extremo para artralgia (mayor o menor aumento del dolor los 12 meses de tratamiento) ($n=39$) (Tabla 5).

Identificación de variantes genéticas y análisis de asociación con los fenotipos extremos

Tras la secuenciación de los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*, se encontraron diversos SNPs en ambos genes. Ninguno de ellos correspondía a un cambio no sinónimo, ni en sitios de *splicing* y, por lo tanto, se descartó un cambio en la secuencia proteica.

Tabla 1. Pares de *primers* utilizados

<i>CYP11A1</i>	Promotor	F'	5'-CAACCAGATTTGCCAAGGTC-3'
		R'	5'-GGGCCAAGATTATAACTACCAGC-3'
	5'UTR y EXÓN 1	F'	5'-GCACAGGCAGATATTTTCAGGA-3'
		R'	5'-GGGGACTACAGCAGGGCTAC-3'
	EXÓN 2	F'	5'-CCTATTGTCTTGTTCCTTCAGCA-3'
		R'	5'-AGGTGGGACTCAGTGAGCAA-3'
	EXÓN 3	F'	5'-GTGAGAGGCAGAGGGTGCT-3'
		R'	5'-CAGAGCAAGGGGTCTCACTC-3'
	EXÓN 4	F'	5'-GTTGCCAGAGGTCAGCTTTC-3'
		R'	5'-CAACAGCCAGCCTTCCAT-3'
	EXÓN 5	F'	5'-CCCCAAGAATTCGATGAAAA-3'
		R'	5'-TGACCCCACCATCTTAGGAG-3'
	EXÓN 6	F'	5'-CAAGTGCTGCCCTGAATGTT-3'
		R'	5'-TGTGTGGCATCTCAGCCCTA-3'
EXÓN 7	F'	5'-GAGGTTGGAAGCAGGAAGTG-3'	
	R'	5'-CTCAGACCCAGGCAAATCAT-3'	
EXÓN 8	F'	5'-AAGGGTGGGACAATCATCCT-3'	
	R'	5'-AACTGTGGGAGAGAGCGAGA-3'	
EXÓN 9 y 3'UTR	F'	5'-CAACCACTCATCACCCACTG-3'	
	R'	5'-GATTCTGCTGGCTCCTGAAC-3'	
<i>CYP17A1</i>	Promotor 1.1	F'	5'-GGTTCCCCCAGTACGCTAGT-3'
		R'	5'-GCCTTGTGAAAGATTCTCCT-3'
	Promotor 1.2	F'	5'-TGACCCTCCTGAATCTGTCA-3'
		R'	5'-TTGGGCCAAAAACAAATAAGC-3'
	5'UTR y EXÓN 1	F'	5'-GTTTGCCCTGGAGTTGAGC-3'
		R'	5'-TCTGAAGACCTGAACAATCCCA-3'
	EXÓN 1.1	F'	5'-AAGGGCAAGGACTTCTCTGG-3'
		R'	5'-TGTGAGCCTGAGTAGCTGGA-3'
	EXÓN 1.2	F'	5'-GAAAATGGGGGCAGTACTA-3'
		R'	5'-GAGCCGCTCCTCCTAGA-3'
	EXÓN 1.3	F'	5'-CAGGGTCAGGAAATGGAAAA-3'
		R'	5'-GCGATACCCTTACGGTTGTT-3'
	EXÓN 2 y 3	F'	5'-CCAGAGGTGTAAGGGCAAGA-3'
		R'	5'-AAAGGAAGGAAGATTGGGGAC-3'
	EXÓN 3	F'	5'-GTGGACCTAGTCCCCTGGTT-3'
		R'	5'-AGGGTTTTGTTGGGGAAAAT-3'
	EXÓN 4 y INTRÓN 4	F'	5'-CCGCCTCCAGGAGAGACT-3'
		R'	5'-GTGCAATGGCATGATCTCAG-3'
	INTRÓN 4.2 y EXÓN 5	F'	5'-CCTGCCCAGACTTGCTCTAC-3'
		R'	5'-GGGTCAAAGCCAACTACTGC-3'
	INTRÓN 5, EXÓN 6 y INTRÓN 6.1	F'	5'-CACAATCCTCAGGTGTGCTT-3'
		R'	5'-TCTTGAACCCCTGACCTCAT-3'
	INTRÓN 6.2	F'	5'-GCTGGCCAACCTAAAGTCAG-3'
		R'	5'-GCCCTTACTCCCTCATTC-3'
	EXÓN 7 y INTRON 7.1	F'	5'-ACAGAAGCGCCTGTTAGGAG-3'
		R'	5'-AGCCCTTAACGACACAGAGG-3'
	EXÓN 8 y 3'UTR	F'	5'-TCTCTTTTCCATCCTCCTGA-3'
		R'	5'-CGGTGTTGAAAGAATGAGTGAG-3'

F: *forward*; R: *reverse*.

Tabla 2. Características basales de las pacientes genotipadas para los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*

	Pacientes <i>CYP11A1</i> (n=391)	Pacientes <i>CYP17A1</i> (n=532)
Edad (años), media \pm DE	61,3 \pm 8,5	61,9 \pm 8,5
IMC, media \pm DE	29,5 \pm 5,4	28,9 \pm 5,2
Edad inicio de la menopausia (años), media \pm DE	49,3 \pm 4,5	49,4 \pm 4,3
Edad de menarquía (años), mediana (RI)	12 (3)	12 (3)
Lactancia (meses), mediana (RI)	3 (11)	3 (10)
Número de hijos, mediana (RI)	2 (2)	2 (2)
Terapia previa con tamoxifeno, n (%)	159 (40,7%)	227 (42,7%)
Quimioterapia previa, n (%)	235 (60,1%)	319 (60,0%)
Inhibidor de aromatasas, n (%)		
Letrozol	262 (67,0%)	348 (65,4%)
Exemestano	124 (31,7%)	173 (32,5%)
Anastrozol	5 (1,3%)	11 (2,1%)
DMO CL (g/cm ²), media \pm DE	0,961 \pm 0,109	0,916 \pm 0,132
DMO CF (g/cm ²), media \pm DE	0,747 \pm 0,085	0,718 \pm 0,100
DMO CT (g/cm ²), media \pm DE	0,895 \pm 0,096	0,850 \pm 0,112
EVA, media \pm DE	2,435 \pm 2,525	2,434 \pm 2,469

DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; RI: rango intercuartil, DMO CL, CF y CT: densidad mineral ósea de columna lumbar, cuello de fémur y cadera total; EVA: escala visual analógica.

Sin embargo, en la región del promotor basal del gen *CYP11A1* se encontró una variante genética (D15S520) asociada a la variación de DMO en CF a 24 meses (Coeficiente β =-6,32; Intervalo de confianza (IC) del 95%: [-8,55 ; -4,09]; $p=3,71e^{-06}$).

El polimorfismo D15S520 es un microsatélite en la posición -373 pb que se utiliza como marcador genético (*Sequence Tagged Sites*, STS) y que consiste en la repetición en tándem del pentanucleótido (TAAAA)n. En nuestras pacientes, el número de repeticiones observadas fue 4, 6, 8 y 9.

Se encontró que el haplotipo 11.1 correlacionaba con el alelo de 4 repeticiones del pentanucleótido. En cambio, las pacientes portadoras del haplotipo 11.2 presentaban diferentes alelos del microsatélite que podían estar en homocigosis o heterocigosis, pero nunca el alelo con 4 repeticiones.

Discusión

Los IA tienen una serie de efectos secundarios entre los cuales destacan la aparición o el aumento de artralgias y la pérdida de masa ósea, aumentando así el riesgo de fracturas. Todo ello puede afectar el cumplimiento de la terapia, disminuir la calidad de vida de las pacientes y aumentar el riesgo de recidiva del tumor mamario.

En estudios previos, se asociaron variantes genéticas del gen *CYP11A1* y del *CYP17A1* a la pérdida de DMO en CF¹¹ y al aumento de dolor

articular¹⁰, respectivamente. Ninguno de los SNPs asociados a dichos eventos producía un cambio en la estructura de la proteína y, por lo tanto, se descartó una posible funcionalidad de estos SNPs en la determinación del evento.

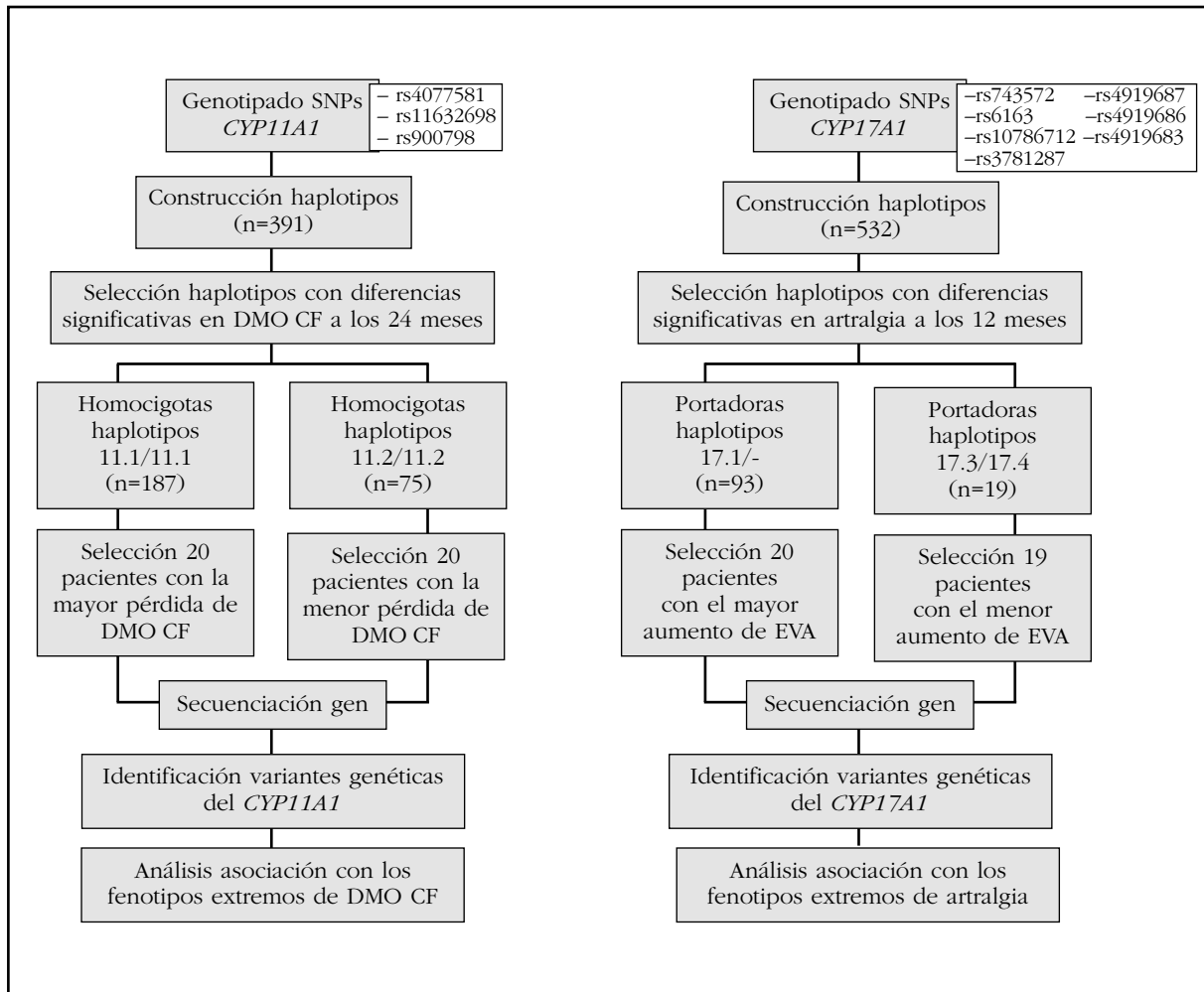
Con el objetivo de identificar putativas variantes genéticas funcionales que expliquen la asociación de estos genes con los efectos musculoesqueléticos, se secuenciaron las regiones codificantes y reguladoras de los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*.

No se halló ninguna variante en la región codificante que causara un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína y, por lo tanto, que pudiera implicar un cambio estructural de la enzima. Sin embargo, se halló una variante genética, D15S520, situada en la región reguladora del *CYP11A1*, que se relacionó con la pérdida de masa ósea.

El D15S520 es un microsatélite basado en la repetición del pentanucleótido (TAAAA)n situado en el promotor del *CYP11A1*, a 528 pb *upstream* del inicio de traducción del gen. En nuestro estudio, este polimorfismo se ha encontrado significativamente asociado a la pérdida de masa ósea a los 24 meses de tratamiento con IA. Se ha observado que todas las pacientes portadoras del haplotipo 11.1/11.1 eran también portadoras del genotipo 4/4. En la cohorte B-ABLE, estas pacientes tenían una predisposición mayor a perder masa ósea (-3,014%) que las portadoras de los haplotipos 11.2/11.2 (-0,683%).



Figura 2. Esquema general del proceso de análisis de asociación realizado en el estudio

Tabla 3: Asociación entre haplotipos de los genes *CYP11A1* y *CYP17A1*, con pérdida de DMO en CF a 2 años y cambios del dolor a los 12 meses de tratamiento con IA, respectivamente

Gen	Haplotipos	Código haplotipo	Frecuencia	Coficiente ^c [95% IC] cada copia del haplotipo	Valor de p
<i>CYP11A1</i> ^a	TGG*	11.1	0,517	Ref.	Ref.
	CAT	11.2	0,368	0,99 [0,29 ; 1,69]	0,006
	TAG	11.3	0,087	0,26 [-0,96 ; 1,47]	0,676
	TAT	11.4	0,026	1,03 [-0,96 ; 1,47]	0,342
<i>CYP17A1</i> ^b	ACCTGAC*	17.1	0,555	Ref.	Ref.
	ACCGGAA	17.2	0,014	-0,32 [-1,45 ; 2,09]	0,723
	GATGAAA	17.3	0,014	-1,67 [-3,24 ; -0,10]	0,037
	GATGACA	17.4	0,278	-0,61 [-1,03 ; -0,19]	0,005
	GATGGAA	17.5	0,123	-0,30 [-0,82 ; 0,22]	0,26

*Haplotipo de referencia; ^aHaplotipos contruidos por: rs4077581, rs11632698 y rs900798; ^bHaplotipos contruidos por: rs743572, rs6163, rs10786712, rs3781287, rs4919687, rs4919686 y rs4919683; ^cAjustado por: edad, índice de masa corporal, quimioterapia y tamoxifeno previo.

DMO: densidad mineral ósea; CF: cuello de fémur; IC: intervalo de confianza.

Tabla 4. Media de los fenotipos (pérdida de DMO en CF en *CYP11A1* y aumento del dolor en *CYP17A1*) de las pacientes de la cohorte B-ABLE portadoras de los haplotipos en homocigosis

Gen	Código haplotipo	N pacientes homocigotas	Media fenotipo pacientes homocigotas
<i>CYP11A1</i>	11.1	187	-3,01%
	11.2	75	-0,683%
	11.3	3	-2,42%
	11.4	1	-
<i>CYP17A1</i>	17.1	93	1,76
	17.2	0	-
	17.3	1	-
	17.4	18	0,54
	17.5	0	-

DMO: densidad mineral ósea; CF: cuello de fémur.

Este microsatélite fue previamente asociado al riesgo de padecer cáncer de mama^{17,18}, aunque existe cierta controversia con los resultados^{19,20}. El estudio de Sakoda *et al.*¹⁸ sugirió que las mujeres portadoras de 4 repeticiones en homocigosis tendrían menor riesgo de sufrir cáncer de mama. Una hipótesis sería que el alelo de 4 repeticiones afectaría la expresión del gen *CYP11A1* disminuyendo la producción de estrógenos. Como consecuencia, la menor exposición a estrógenos reduciría el riesgo de padecer cáncer de mama²¹, pero durante el tratamiento con IA, los niveles de estrógenos remanentes podrían ser inferiores a los de las pacientes portadoras de los otros alelos, incrementando así la pérdida de masa ósea.

La detección de variantes genéticas que expliquen en parte la acción de los IA sobre el sistema musculoesquelético permitiría llevar a cabo terapias personalizadas con el fin de evitar, o al menos prever con antelación, los efectos secundarios de los IA. Con ello se podría mejorar la adherencia al tratamiento de estas pacientes, que actualmente se sitúa entre el 75,5-78,5%, y así evitar recaídas y un nuevo cáncer de mama contralateral²².

La principal limitación de este estudio es que no prueba que este microsatélite sea realmente una variante funcional, ya que no existen estudios funcionales del promotor del *CYP11A1* que validen esta hipótesis. Sin embargo, el hecho de no haber encontrado ninguna variable funcional en las regiones codificantes de ninguno de los genes estudiados parece indicarnos que la asociación observada entre estos genes y los fenotipos tiene que ser causada por variantes genéticas localizadas en regiones reguladoras. Otra limitación del estudio es la utilización del parámetro EVA para la valoración de la sintomatología musculoesquelética. El EVA asume que el dolor es una experiencia unidimensional que puede medirse en una escala de intensidad de un

solo punto. No obstante, la toxicidad reportada por la paciente capta de forma más exhaustiva los efectos secundarios de las terapias (es decir, el dolor) en la experiencia diaria y tiene mayor concordancia con la calidad de vida de la paciente que la toxicidad comprobada por el clínico, siendo así apropiado para la investigación de la sintomatología musculoesquelética. Asimismo, la proporción de la escala de EVA permite detectar las diferencias porcentuales entre las mediciones de EVA obtenidas en múltiples puntos en el tiempo. Otras ventajas del EVA son su facilidad y brevedad de puntuación, mínima intrusividad y simplicidad conceptual.

En conclusión, la variante D15S20 del promotor del gen *CYP11A1* podría modular la expresión de este gen, explicando así parte de la variabilidad fenotípica encontrada en la pérdida de masa ósea de las pacientes en tratamiento con IA. Por otro lado, no se ha encontrado ninguna variante en el *CYP17A1* que pueda explicar el aumento o disminución del dolor articular observado en las pacientes en tratamiento con IA. Se deberían estudiar más profundamente las regiones promotoras de estos genes para detectar posibles variantes genéticas que podrían estar implicadas en la regulación de su expresión.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses en relación a este trabajo.

Financiación: Este trabajo ha sido financiado por las becas FEIOMM 2010 y 2012, la Red Temática de Investigación Cooperativa en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF; RD12/0043/0022), y la ayudas del PI13/00444 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación). La Generalitat de Cataluña (DIUE 2014 SGR 775) y los fondos FEDER también han contribuido a su financiación.



Tabla 5. Características de las pacientes con fenotipos extremos seleccionadas para el análisis genético

Pacientes <i>CYP11A1</i>	11.2/11.2 (n=20)	11.1/11.1 (n=20)
Edad (años), media \pm DE	60,6 \pm 10,8	59,1 \pm 9,9
IMC, media \pm DE	27,31 \pm 4,6	27,91 \pm 4,6
Edad inicio de la menopausia (años), media \pm DE	47,8 \pm 3,6	48,2 \pm 4,9
Edad de menarquia (años), mediana (RI)	13 (2)	12 (2)
Lactancia (meses), mediana (RI)	5 (15)	2,5 (9)
Número de hijos, mediana (RI)	2 (2)	2 (2)
Terapia previa con tamoxifeno, n (%)	0 (0%)	0 (0%)
Quimioterapia previa, n (%)	13 (65,0%)	13 (65,0%)
Inhibidor de aromatasa, n (%)		
Letrozol	10 (50,0%)	9 (45,0%)
Exemestano	10 (50,0%)	11 (55,0%)
DMO CF (g/cm ²) (basal), media \pm DE	0,763 \pm 0,104	0,777 \pm 0,073*
Cambio de DMO CF (2 años), media relativa (%) \pm DE	2,330 \pm 3,203	-7,858 \pm 3,684**
Pacientes <i>CYP17A1</i>	17.3/17.4 (n=19)	17.1/- (n=20)
Edad (años), media \pm DE	61,79 \pm 9,13	61,15 \pm 7,85
IMC, media \pm DE	29,22 \pm 7,29	31,01 \pm 6,23
Edad inicio de la menopausia (años), media \pm DE	48,63 \pm 3,99	48,65 \pm 5,02
Edad de menarquia (años), mediana (RI)	12 (3)	12 (3)
Lactancia (meses); mediana (RI)	3 (12)	6 (14)
Número de hijos; mediana (RI)	2 (1)	2 (1)
Terapia previa con tamoxifeno, n (%)	14 (73,7%)	15 (75,0%)
Quimioterapia previa, n (%)	12 (63,2%)	14 (70,0%)
Inhibidor de aromatasa, n (%)		
Letrozol	11 (57,9%)	8 (40,0%)
Exemestano	7 (36,8%)	11 (55,0%)
Anastrozol	1 (5,3%)	1 (5,0%)
EVA (basal), media \pm DE	2,750 \pm 0,097	0,825 \pm 1,270*
Cambio de EVA (1 año), media \pm DE	-0,078 \pm 2,264	6,290 \pm 1,032**

DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal; RI: rango intercuartil; DMO CF: densidad mineral ósea de cuello de fémur; EVA: escala visual analógica; *p<0,01; **p<0,001.



Bibliografía

1. Nabholz JM. Long-term safety of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4(1):189-204.
2. Gonnelli S, Petrioli R. Aromatase inhibitors, efficacy and metabolic risk in the treatment of postmenopausal women with early breast cancer. *Clin Interv Aging*. 2008;3(4):647-57.
3. Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, Ellis MJ. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(5):261-75.
4. Bolufer P, Ricart E, Lluch A, Vazquez C, Rodriguez A, Ruiz A, et al. Aromatase activity and estradiol in human breast cancer: its relationship to estradiol and epidermal growth factor receptors and to tumor-node-metastasis staging. *J Clin Oncol*. 1992;10(3):438-46.
5. Fabian CJ. The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *Int J Clin Pract*. 2007;61(12):2051-63.
6. Amir E, Seruga B, Niraula S, Carlsson L, Ocana A. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(17):1299-309.
7. Dent S, Di Valentin T, Vandermeer L, Spaans J, Verma S. Long term toxicities in women with early stage breast cancer treated with aromatase inhibitors: data from a tertiary care center. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;100S1(4057):S190-1.
8. Henry NL, Giles JT, Ang D, Mohan M, Dadabhoy D, Robarge J, et al. Prospective characterization of musculoskeletal symptoms in early stage breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111(2):365-72.
9. Prieto-Alhambra D, Javaid MK, Servitja S, Arden NK, Martinez-Garcia M, Diez-Perez A, et al. Vitamin D threshold to prevent aromatase inhibitor-induced arthralgia: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;125(3):869-78.
10. Garcia-Giralt N, Rodriguez-Sanz M, Prieto-Alhambra D, Servitja S, Torres-Del Pliego E, Balcells S, et al. Genetic determinants of aromatase inhibitor-related arthralgia: the B-ABLE cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140(2):385-95.
11. Rodriguez-Sanz M, Garcia-Giralt N, Prieto-Alhambra D, Servitja S, Balcells S, Pecorelli R, et al. CYP11A1 expression in bone is associated with aromatase inhibitor-related bone loss. *J Mol Endocrinol*. 2015;55(1):69-79.
12. Nguyen MN, Slominski A, Li W, Ng YR, Tuckey RC. Metabolism of vitamin d2 to 17,20,24-trihydroxyvitamin d2 by cytochrome p450scc (CYP11A1). *Drug Metab Dispos*. 2009;37(4):761-7.
13. Tuckey RC, Janjetovic Z, Li W, Nguyen MN, Zmijewski MA, Zjawiony J, et al. Metabolism of 1alpha-hydroxyvitamin D3 by cytochrome P450scc to biologically active 1alpha,20-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;112(4-5):213-9.
14. Servitja S, Nogues X, Prieto-Alhambra D, Martinez-Garcia M, Garrigos L, Pena MJ, et al. Bone health in a prospective cohort of postmenopausal women receiving aromatase inhibitors for early breast cancer. *Breast*. 2012;21(1):95-101.
15. Blake G, E. Adams J, Bishop N. DXA in Adults and Children. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Eighth Edition ed: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 249-63.
16. Orozco López P, Zwart Salmerón M, Vilert Garrofa E, Olmos Domínguez C. Predicción de la ingesta total de calcio a través del consumo de lácteos en la población adulta de España. *Estudio INDICAD 2001*. *Aten Primaria*. 2004;33(5):237-43.
17. Zheng W, Gao Y-T, Shu X-O, Wen W, Cai Q, Dai Q, et al. Population-Based Case-Control Study of CYP11A Gene Polymorphism and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(5):709-14.
18. Sakoda LC, Blackston C, Doherty JA, Ray RM, Lin MG, Stalsberg H, et al. Polymorphisms in steroid hormone biosynthesis genes and risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(5):1066-73.
19. Setiawan VW, Cheng I, Stram DO, Giorgi E, Pike MC, Van Den Berg D, et al. A systematic assessment of common genetic variation in CYP11A and risk of breast cancer. *Cancer Res*. 2006;66(24):12019-25.
20. Yaspan BL, Breyer JP, Cai Q, Dai Q, Elmore JB, Amundson I, et al. Haplotype analysis of CYP11A1 identifies promoter variants associated with breast cancer risk. *Cancer Res*. 2007;67(12):5673-82.
21. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*. 2005;9(1):208-21.
22. Font R, Espinas JA, Gil-Gil M, Barnadas A, Ojeda B, Tusquets I, et al. Prescription refill, patient self-report and physician report in assessing adherence to oral endocrine therapy in early breast cancer patients: a retrospective cohort study in Catalonia, Spain. *Br J Cancer*. 2012;107(8):1249-56.