

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA NACIONAL DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias en Salud Ambiental
Generación 2013-2015

**Asociación de cáncer de mama con ftalatos
seleccionados: modificación por el consumo de
flavonoides.**

Artículo
Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en
Salud Ambiental

Presenta
L.N. Ángel Mérida Ortega

Comité asesor:
Directora: Dra. Lizbeth Teresita López Carrillo
Asesor: MC. César Hernández Alcaraz
Lector externo: MC. Katherine Svensson

Cuernavaca, Morelos.

Agosto/2015

Agradezco a mi directora y a mi asesor de tesis la experiencia y aprendizaje en este trabajo; también a mis compañeros de generación, especialmente a Eunice por su incondicional apoyo, en verdad gracias.

Mi más agrande agradecimiento siempre a dios, a mi pareja, amigos y familia, especialmente a mi mamá por siempre confiar y hacerme confiar. Te amo.

Asociación de cáncer de mama con ftalatos seleccionados: modificación por el consumo de flavonoides.

Ángel Mérida-Ortega L. N. ¹, César Hernández-Alcaráz M. en C. ¹, Lizbeth López-Carrillo Dr. PH. ¹

¹ Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca, Morelos, México.

Autor de correspondencia: Lizbeth López-Carrillo, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad No. 655, col. Santa María Ahuacatitlán, CP 62100, Cuernavaca, Morelos, México. Tel: 777-3293000 Ext. 2501. Email: lizbeth@insp.mx.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar si la exposición a ftalatos y el consumo de flavonoides seleccionados interactúa en el riesgo de cáncer mamario (CAMA).

Material y métodos: Se entrevistaron y obtuvieron muestras de orina de 233 mujeres histológicamente confirmadas con CAMA y 221 controles sanos pareados por edad y lugar de residencia, en varios estados del norte de México. Se determinaron las concentraciones de los metabolitos urinarios del dietil ftalato (DEF), butil benzil ftalato (BBzF) y dioctil ftalato (DOF) por cromatografía de líquidos de alta resolución y dilución isotópica acoplada a espectrometría de masas en tándem. Se estimó el consumo de cinco tipos de flavonoides (antocianinas, flavan-3-ols, flavanonas, flavonas y flavonoles) de acuerdo a tres grupos de alimentos que los contienen: verduras, frutas y leguminosas-oleaginosas por medio de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos semi-cuantitativo.

Resultados: Entre las mujeres con mayor ingestión de antocianinas y flavan-3-ols provenientes del consumo de verduras se incrementó sinérgicamente la asociación protectora entre el BBzF y el CAMA ($p=0.03$). No se encontraron otras interacciones significativas flavonoides-ftalatos en el riesgo de CAMA.

Conclusión: El consumo de algunos flavonoides podría interactuar con la exposición a ftalatos en el riesgo de CAMA, no obstante tanto la información de los mecanismos subyacentes como epidemiológica es insuficiente e inconclusa.

Palabras claves: cáncer de mama, ftalatos, flavonoides.

ABSTRACT

Objective: To evaluate if selected phthalate exposure and flavonoid intake interact on breast cancer (BC) risk.

Material and methods: Interviews and urine samples were obtained from 233 histologically confirmed BC women and 221 healthy controls matched by age and place of residence, from various states of northern Mexico. Urinary metabolites concentrations of diethyl phthalate (DEP), butyl benzyl phthalate (BBzP) and dioctyl phthalate (DOP) were determined by isotope dilution/high-performance liquid chromatography couple to tandem mass spectrometry. Using a semiquantitative food frequency questionnaire, consumption of five types of flavonoids (anthocyanins, flavan-3-ols, flavanones, flavones and flavonols) were estimated according to three food groups which contain them: vegetables, fruits and legumes-oil seeds.

Results: Among women with higher intake of anthocyanins and flavan-3-ols from vegetables, the association between BBzP and BC synergistically increased ($p=0.03$). No other flavonoid-phthalate significant interactions on BC risk were found.

Conclusion: The consumption of some flavonoids may interact with exposure to phthalates on the risk of BC, however, epidemiological and underlying mechanisms information are insufficient and inconclusive.

Key words: breast cancer, phthalates, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

Los ftalatos son disruptores endócrinos utilizados principalmente como plastificantes en una amplia gama de artículos para almacenar alimentos y de cuidado personal (cremas corporales, desodorantes), entre otros (1,2). Previamente, nuestro grupo de trabajo reportó por primera vez a nivel mundial, un incremento en el riesgo de cáncer mamario (CAMA) por la exposición a dietil ftalato (DEF), así como asociaciones negativas con CAMA, por la exposición a butil benzil ftalato (BBzF) y dioctil ftalato (DOF)(3), en mujeres residentes en el norte de México. Se desconoce si la relación potencial entre la exposición a dichos ftalatos y el CAMA, se modifique ante la presencia de otros compuestos con actividad estrogénica como los flavonoides.

Los flavonoides son un tipo de fitoestrógenos, polifenólicos, muy numerosos (más de 5,000), que se han clasificado con base en su estructura química en antocianinas, flavan-3-ols, flavanonas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (4). En resultados provenientes de estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha identificado que algunos flavonoides tienen actividad antiproliferativa, antioxidante y antiangiogénica así como la capacidad de inhibir algunas enzimas responsables del metabolismo de hormonas esteroideas, como la aromatasa que participa en la biosíntesis de estrógenos (6–9). Adicionalmente, la naringenina, apigenina y kaempferol, que forman parte de las flavanonas, flavonas y flavonoles respectivamente, tienen mayor afinidad por el receptor de estrógenos (RE) β (10), el cual se ha relacionado con procesos de inhibición de la proliferación celular en tejido mamario (11,12). A dosis elevadas generalmente no encontradas en una dieta habitual, algunos flavonoides como los flavonoles, pueden actuar como mutágenos y pro-oxidantes (13).

Los resultados de un metaanálisis que incluyó 6 cohortes prospectivas y el mismo número de estudios de casos y controles, publicados hasta el 2012, muestran que la ingestión de flavonas y flavonoles, se asocia con el decremento del riesgo de CAMA (4). Dicho metaanálisis incluyó un estudio realizado en el centro de México que reportó un efecto protector para el CAMA por el consumo de flavonas y flavonoles en mujeres postmenopáusicas (14). Más recientemente, en dos cohortes, una realizada en mujeres entre 35 y 70 años de 10 países europeos (n=334,850) y la otra en mujeres mayores a 55 años de los Países Bajos (n=3,209), no se encontró asociación entre el consumo de flavonoides y CAMA, además se observó un incremento en el riesgo de dicho cáncer en mujeres mayores de 70 años con un consumo de flavonoides totales por debajo de la mediana observada en el grupo control (15)(16). Es posible que estas inconsistencias se deban a la presencia de otros nutrimentos presentes en los alimentos fuentes de flavonoides (i.e, verduras, frutas, leguminosas-oleaginosas) que no han sido considerados en dichos estudios.

El objetivo de este estudio es evaluar si algunos flavonoides provenientes del consumo de verduras, frutas y leguminosas-oleaginosas, modifican las asociaciones reportadas entre el CAMA y los ftalatos: DEF, BBzF y DOF.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de casos y controles poblacionales en mujeres residentes del Norte de México, en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Sonora y Tamaulipas, entre 2007 y 2008, para evaluar la asociación entre los niveles urinarios de varios ftalatos y el riesgo de CAMA. El estudio, contó con la aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud Pública de México (3). El presente reporte es la continuación de dicho estudio y se analiza el consumo dietético de flavonoides en las participantes que conformaron la población de estudio.

Los casos (n=233) fueron mujeres diagnosticadas histopatológicamente con CAMA en 17 unidades hospitalarias de tercer nivel, con edad mínima de 18 años, sin antecedente de cualquier otro tipo de cáncer y con al menos un año de residencia en el área mencionada (tasa de respuesta=94.8%).

Los controles (n=221) fueron mujeres pareadas por el lugar de residencia y edad del caso índice (± 5 años). Las mujeres fueron identificadas a través del Marco Muestral Maestro del Sistema de Encuestas Nacionales de Salud de México, que es un listado de viviendas ubicadas tanto en zonas urbanas y rurales, agrupadas en manzanas y a su vez en áreas geoestadísticas básicas (AGEB). Aleatoriamente se seleccionó un número determinado de AGEBs y de manzanas, cuyos hogares fueron visitados sistemáticamente, hasta identificar una mujer elegible. En las viviendas donde no se encontró una mujer elegible o no se contó con su consentimiento, se procedió a ubicar un nuevo domicilio; cuando existió más de una mujer elegible, se seleccionó aleatoriamente a una de ellas (tasa de respuesta 99.5%).

Entrevistas y muestras de orina. Previa firma del consentimiento informado, se realizaron entrevistas directas para obtener información sobre antecedentes clínicos, características reproductivas, sociodemográficas, dietéticas y las relacionadas con actividad física. Asimismo, se tomaron medidas antropométricas para el cálculo del índice de masa corporal ($IMC=kg/m^2$). Se recolectaron muestras de la primera orina de la mañana en envases de plástico estéril de polipropileno, sin niveles detectables de ftalatos (Medegen®). Entre los casos, las muestras de orina fueron obtenidas antes de recibir cualquier tratamiento. Se prepararon alícuotas de 4 ml en un criovial y se almacenaron a $-20^{\circ}C$ o menos hasta su envío al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés), donde se mantuvieron congeladas a $-40^{\circ}C$ hasta su análisis.

Evaluación de la concentración de metabolitos de ftalatos. Se determinaron las concentraciones de monometil ftalato (MEF), monobencil ftalato (MBzF) y mono-3-carboxil propil ftalato (MCPF), que son los metabolitos urinarios del DEF, BBzF y el CPF, respectivamente. Se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución con extracción en fase sólida, dilución isotópica y espectrometría de masas tándem. De los metabolitos evaluados, únicamente el MCPF resultó con mediciones por debajo de límite de detección (LOD), por lo cual se le imputó el valor del mismo entre dos ($LOD/2$), de acuerdo a lo

sugerido por Barr et. al. (17) cuando existe un bajo porcentaje de muestras con valores por debajo del LOD (MCPF <LOD: casos 3%, en controles 2%). La concentración urinaria de creatinina (mg/dL) se midió con el método enzimático del Kit Randox de acuerdo a las instrucciones del fabricante (18).

Evaluación del consumo dietético de flavonoides. La frecuencia de consumo de 119 alimentos y 14 platillos durante el año previo a la fecha de la entrevista, se obtuvo por medio de un cuestionario validado de frecuencia de consumo de alimentos semi-cuantitativo (19). El consumo de las porciones predeterminadas de cada alimento incluyó 10 opciones, desde “nunca” hasta “seis o más veces al día”.

Previamente nuestro grupo de trabajo identificó la concordancia entre los alimentos específicos contenidos en nuestro cuestionario, con los respectivos en las tablas de referencia de composición nutrimental No. 20 del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) (20), a partir de las cuales se obtuvo el contenido nutricional de cada alimento. La composición nutricional de 2 alimentos (membrillo y tejocote) no incluidos en dichas tablas fue obtenida de la tabla local elaborada por el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán. Adicionalmente, la información del contenido de flavonoides en alimentos, se obtuvo de la base de composición de flavonoides versión 3.1 del mismo Departamento que contiene la información de cinco tipos de flavonoides y sus respectivos subtipos: (1) antocianinas: cianidina, petunidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina; (2) flavan-3-ols: catequina, epigallocatequina, epicatequina, epicatequina 3-galate, epigallocatequina 3-galate, teaflavina, tearubigina, teaflavina-3, 3'-digalate, teaflavina-3'-galate, galocatequina; (3) flavanonas: eriodictol, hesperetina, naringenina; (4) flavonas: apigenina, luteolina y (5) flavonoles: isorhamnetina, kaempferol, miricetina, quercetina (21).

Con base en la frecuencia de consumo de alimentos reportada por las participantes, se estimó el consumo diario o semanal, de energía total, nutrimentos y flavonoides, estos últimos de acuerdo a los grupos principales de alimentos que los contienen: verduras (coliflor, brócoli, verdolaga, elote, papa, zanahoria, espinaca, calabacita, chayote, lechuga, nopal, aguacate, flor de calabaza, betabel, cebolla y ajo), frutas (plátano, ciruela, durazno, manzana, jugo de naranja, naranja, uva, zarzamora, fresa, melón, sandía, mango, pera, mamey, tuna, zapote, papaya, piña, guayaba, higos, membrillo y tejocotes) y leguminosas-oleaginosas (frijol, chícharo, lenteja, haba verde, haba seca, pistache y nuez). La frecuencia de consumo de frutas y verduras se ajustó de acuerdo con su disponibilidad en el mercado a lo largo del año, por ejemplo, se consideró la mitad del consumo reportado de ciruela debido a que ésta se encuentra disponible sólo seis meses al año. No se calculó el consumo de isoflavonas debido a que el consumo de soya y derivados no es frecuente en la región de estudio.

Como control de calidad de la información dietética se calculó el porcentaje de adecuación para todas las participantes, que es la relación proporcional entre la ingesta

diaria total de energía y el gasto energético total (GET). Para el cálculo del GET se consideró el metabolismo basal, calculado a partir de la edad, la estatura y el peso de los participantes, así como su nivel de actividad física (evaluado en equivalentes metabólicos) y el efecto térmico de los alimentos (22). Ocho de un total de 233 casos elegibles, con valores ± 3 desviaciones estándar del logaritmo del porcentaje de adecuación, se excluyeron del análisis, por lo que el tamaño final de la población de estudio fue de 225 casos y 221 controles.

Análisis estadístico.

La relación entre el CAMA con los factores reproductivos y el IMC, se confirmó a través de modelos de regresión logística no condicionales ajustados por edad. La tendencia en dichos modelos se evaluó incluyendo las variables respectivas en forma continua.

La mediana del consumo de flavonoides (mg/semana) se comparó entre casos y controles, con la prueba de Mann Whitney. Dicho consumo se ajustó por el método de residuales descrito por Willett (23), y se obtuvieron las razones de momios respectivas ajustadas por: edad, edad de la menarca, paridad y estado menopáusico tal como se describe en el artículo original (3), además de energía total debido a su correlación estadísticamente significativa con el CAMA.

Las concentraciones de los ftalatos bajo estudio, se ajustaron por dilución urinaria con los niveles de creatinina (24); las medias geométricas respectivas se compararon en la población de estudio, con la prueba T de Student. Así mismo, se estimaron las razones de momios de dichos compuestos y CAMA ajustadas por las covariables previamente descritas. A cada uno de estos modelos se agregó individualmente los flavonoides de interés con su respectivo término multiplicativo flavonoide x ftalato. El análisis se realizó con el paquete estadístico Stata versión 12 (StataCorp, College Station, TX, E.U.A). Finalmente, se graficó las interacciones estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Por diseño, la media de edad fue similar entre casos y controles alrededor de 53 años, con una ingestión diaria calórica reportada en los controles de 1624.46 kcal/día. Se confirmó el incremento del riesgo de CAMA con la edad temprana de la menarca, edad tardía del embarazo y el sobrepeso, así como la reducción del mismo con la paridad alta y la lactancia al primer embarazo (Tabla 1). Así mismo se confirmaron las razones de momios respectivas entre el CAMA y el MEF y MCPF (Tabla 2).

El consumo de flavonoides en general resultó estadísticamente más elevado entre los casos comparado con los controles. Sólo se identificaron asociaciones positivas significativas para CAMA, con respecto al consumo de flavonoides de frutas, así como de flavonoides y flavonoles de frutas y leguminosas-oleaginosas. Contrario a lo anterior, se

observaron tres asociaciones negativas significativas entre CAMA y el consumo de antocianinas, flavan-3-ols y flavonas de verduras. (Tabla 2).

Las razones de momios de los ftalatos bajo estudio se mantuvieron al ajustar por cada uno los flavonoides de interés (a excepción de la asociación entre DEF y CAMA que perdió la significancia al ajustar por flavonas de frutas). Adicionalmente se detectaron interacciones sinérgicas estadísticamente significativas entre el MBzF con el consumo de antocianinas y flavan-3-ols de verduras respectivamente (Tabla 3) (Figura 1).

DISCUSIÓN

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que evalúa la posible interacción entre el consumo de flavonoides y la exposición a ftalatos sobre el riesgo de CAMA. Nuestros resultados sugieren que al menos el MBzF podría interactuar sinérgicamente con el consumo respectivo de dos flavonoides: antocianinas y flavan-3-ols para disminuir el riesgo de CAMA.

Los ftalatos y los flavonoides, son disruptores endocrinos con actividad estrogénica o antiestrogénica la cual depende de la afinidad que estos compuestos tengan por los RE (25)(26). Algunos flavonoides, pero no todos, tienen mayor afinidad por el RE β (10), que participa en procesos de inhibición de proliferación celular, en contraste, con algunos ftalatos que promueven la proliferación celular mediada por el RE α (27). Debido al gran número ftalatos y de flavonoides la información sobre sus posibles interacciones es incipiente.

Experimentalmente se ha documentado que el BBzF inhibe la proliferación de células cancerosas de mama (MCF-7) a través de la demetilación del RE α (28). Aunado a esto, existe evidencia de que su metabolito MBzF induce la expresión de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (29), los cuales están asociados con la inhibición de la proliferación de las células MCF-7 y el desarrollo de CAMA entre otros cánceres (30–33). Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en este estudio que muestran una asociación negativa entre el MBzF y CAMA.

Por su parte, la evidencia experimental muestra que los flavonoides ejercen actividades contrastantes. Algunos subtipos de flavan-3-ols tienen actividad antioxidante debido que estimulan antioxidantes intracelulares (i.e. glutatión peroxidasa), se unen a especies reactivas de oxígeno así como a metales de transición divalentes con lo que se reduce la concentración de dichos cationes (34). Además, existe evidencia de que las antocianinas, extraídas de diferentes alimentos, pueden inducir apoptosis en células cancerosas de mama. Aunado a lo anterior, las antocianinas y algunos subtipos de flavonas inhiben la actividad del factor de crecimiento endotelial lo que resulta en la disminución de la angiogénesis en tumores (35,36). Así mismo, se ha demostrado que algunos subtipos de flavonas inducen el arresto del ciclo celular en las fases G1 y G2, y promueven apoptosis

en células MCF-7 por la disminución en la regulación de varias proteínas antiapoptóticas. Además, se ha reportado que las flavonas son potentes antioxidantes e inhibidores de la aromatasasa (37–39) lo que podría disminuir el riesgo de CAMA. Los mecanismos previamente descritos para flavonoides específicos, podrían explicar las asociaciones negativas de CAMA y dichos flavonoides en este estudio.

No obstante, se ha reportado que algunos flavonoides pueden actuar como pro-oxidantes mediante la ruptura de la doble hélice del ADN, así como la depleción de antioxidantes nucleares como el glutatión (40,41), sin embargo se requiere mayor información para confirmar que los daños anteriormente mencionados ocurren a concentraciones mayores encontradas en la dieta habitual.

En este estudio además encontramos, que solo los flavonoides provenientes de verduras (antocianinas, flavan-3-ols y flavonas) se asociaron significativamente con la disminución del riesgo de CAMA, por lo cual es importante considerar que el consumo de esos flavonoides sea un *proxy* de otros nutrimentos presentes en las verduras con propiedades protectoras para el CAMA. Al respecto las verduras contienen compuestos anticarcinogénicos como isocianatos, carotenoides e índoles específicos. Los isocianatos inhiben la fase I de activación de enzimas (i.e. citocromo P450, relacionado con la síntesis de hormonas) y, al igual que los carotenoides, inducen la fase II de detoxificación de enzimas como la glutatión s-transferasa, las cuales pueden prevenir la iniciación de células cancerosas mediante la neutralización de electrófilos endógenos y exógenos en tejido mamario. Por su parte, los índoles inducen la 2-hidroxilación de los estrógenos lo que resulta en metabolitos no estrogénicos, además, se unen a RE y en consecuencia disminuyen la señalización de éstos. Así mismo, las verduras contienen cantidades significativas de fibra, la cual podría disminuir el riesgo de CAMA debido a que inhibe la reabsorción de estrógenos a nivel intestinal. Adicionalmente, el alto consumo de verduras se asocia a una disminución en el riesgo de obesidad, que a su vez es un factor de riesgo establecido para CAMA en mujeres postmenopáusicas (42,43).

También observamos que el consumo de algunos flavonoides presentes en las frutas y leguminosas-oleaginosas incrementó el riesgo CAMA y no es posible saber en este estudio si este efecto se deba a otros nutrimentos como los azúcares simples que pueden producir un alto índice glicémico. Dicho índice se relaciona con el aumento en los niveles de insulina, que a su vez, incrementan el crecimiento y progresión de células mamarias y en consecuencia el riesgo de CAMA (44,45). Contrastantemente, las frutas también contienen fibra y algunos antioxidantes, como carotenoides y vitamina C (43,46).

Nuestros resultados deben interpretarse con cautela debido a sus limitaciones y fortalezas metodológicas. El error de medición no diferencial propio de la evaluación de dieta a partir de cuestionarios pudo subestimar las estimaciones reportadas. (47). Así mismo, la medición de los ftalatos se realizó en una muestra única de orina que no representa la exposición crónica a los mismos. No obstante identificamos que algunos parámetros en los controles de estudio son similares a los reportados a nivel nacional, para mujeres

sanas, como ejemplo la ingestión calórica (1624.46 vs. 1592.00 kcal/día) (48) que junto con la alta tasa de respuesta reduce la probabilidades de sesgos en la selección de los participantes.

En conclusión, el consumo de algunos flavonoides podría interactuar con la exposición a ftalatos en el riesgo de CAMA no obstante tanto la información de los mecanismos subyacentes como a nivel poblacional es insuficiente e inconclusa.

REFERENCIAS

1. Joseph M. Braun, Sheela Sathyanarayana, Hauser R. Phthalate Exposure and Children's Health. *Curr Opin Pediatr*. 2014;25(2):247–54.
2. Philippat C, Bennett D, Calafat AM, Picciotto IH. Exposure to select phthalates and phenols through use of personal care products among Californian adults and their children. *Environ Res [Internet]*. Elsevier; 2015;140:369–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935115001267>
3. López-Carrillo L, Hernández-Ramírez RU, Calafat AM, Torres-Sánchez L, Galván-Portillo M, Needham LL, et al. Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. *Environ Health Perspect*. 2010 Apr;118(4):539–44.
4. Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M. Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *PLoS One*. 2013;8(1).
5. Witkowska Ma. AM, V AW, N IM. Dietary Antioxidant and Flavonoid Intakes Are Reduced in the Elderly. 2015;2015.
6. Haddad a Q, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006;9(1):68–76.
7. Sen S, De B, Devanna N, Chakraborty R. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. *Chin J Nat Med*. 2013;11(2):149–57.
8. Kim MH. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem*. 2003;89(3):529–38.
9. Awasthi M, Singh S, Pandey VP, Dwivedi UN. Molecular docking and 3D-QSAR-based virtual screening of flavonoids as potential aromatase inhibitors against estrogen-dependent breast cancer. *J Biomol Struct Dyn*. 2014;33(4):804–19.
10. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139(10):4252–63.
11. Rizza P, Barone I, Zito D, Giordano F, Lanzino M, De Amicis F, et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2014;16(1):R21.

12. Ng HW, Perkins R, Tong W, Hong H. Versatility or promiscuity: the estrogen receptors, control of ligand selectivity and an update on subtype selective ligands. *International journal of environmental research and public health*. 2014. 8709-42 p.
13. Skilbola C. SM. Potencial health impacts of excessive flavonoid intake. *Free radic biol med*. 2000;29,(3-4).(PMID: 11035267):375–83.
14. Torres-Sanchez L, Galvan-Portillo M, Wolff MS, Lopez-Carrillo L. Dietary consumption of phytochemicals and breast cancer risk in Mexican women. *Public Health Nutr*. 2009 Jun;12(6):825–31.
15. Zamora-Ros R, Ferrari P, González C a., Tjønneland A, Olsen A, Bredsdorff L, et al. Dietary flavonoid and lignan intake and breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(1):163–76.
16. Pantavos A, Ruitter R, Feskens EF, de Keyser CE, Hofman A, Stricker BH, et al. Total dietary antioxidant capacity, individual antioxidant intake and breast cancer risk: The Rotterdam study. *Int J Cancer*. 2015;136(9):2178–86.
17. Barr DB, Landsittel D, Nishioka M, Thomas K, Curwin B, Raymer J, et al. A survey of laboratory and statistical issues related to farmworker exposure studies. *Environ Health Perspect*. 2006;114(6):961–8.
18. RADOX. . <http://www.randox.com/search-results?search=creatinine&id=511>. 2010;
19. Galvan-portillo M V, Wolff MS, Torres-sánchez LE, López-cervantes M, López-carrillo L. Assessing phytochemical intake in a group of Mexican women. 2007;49(2):126–31.
20. CDC. . <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=17476>. 2011;
21. CDC. . willet. http://ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400525/Data/Flav/Flav_R03.pdf. 2014;
22. Harris J a, Benedict FG. A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad* 1918;4:370–3.
23. Willett WC, Howe R. Adjustmentfor total energyintake in epidemiologic studies @ 3. 1997;65.
24. Barr DB, Wilder LC, Caudill SP, Gonzalez AJ, Needham LL, Pirkle JL. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect*. 2005;113(2):192–200.

25. Al. T et. Differential effects of phthalates esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology*. 2005;210(2-3):223–33.
26. Collins-Burrow BM, Burrow ME, Duong BN MJ. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms. *Nutr Cancer*. 2000;38(2):229–44.
27. Ohashi A, Kotera H, Hori H, Hibiya M, Watanabe K, Murakami K, Hasegawa M, Tomita M, Hiki Y SS. Evaluation of endocrine disrupting activity of plasticizers in polyvinyl chloride tubes by estrogen receptor alpha binding assay. *Artif Organs*. 2005;8(4):252–6.
28. Kang SC LB. DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates. *J Toxicol Env Heal A*. 2005;68:1995–2003.
29. Hurst C, Waxman DJ. Activation of PPARalpha and PPARdelta by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci*. 2003;74(2):297–308.
30. Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:8806–11.
31. Mehta RG, Patel MK, Koeffler HP. Rajendra G. Mehta, Elizabeth Williamson, Minu K. Patel, H. Phillip Koeffler. *Cancer*. 2000;92(5):1–6.
32. Eibl G, Wente MN, Reber H a, Hines OJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces pancreatic cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;287(2):522–9.
33. Itami A, Watanabe G, Shimada Y, Hashimoto Y, Kawamura J, Kato M, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor ?? inhibit growth of pancreatic cancers both in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2001;94(3):370–6.
34. Aron PM, Kennedy J a. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52(1):79–104.
35. Devi PS, Kumar MS, Das SM. Evaluation of antiproliferative activity of red sorghum bran anthocyanin on a human breast cancer cell line (mcf-7). *Int J Breast Cancer*. 2011;2011:891481.

36. Hui C, Bin Y, Xiaoping Y, Long Y, Chunye C, Mantian M, et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr Cancer*. 2010;62(8):1128–36.
37. Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol, NIH*. 2007;29(6):997–1003.
38. Lim D, Jeong Y, Tyner AL, Park J. Y. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:66–75.
39. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen H-M. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(7):634–46.
40. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011;82(4):513–23.
41. Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett*. 1996;104(2):193–6.
42. X, Liu. LK. Cruciferous vegetables intake is inversely associated with risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast*. 2013;22:309–13.
43. Aune D, Chan DSM, Vieira a. R, Navarro Rosenblatt D a., Vieira R, Greenwood DC, et al. Fruits, vegetables and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(2):479–93.
44. Jia-Yi Dong L-QQ. Dietary glycemic index, glycemic load, and risk of breast cancer: meta-analysis of prospective cohort studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126:287–94.
45. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007;121(4):856–62.
46. Song JK, Bae JM. Citrus fruit intake and breast cancer risk: A quantitative systematic review. *J Breast Cancer*. 2013;16(1):72–6.
47. Kristal AR, Peters U, Potter JD. Is It Time to Abandon the Food Frequency Questionnaire? *Is It Time to Abandon the Food Frequency Questionnaire?* 2005;14(December):2826–8.
48. Barquera S et al. Energy and nutrient consumption in adults: Analysis of the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex*. 2009;51(2).

TABLAS

Tabla 1.- Razones de momios (RM) de factores asociados a cáncer de mama.

Factores	Casos/controles ¹	RM ² (IC 95%)
Edad de la menarca (años)		
>12	126/145	1.00
≤12	98/76	1.48 (1.00-2.19)
Edad al primer embarazo (años) ³		
<19	50/79	1.00
19-21	60/64	1.48 (0.90-2.44)
≥22	96/70	2.17 (1.35-3.46)
Paridad (número)		
Nulíparas	19/08	1.00
1-3	88/73	0.53 (0.22-1.29)
4-6	72/71	0.41 (0.17-1.01)
>6	45/69	0.22 (0.09-0.58) ⁴
Lactancia al primer embarazo (meses)		
No	69/26	1.00
<1 año	85/78	0.42 (0.24-0.72)
≥1 año	67/117	0.21 (0.12-0.36) ⁴
Índice de masa corporal (kg/m ²)		
>25	40/60	1.00
25-29.99	88/70	1.90 (1.14-3.16)
≥30	97/91	1.62 (0.99-2.65)
Estado menopáusico		
Premenopausia	86/74	1.00
Posmenopausia	139/147	0.73 (0.41-1.28)

¹ Los tamaños de muestra varían en algunas variables con respecto al total debido a valores faltantes (n= 233 casos y 221 controles)

² Ajustados por edad

³ No incluye a las nulíparas.

⁴ Valor de p de tendencia <0.05

Tabla 2.- Razones de momios de cáncer mamario con: metabolitos de ftalatos y consumo de flavonoides respectivamente

Ftalatos (µg/g creatina)			
Metabolito	Casos [MG (IC 95%)]	Controles [MG (IC 95%)]	RM ² (IC 95%)
MEF	167.75 (139.81-201.26) ¹	106.78 (91.25-124.96)	1.31 (1.08-1.58)
MBzF	5.33 (4.70-6.05)	6.27(5.38-7.31)	0.84 (0.67-1.04)
MCPF	2.67 (2.41-2.95)	4.07 (3.66-4.54) ¹	0.52 (0.38-0.73)
Flavonoides (mg/semana)			
Flavonoides de:	Casos [p50(p10,p90)]	Controles [p50(p10,p90)]	RM ² (IC 95%)
Verduras			
Antocianinas	0.11 (0.00,0.70)	0.11 (0.00,0.70)	0.88 (0.81-0.96)
Flavan-3-ols	0.17 (0.00,1.10)	0.17 (0.00,1.10)	0.89 (0.82-0.97)
Flavanonas	N/A	N/A	.
Flavonas	0.25 (0.05,0.90)	0.28 (0.12,0.72)	0.43 (0.32-0.58)
Flavonoles	14.40 (3.50,39.89) ³	7.57 (4.19,18.70)	1.01 (0.79-1.29)
Frutas			
Antocianinas	29.39 (4.27,83.24) ³	10.92 (3.13,28.65)	1.03 (0.87-1.23)
Flavan-3-ols	44.79 (8.70,145.26) ³	20.05 (6.74,45.93)	1.11 (0.92-1.35)
Flavanonas	131.79 (6.40-412.86) ³	22.73 (0.00,91.17)	1.11 (1.04-1.19)
Flavonas	2.14 (0.37,7.74) ³	0.46 (0.15,1.09)	3.28 (2.38-4.53)
Flavonoles	14.39 (2.73,52.70) ³	6.30 (1.34,18.12)	1.44 (1.16-1.79)
Leguminosas y oleaginosas			
Antocianinas	138.39 (25.26,440.35) ³	75.49 (25.26,176.14)	0.94 (0.79-1.12)
Flavan-3-ols	N/A	N/A	N/A
Flavanonas	N/A	N/A	N/A
Flavonas	N/A	N/A	N/A
Flavonoles	0.64 (0.00,7.77) ³	0.30 (0.00,1.21)	1.17 (1.10-1.25)

¹ P< 0.05, T-student

² Ajustado por edad, edad de la menarca, paridad, estado menopáusico y energía.

³ P<0.05,U de Mann Whitney

MG: media geométrica; p50: percentil cincuenta

N/A= no aplica, el flavonoide se encuentra presente en cantidades pequeñas o nulas en ese grupo de alimentos

Tabla 3.- Razones de momios ¹ para cáncer mamario y metabolitos urinarios de ftalatos

Metabolito	Ajustadas por flavonoides de verduras				
	RM ² (IC 95%)	RM ³ (IC95%)	RM ⁴ (IC95%)	RM ⁵ (IC95%)	RM ⁶ (95%)
MEF	1.36 (1.12-1.64)	1.36 (1.12-1.64)	N/A	1.29 (1.06-1.57)	1.31 (1.08-1.58)
P de interacción ⁷	0.12	0.13		0.7	0.96
MBzF	0.86 (0.69-1.08)	0.86 (0.69-1.08)	N/A	0.84 (0.67-1.06)	0.83 (0.67-1.04)
P de interacción ⁷	0.03	0.03		0.24	0.07
MCPF	0.53 (0.38-0.74)	0.53 (0.38-0.74)	N/A	0.50 (0.36-0.71)	0.52 (0.38-0.72)
P de interacción ⁷	0.28	0.29		0.27	0.98
Ajustadas por flavonoides de frutas					
	RM ² (IC 95%)	RM ³ (IC95%)	RM ⁴ (IC95%)	RM ⁵ (IC95%)	RM ⁶ (95%)
MEF	1.31 (1.08-1.58)	1.30 (1.08-1.57)	1.28 (1.05-1.55)	1.18 (0.96-1.46)	1.28 (1.06-1.55)
P de interacción ⁷	0.81	0.59	0.24	0.13	0.58
MBzF	0.84 (0.67-1.04)	0.84 (0.67-1.04)	0.81 (0.65-1.02)	0.78 (0.61-1.00)	0.83 (0.66-1.03)
P de interacción ⁷	0.11	0.11	0.15	0.77	0.12
MCPF	0.52 (0.38-0.73)	0.53 (0.38-0.73)	0.53 (0.38-0.74)	0.54 (0.37-0.78)	0.54 (0.39-0.75)
P de interacción ⁷	0.67	0.51	0.56	0.26	0.14
Ajustadas por flavonoides de leguminosas y oleaginosas					
	RM ² (IC 95%)	RM ³ (IC95%)	RM ⁴ (IC95%)	RM ⁵ (IC95%)	RM ⁶ (95%)
MEF	1.32 (1.09-1.60)	N/A	N/A	N/A	1.33 (1.10-1.62)
P de interacción ⁷	0.49				0.38
MBzF	0.83 (0.66-1.03)	N/A	N/A	N/A	0.85 (0.68-1.07)
P de interacción ⁷	0.61				0.2
MCPF	0.51 (0.36-0.71)	N/A	N/A	N/A	0.56 (0.40-0.78)
P de interacción ⁷	0.49				0.32

¹ Ajustadas por: edad, edad de la menarca, paridad, energía y estado menopáusico

² Ajustadas por variables en 1, más antocianinas

³ Ajustadas por variables en 1, más flavan-3-ols

⁴ Ajustadas por variables en 1, más flavanonas

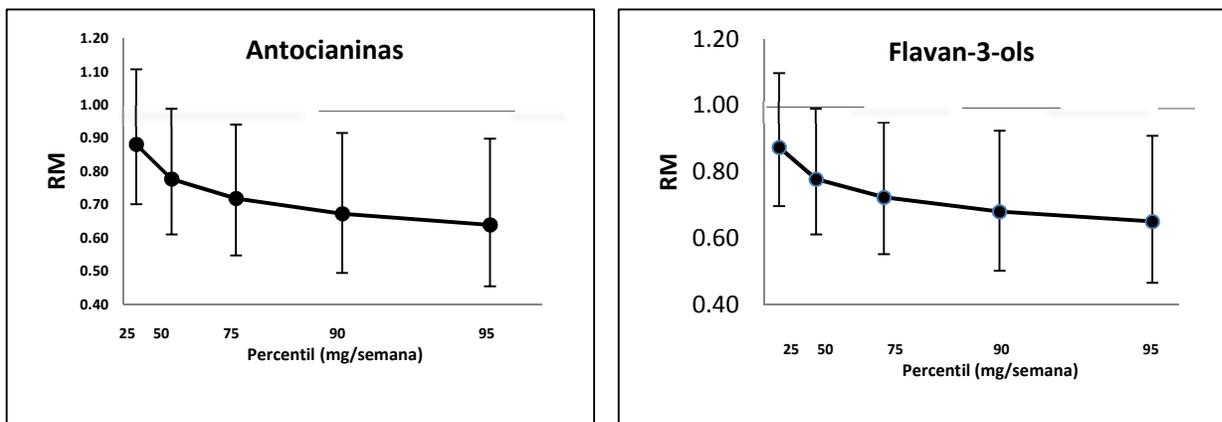
⁵ Ajustadas por variables en 1, más flavonas

⁶ Ajustadas por variables en 1, más flavonoles

⁷ Interacción: ftalato x flavonoide respectivos

N/A= no aplica, el flavonoide se encuentra presente en cantidades pequeñas o nulas en ese grupo de alimentos

Figura 1.- Razones de momios¹ entre cáncer mamario y niveles urinarios de mono butilencil ftalato (MBBzF) de acuerdo a percentiles seleccionados del consumo respectivo de antocianinas y flavan-3-ols de verduras



¹ Ajustadas por: edad, edad de la menarca, paridad, energía y estado menopáusico