

# Polimorfismos genéticos de PPAR gamma, capacidad de metilación del arsénico y riesgo de cáncer de mama en mujeres mexicanas.

**Cristina P. Pineda<sup>1</sup>, Raúl U. Hernández<sup>1</sup>, César Hernández Alcaráz<sup>1</sup>, Gabriela Matínez-Nava<sup>1</sup>, Brenda L. Gamboa Loira<sup>1</sup>, Mariano E. Cebrián<sup>2</sup>, Lizbeth López-Carrillo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Salud Pública, México <sup>2</sup>Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

## RESUMEN

**Introducción:** El riesgo de cáncer de mama (CM) se ha asociado a la exposición a arsénico inorgánico (Asi) así como a la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen que codifica para los receptores de proliferadores de peroxisomas activados  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). La exposición ambiental a Asi y los polimorfismos genéticos de PPAR $\gamma$  podrían actuar en forma conjunta para modificar el riesgo de CM, dando lugar a una interacción gen-ambiente, de la cual a la fecha no hay evidencia.

**Objetivo:** Evaluar si la presencia de los polimorfismos de PPAR $\gamma$ , *Pro12Ala*, y su coactivador PPARGC1B, *Ala203Pro*, modifican la asociación entre la capacidad de metilación del Asi y el riesgo de CM, en mujeres del Norte de México.

**Materiales y métodos:** Se entrevistaron y recolectaron muestras de sangre y orina de 197 casos de cáncer de mama y 220 mujeres sanas del Norte de México expuestas crónicamente a Asi. Se calcularon las proporciones (%Asi, %MMA, %DMA) y las razones de metilación (Primera metilación=MMA/Asi, Segunda metilación=DMA/MMA y Metilación total=DMA/Asi) a partir de los metabolitos urinarios del Asi determinados por HPLC-ICP-MS. Se genotipificaron los polimorfismos de PPAR $\gamma$  *Pro12Ala* (rs1801282) y del PPARGC1B *Ala203Pro* (rs7732671) por discriminación alélica. La interacción potencial entre los indicadores de la capacidad de metilación del Asi y los polimorfismos de interés se evaluó a través de modelos de regresión logística múltiple.

Resultados: Las mujeres con %MMA urinario, razones de primera metilación y/o metilación total altas presentaron un incremento en el riesgo de CM ( $RM_{T3 \text{ vs. } T1} = 2.93$ , IC95% 1.63-5.28;  $RM_{T3 \text{ vs. } T1} = 4.00$ , IC95% 2.16-7.42;  $RM_{T3 \text{ vs. } T1} = 1.98$ , IC95% 1.10-3.57, respectivamente). En cambio las mujeres que presentaron %Asi y una razón en la segunda metilación altas, mostraron una disminución en el riesgo de CM ( $RM_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.41$ , IC95% 0.22-0.74;  $RM_{T3 \text{ vs. } T1} = 0.41$ , IC95% 0.23-0.73, respectivamente). Se observó una asociación negativa entre el polimorfismo del gen PPARGC1B *Ala203Pro* y CM ( $RM = 0.62$ , IC95% 0.39-0.98). No se observaron interacciones estadísticamente significativas entre los polimorfismos de PPAR $\gamma$  *Pro12Ala* y PPARGC1B *Ala203Pro* y las variables arsenicales sobre el riesgo de CM

Conclusión: Los polimorfismos de PPAR $\gamma$  *Pro12Ala* y del PPARGC1B *Ala203Pro* no modifican la asociación entre la capacidad de metilación del arsénico y el riesgo de cáncer de mama.

Palabras clave:

Cáncer de mama, Asi, polimorfismos, PPAR $\gamma$ , PPARG1CB, casos y controles, México

## INTRODUCCIÓN

La activación del receptor activado por la proliferación peroxisomal gamma (PPAR $\gamma$ ) induce consistentemente la apoptosis, inhibe la proliferación celular y promueve la diferenciación celular en tumores mamarios tanto hormono-dependientes como hormono independientes (Tachibana & otros, 2008; Mueller , Sarraf , Tontonoz , & Evans , 1998; Wu, y otros, 2011; Grommes , Landreth, & Heneka, 2004; Dong, 2013). PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de receptores de hormonas nucleares (estrógenos, progesterona). Los ligandos modulan las funciones del PPAR $\gamma$ , para lo cual liberan correpresores del receptor y permiten la unión de coactivadores, los cuales facilitan su transactivación (Tontonoz & Spiegelman, 2008). Un gen importante en dicha transactivación del PPAR $\gamma$  es el coactivador 1 beta del PPAR $\gamma$  (PPARGC1B), el cual se ha visto que también es capaz de unirse y activar los

receptores de estrógenos (ER)  $\alpha$  y  $\beta$  *in vitro* como un ligando independiente, con mayor afinidad por el ER $\beta$  (Wirtenberger, y otros, 2006).

Las variantes genéticas *Pro12Ala* del gen PPAR $\gamma$  y *Ala203Pro* del gen PPARGC1B se han evaluado en relación al riesgo de cáncer mamario (CM) en estudios epidemiológicos previos. La evidencia del polimorfismo *Pro12Ala* del gen PPAR $\gamma$  en relación al CM es contradictoria. En dos estudios realizados, uno en mujeres taiwanesas y el otro en la cohorte del Nurses's Health Study, no se encontraron asociaciones significativas entre la variante *Pro12Ala* y el CM (Wu, y otros, 2011; Memisoglu & y otros, 2002). En contraste con un estudio prospectivo en EU, se detectó un incremento del riesgo de CM marginalmente significativo para las portadoras homocigotas del alelo G (Wang, y otros, 2007). Por su parte, el polimorfismo *Ala203Pro* en relación a CM ha sido escasamente estudiado. Li y cols. (2011) encontraron un incremento del riesgo de CM ER-positivo en las portadoras de polimorfismos de PPARGC1B (Li, y otros, 2011). Wirtenberger y cols. (2006) reportaron un incremento en el riesgo de CM para las portadoras de los genotipos GC y CC de una cohorte alemana (Wirtenberger, y otros, 2006).

Nuestro grupo de investigación confirmó la ausencia de una asociación significativa entre la variante *Pro12Ala* del gen PPAR $\gamma$  y CM, así como detectó una asociación negativa marginalmente significativa en las mujeres portadoras del genotipo heterocigoto del polimorfismo *Ala203Pro* del gen PPARGC1B (Martinez-Nava & otros, 2013).

Recientemente, nuestro grupo de investigación también ha identificado que las mujeres expuestas al arsénico inorgánico (Asi) con menor capacidad para eliminarlo urinariamente, evaluada a través del porcentaje de eliminación del monometilarsénico (MMA), presentan mayor riesgo de CM (%MMA RM<sub>Q5vs.Q1</sub> = 2.63; IC95% 1.89-3.66; p de tendencia <0.001) (López-Carrillo & otros, 2014). Si bien no están claramente dilucidados los mecanismos por los cuales el Asi podría ser un cofactor del CM, se ha observado que el arsenito de sodio, imita los efectos del estradiol en las líneas celulares de CM MCF-7, al inducir en éstas proliferación celular, lo que a su vez es un factor de riesgo para dicho cáncer (Ruiz-Ramos

&otros, 2009). Adicionalmente, en pruebas *in vitro* el Asi interfiere en la señalización de la adipogénesis al disminuir la expresión de PPAR $\gamma$  (Wauson, Langan, & Vorce, 2002; Yadav & otros, 2012) y como consecuencia afecta el balance de la proliferación y diferenciación celular en tumores de mama, colon y próstata (Wauson, Langan, & Vorce, 2002). Aunado a esto, el Asi puede actuar como disruptor endocrino y así relacionarse con el CM, lo anterior mediante la sobreexpresión de la aromatasa, la cual es una enzima que limita la velocidad de la síntesis de estrógenos (Xu & otros, 2013). La expresión de esta enzima puede ser inhibida por la activación del PPAR $\gamma$ , esto vía la sobreexpresión de BRCA1 (gen supresor de tumores) y la inhibición de PGE2 (prostaglandina pro-inflamatoria E2) (Margalit & otros, 2012).

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar si la asociación observada previamente entre la capacidad de metilación del Asi y el CM, se modifica de acuerdo a la presencia de los polimorfismos *Pro12Ala* de PPAR $\gamma$  y *Ala203Pro* del PPARGC1B en mujeres mexicanas.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### *Población de estudio.*

El presente trabajo forma parte de un estudio de casos y controles que se llevó a cabo durante el período de 2007 al 2011, en 5 estados del norte México (Chihuahua, Coahuila, Sonora, Durango y Nuevo León) donde la incidencia por CM es mayor que en el resto del país (López-Carrillo & otros, 2014).

Los casos fueron mujeres histológicamente confirmadas con CM, con edad mínima de 18 años, sin antecedentes de algún otro tipo de cáncer y con residencia mínima de un año en el área de estudio. Las pacientes fueron identificadas en unidades hospitalarias (n=17) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Secretaría de Salud, Hospitales Universitarios e Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE). La tasa de respuesta fue de 94.8%.

Los controles fueron mujeres sanas sin antecedentes de cáncer, residentes en la misma zona de estudio, cuya edad fue pareada con el caso índice ( $\pm 5$  años). Los controles se identificaron por medio del Marco Muestral Maestro del Sistema de Encuestas Nacionales de Salud de México, compuesto por Áreas Geoestadísticas Básicas (AGEB), conformadas por manzanas (20-80) en zonas urbanas y extensiones de 10,000 hectáreas aproximadamente con límites naturales identificables en las áreas rurales. Las AGEB se seleccionaron aleatoriamente y, dentro de éstas, las manzanas, en las cuales se localizaron sistemáticamente los domicilios para identificar una mujer elegible. En los domicilios donde no se encontró una mujer elegible o no se contó con su participación, se ubicó uno nuevo; de manera contraria, sí existió más de una mujer elegible, se seleccionó a una de ellas aleatoriamente.

#### *Entrevista.*

Después de la firma del consentimiento informado, a las participantes se les entrevistó directamente sobre características reproductivas relacionadas con el CM, tabaco y consumo de alcohol, entre otras variables de interés del estudio original. Asimismo, se obtuvieron medidas antropométricas para el cálculo del índice de masa corporal [IMC=peso corporal (kg)/estatura ( $m^2$ )].

#### *Muestras biológicas.*

Las mujeres donaron una muestra de orina, la primera de la mañana (en los casos antes de cualquier tratamiento para el cáncer) y otra de sangre venosa. Las muestras de orina fueron recolectadas en envases estériles de polipropileno, libre de látex y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) hasta su envío para su análisis en la Universidad de Arizona.

Las muestras de sangre fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio de Epidemiología Genética del Centro de Investigación sobre Enfermedades

Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) hasta su análisis.

#### *Determinación del Arsénico.*

Las concentraciones ( $\mu\text{g/L}$ ) de las especies urinarias de arsenito ( $\text{Asi}^{3+}$ ), arsenato ( $\text{Asi}^{5+}$ ), monometilarsenato ( $\text{MMA}^{5+}$ ), dimetilarsenato ( $\text{DMA}^{5+}$ ) y arsenobetaína (AsB) fueron determinadas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-ICP-MS), en la Sección Analítica del Núcleo de Identificación de Riesgos en la Universidad de Arizona de acuerdo a la metodología ya descrita (Gilbert-Diamond , y otros, 2011). Las mediciones que se encontraron por debajo del límite de detección (AsB=26.14%,  $\text{As}^{3+}$ =25.90%,  $\text{As}^{5+}$ =68.82%,  $\text{MMA}^{5+}$ =2.64%,  $\text{DMA}^{5+}$ =0%) se les imputó el valor del mismo (AsB: 0.08;  $\text{As}^{3+}$ : 0.15;  $\text{As}^{5+}$ : 0.41;  $\text{MMA}^{5+}$ : 0.12;  $\text{DMA}^{5+}$ : 0.12) dividido entre dos. La concentración urinaria de creatinina (mg/dL) se determinó utilizando un kit comercial con 1 mg/dL como límite de detección, de acuerdo a la metodología descrita por el fabricante (Randox, 2010).

#### *Determinación de los polimorfismos de los genes PPAR $\gamma$ Pro12Ala y PPARGC1B Ala203Pro.*

A partir de las muestras de sangre se extrajo el ADN mediante un método semi automatizado con el equipo ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation. La pureza e integridad de las muestras se evaluó mediante espectrofotometría UV y electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Martinez-Nava & otros, 2013).

Los polimorfismos seleccionados, rs1801282 (Pro12Ala) y rs7732671 (Ala203Pro), se analizaron por discriminación alélica mediante PCR punto final con sondas Taqman en el equipo Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR System. Todos los ensayos se hicieron por duplicado y fueron determinados y analizados mediante el software “Sequencing Detection System” (SDS 2.3, Applied Biosystems).

Se contó con información tanto de las concentraciones de los metabolitos de Asi y de los polimorfismos de interés para 197 casos y 220 controles que constituyen el tamaño muestral del presente estudio.

### *Análisis estadístico*

Se compararon, entre casos y controles, las medias aritméticas de la edad, los factores reproductivos para CM (edad de la menarca, paridad, edad al primer embarazo, lactancia a lo largo de la vida), IMC, consumo de tabaco y alcohol, con la prueba t de Student. Así mismo, se compararon las frecuencias genotípicas de interés, y con la prueba de Hardy-Weinberg se comprobó que la población de controles estuviera en equilibrio.

El Asi se obtuvo de la suma de las concentraciones de especies urinaria  $As^{3+}$  y  $As^{5+}$ , mientras que el As total (AsT) se estimó sumando las concentraciones de Asi,  $MMA^{5+}$ ,  $DMA^{5+}$  y AsB. Las proporciones de las especies urinarias de Asi (%Asi, %MMA y %DMA) se obtuvieron al dividir la concentración de cada una entre el AsT sin AsB (AsT- AsB). Se calcularon las razones de metilación: Primera metilación=  $MMA/Asi$ , segunda metilación=  $DMA/MMA$  y metilación total=  $DMA/Asi$ . Debido a que las distribuciones de las especies arsenicales, las proporciones y razones de metilación no fueron normales, se estimaron las medias geométricas, con una transformación logarítmica y se compararon entre casos y controles.

Por medio de modelos de regresión logística no condicionados, se confirmaron las asociaciones respectivas a las proporciones de las especies arsenicales urinarias, las razones de metilación, con el CM, se consideraron dos modelos, ajustado por covariables seleccionadas y ajustado además por los polimorfismos de interés. Como covariables fueron consideradas, aquellas que resultaron significativamente diferentes entre casos y controles (AsT-B, AsB y creatinina normalizadas, edad (años), edad al 1er embarazo (años), lactancia a lo largo de la vida (meses), IMC ( $kg/m^2$ ), tabaquismo (paquetes al año), alcohol (gramos por semana)).

El modelo multivariado ajustado por las covariables mencionadas, fue estratificado por los genotipos agrupados de acuerdo al modelo dominante de los genes de interés (GG+GC vs. CC y GG vs. GC+CC para PPAR $\gamma$  *Pro12Ala* y CC+CG vs. GG y CC vs. CG+GG para PARGC1B *Ala203Pro*). No fue posible evaluar los modelos codominante y recesivo, respectivamente, debido al reducido número de mujeres homocigotas mutadas en ambos genes. Adicionalmente, se añadió a los modelos multivariados el termino multiplicativo gen-As de 2 por 3 categorías. El análisis de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico Stata 12.0 (StataCorp, CollegeStation, TX, USA).

## RESULTADOS

Por diseño del estudio, la edad promedio fue similar entre casos y controles (53.14 vs. 53.86 años). En cuanto a las características reproductivas, los casos presentaron significativamente menor edad de la menarca, paridad y lactancia a lo largo de la vida, así como mayor edad al primer embarazo, comparados con los controles. El IMC, consumo de tabaco y de alcohol fueron mayores pero no significativos en los casos comparados con los controles.

Se observaron diferencias significativas de las concentraciones de Asi, DMA, AsT y AsT-B ajustadas por creatinina entre casos y controles, excepto para el MMA y AsB. El %MMA (11.00 vs. 9.09) y la primera metilación (1.16 vs. 0.88), los cuales, fueron significativamente mayores en los casos que en los controles. Contrario a esto, la segunda metilación (7.02 vs. 8.57) fue significativamente menor en los casos que en los controles. No se observaron diferencias significativas de %Asi, %DMA y en la razón de metilación total, así como en los niveles de creatinina urinaria. La distribución observada de las frecuencias genotípicas se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 1).

Las mujeres con %MMA urinario alto presentaron un incremento en el riesgo de CM que permaneció después de ajustar por los polimorfismos de interés (RM<sub>T3</sub> vs. T1 =2.87, IC95% 1.59-5.21; p de tendencia <0.001), lo cual fue consistente con las

razones de momios observadas para la primera metilación y la total. En contraste, se observó una disminución del riesgo de CM en aquellas mujeres que tuvieron %Asi urinario alto ( $RM_{T3 \text{ vs. } T1}=0.40$ , IC95% 0.22-0.74; p de tendencia= 0.002) y valores mayores en la segunda metilación ( $RM_{T3 \text{ vs. } T1}=0.42$ , IC95% 0.24-0.76; p de tendencia= 0.003) (Tabla 2).

En los modelos estratificados por los genotipos de interés, se observaron diferencias entre los estratos, sin embargo no fueron estadísticamente significativas. No se obtuvieron interacciones estadísticamente significativas entre dichos polimorfismos y las variables arsenicales sobre el riesgo de CM (Tabla 3).

## DISCUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados los polimorfismos del gen  $PPAR\gamma$  *Pro12Ala* y de su coactivador  $PPARGC1B$  *Ala203Pro* no modifican la asociación entre la capacidad de metilación del Asi y el CM. Adicionalmente la asociación entre la capacidad de metilación del Asi y el CM se mantiene después de ajustar por dichos polimorfismos.

La asociación entre el polimorfismo *Pro12Ala* de  $PPAR\gamma$  y el CM, es inconclusa. Los resultados de un meta-análisis reciente, sugieren que las portadoras de los genotipos CG+GG podrían ser menos susceptibles a desarrollar este tumor ( $RM=0.85$  IC95% 0.73-0.98) (Mao, Guo, Gao, Wang, & Ma, 2013). Lo anterior es consistente con la observación previa en mujeres danesas donde las portadoras del alelo G, presentaron una disminución del riesgo de CM (Vogel, Christensen, Nexø, Wallin, Friis, & Tjønneland, 2006). En contraste, en mujeres norteamericanas homocigotas del alelo G se identificó un aumento de riesgo de CM ( $RM=2.91$  IC95% 1.05-8.04) (Wang, y otros, 2007). En nuestro estudio, observamos una proporción (11.64%) de portadoras del alelo G, en el grupo control, cercana a la frecuencia reportada en población mexicana (Black, Fingerlin, Allayee, Zhang, & otros, 2008; International HAPMAP Project, 2014), y, al igual que en otros estudios no encontramos una asociación entre dichos polimorfismos

y el CM, aun ajustando por la exposición a Asi ( $RM_{CG+GG \text{ vs. } CC}=0.90$  IC95% 0.56-1.43) (datos no incluidos en las tablas).

En relación al polimorfismo *Ala203Pro* del coactivador PPARGC1B, existen muy pocos estudios que lo hayan evaluado en relación al riesgo de CM, con resultados inconsistentes. En una población de mujeres alemanas con la mutación negativa para BRCA 1 y 2, y con CM familiar, se observó un incremento de riesgo de CM en las portadoras de los genotipos CC y CG (Wirtenberger, y otros, 2006). Si bien, dichas mujeres son una población de estudio muy seleccionada, ya que la frecuencia de CM por mutaciones en BRCA 1 y 2 es de solo 5 a 10% a nivel poblacional, y no son necesariamente comparables con las mujeres estudiadas (Weitzel, Lagos, Blazen, & otros, 2005), los resultados son opuestos a los observados en el presente estudio, incluso después de ajustar por la capacidad de metilación del Asi.

En los resultados de los modelos estratificados de acuerdo al modelo dominante de los genotipos de interés, se observaron diferencias, no significativas, entre las razones de momios, de las variables arsenicales con el CM, de las heterocigotas y homocigotas comparadas con las homocigotas silvestres. Lo anterior podría sugerir que el riesgo de CM se modifica en algunos subgrupos genéticos, especialmente a niveles altos de exposición a Asi. Por lo anterior, nuestros hallazgos requieren ser confirmados en estudios con un mayor tamaño muestral.

# TABLAS

Tabla 1. Características de la población de estudio

Características	Casos (n=197)	Controles (n=220)	Valor P <sup>b</sup>
<b>Edad (años)</b>	53.14 ± 12.40	53.86 ± 12.56	0.556
<b>Reproductivas (Media ± DE)</b>			
Edad de la menarca (años) <sup>a</sup>	12.83 ± 1.60	13.17 ± 1.64	0.035
Paridad (número de partos)	4.33 ± 3.34	5.54 ± 3.69	<0.001
Edad al 1er embarazo (años) <sup>a</sup>	22.70 ± 5.51	20.35 ± 3.94	<0.001
Lactancia a lo largo de la vida (meses) <sup>a</sup>	34.79 ± 49.03	62.78 ± 65.19	<0.001
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.38 ± 5.14	29.14 ± 5.96	0.656
<b>Tabaco (paquetes al año)</b>	47.71 ± 130.69	39.90 ± 105.62	0.501
<b>Alcohol (gramos por semana)<sup>c</sup></b>	18.50 ± 71.34	5.34 ± 9.03	0.394
<b>Creatinina (MG± DEG en mg/dL)</b>	57.78 ± 2.01	50.60 ± 2.58	0.108
<b>Arsénico (MG± DEG)</b>			
<b>As urinario (µg/g creatinina)</b>			
Asi	1.45 ± 2.29	2.08 ± 3.01	<0.001
MMA	1.69 ± 2.43	1.84 ± 3.07	0.399
DMA	11.83 ± 2.27	15.76 ± 2.89	0.002
AsB	1.48 ± 7.94	1.13 ± 10.74	0.221
AsT	20.99 ± 2.50	26.45 ± 3.14	0.024
AsT- AsB	15.33 ± 2.22	20.19 ± 2.85	0.003
<b>Proporciones de especies arsenicales</b>			
Asi	9.44 ± 1.72	10.30 ± 1.67	0.093
MMA	11.00 ± 1.42	9.09 ± 1.52	<0.001
DMA	77.17 ± 1.11	78.05 ± 1.11	0.267
<b>Razones de metilación</b>			
Primera metilación	1.16 ± 1.68	0.88 ± 1.75	<0.001
Segunda metilación	7.02 ± 1.54	8.57 ± 1.62	<0.001
Metilación total	8.17 ± 1.87	7.58 ± 1.84	0.211
<b>Polimorfismos (% / n)</b>			
<b>PPAR γ Pro12Ala<sup>d</sup></b>			0.423 <sup>d</sup>
C/C	78.68 (155)	76.82 (169)	
C/G	21.32 (42)	22.27 (49)	
G/G	0 (0)	2 (0.91)	
<b>PPARGC1B Ala203Pro<sup>d</sup></b>			0.833 <sup>d</sup>
G/G	79.70 (157)	70.91 (156)	
C/G	18.78 (37)	26.82 (59)	
C/C	3 (1.52)	5 (2.27)	

DE =desviación estándar, IMC =índice de masa corporal, MG=media geométrica, DEG=desviación estándar geométrica

a: Edad de la menarca n=416, en edad al primer embarazo n=395 y lactancia a lo largo de la vida n=410, por valores perdidos

b: Valor p de la prueba t de Student para variables continuas

c: Únicamente se consideraron las mujeres que consumieron alcohol la n (casos/controles) fue de 38/22.

d: Prueba de Hardy-Weinberg

Tabla 2. Variables arsenicales y riesgo de cáncer mamario

Variables arsenicales	Razones de Momios (IC 95%)			P tendencia
	n (casos/controles) = 212/176	Terciles		
	T1 <sup>a</sup>	T2 <sup>a</sup>	T3 <sup>a</sup>	
<b>Proporciones</b>				
<b>Asi</b>				
Modelo 1	1.00	0.51 (0.29 - 0.89)	0.41 (0.22 - 0.74)	0.002
Modelo 2	1.00	0.49 (0.28 - 0.84)	0.40 (0.22 - 0.74)	0.002
<b>MMA</b>				
Modelo 1	1.00	1.46 (0.80 - 2.66)	2.93 (1.63 - 5.28)	<0.001
Modelo 2	1.00	1.44 (0.78 - 2.63)	2.87 (1.59 - 5.21)	<0.001
<b>DMA</b>				
Modelo 1	1.00	0.94 (0.55 - 1.61)	0.98 (0.52 - 1.74)	0.932
Modelo 2	1.00	0.92 (0.54 - 1.58)	0.98 (0.55 - 1.75)	0.939
<b>Razones</b>				
<b>Primera metilación</b>				
Modelo 1	1.00	1.73 (0.93 - 3.22)	4.00 (2.16 - 7.42)	<0.001
Modelo 2	1.00	1.76 (0.94 - 3.29)	4.04 (2.17 - 7.53)	<0.001
<b>Segunda metilación</b>				
Modelo 1	1.00	0.55 (0.32 - 0.94)	0.41 (0.23 - 0.73)	0.002
Modelo 2	1.00	0.55 (0.32 - 0.95)	0.42 (0.24 - 0.76)	0.003
<b>Metilación total</b>				
Modelo 1	1.00	1.17 (0.66 - 2.08)	1.98 (1.10 - 3.57)	0.020
Modelo 2	1.00	1.14 (0.64 - 2.04)	2.00 (1.11 - 3.62)	0.019

Modelo 1: ajustado por ajustado por las variables AsT-B, AsB y creatinina transformadas a log, además de edad (años), edad al 1er embarazo (años), lactancia a lo largo de la vida (meses), IMC (kg/m<sup>2</sup>), tabaquismo (paquetes al año), alcohol (gramos por semana)

Modelo 2: además ajustado por los polimorfismos de PPAR $\gamma$  *Pro12Ala* y de PPARGC1B *Ala203Pro*, en dos categorías

a: T1 categoría de referencia; Asi, T1=(1.45-8.97), T2=(9.01-12.66), T3=(12.73-51.11); MMA, T1=(1.11-8.14), T2=(8.15-10.87), T3=(10.87-22.60); DMA, T1=(42.99-75.78), T2=(75.94-82.06), T3=(82.15-96.66); Primera metilación, T1=(0.12-0.77), T2=(0.79-1.15), T3=(1.15-2.62); Segunda metilación, T1=(2.78-6.93), T2=(7.02-10.04), T3=(10.08-86.93); Metilación total, T1=(0.84-6.06), T2=(6.09-9.00), T3=(9.01-65.25).

Tabla 3. Variables arsenicales y riesgo de cáncer mamario estratificado por polimorfismos de PPAR $\gamma$  y PPARGC1B

Variables arsenicales <sup>a</sup>	PPAR $\gamma$ Pro12A1a			PPARGC1B Ala203Pro		
	C/C	C/G+G/G	P interacción	G/G	C/G+C/C	P interacción
	RM (IC 95%) <sup>b</sup>	RM (IC 95%) <sup>b</sup>		RM (IC 95%) <sup>b</sup>	RM (IC 95%) <sup>b</sup>	
n (casos/controles)	(139/162)	(37/50)		(143/149)	(33/63)	
<b>Asi</b>						
T1	1.00	1.00		1.00	1.00	
T2	0.50 (0.27-0.92)	0.55 (0.15-1.98)	0.737	0.42 (0.22-0.79)	0.82 (0.24-2.75)	0.524
T3	0.47 (0.24-0.90)	0.18 (0.04-0.92)	0.462	0.34 (0.17-0.70)	0.58 (0.17-1.96)	0.280
<b>MMA</b>						
T1	1.00	1.00		1.00	1.00	
T2	1.22 (0.62-2.39)	3.29 (0.71-15.35)	0.152	1.13 (0.56-2.28)	2.38 (0.61-9.31)	0.501
T3	2.66 (1.36-5.18)	4.09 (0.93-17.87)	0.454	2.21 (1.12-4.35)	6.59 (1.64-26.43)	0.268
<b>DMA</b>						
T1	1.00	1.00		1.00	1.00	
T2	0.82 (0.44-1.51)	1.91 (0.51-7.15)	0.379	0.97 (0.52-1.81)	0.98 (0.29-3.28)	0.728
T3	0.88 (0.46-1.70)	3.13 (0.69-14.27)	0.451	1.13 (0.58-2.20)	0.83 (0.24-2.89)	0.484
<b>Primera metilación</b>						
T1	1.00	1.00		1.00	1.00	
T2	1.49 (0.74-3.01)	3.73 (0.79-17.54)	0.374	1.81 (0.87-3.76)	1.95 (0.53-7.18)	0.661
T3	3.49 (1.76-6.93)	8.35 (1.62-43.20)	0.517	4.07 (1.99-8.30)	4.57 (1.14-18.24)	0.699
<b>Segunda metilación</b>						
T1	1.00	1.00		1.00	1.00	
T2	0.54 (0.29-1.01)	0.77 (0.23-2.65)	0.654	0.62 (0.33-1.15)	0.35 (0.10-1.18)	0.454
T3	0.42 (0.22-0.82)	0.47 (0.12-1.83)	0.921	0.57 (0.30-1.11)	0.16 (0.04-0.62)	0.150
<b>Metilación total</b>						
T1	1.00	1.00		1.00	1.00	
T2	0.97 (0.50-1.89)	2.78 (0.71-10.97)	0.208	1.23 (0.63-2.39)	1.15 (0.31-4.26)	0.524
T3	1.85 (0.97-3.56)	3.75 (0.78-18.07)	0.709	2.47 (1.23-4.95)	1.25 (0.37-4.21)	0.234

a: T1 categoría de referencia; Asi, T1=(1.45-8.97), T2=(9.01-12.66), T3=(12.73-51.11); MMA, T1=(1.11-8.14), T2=(8.15-10.87), T3=(10.87-22.60); DMA, T1=(42.99-75.78), T2=(75.94-82.06), T3=(82.15-96.66); Primera metilación, T1=(0.12-0.77), T2=(0.79-1.15), T3=(1.15-2.62); Segunda metilación, T1=(2.78-6.93), T2=(7.02-10.04), T3=(10.08-86.93); Metilación total, T1=(0.84-6.06), T2=(6.09-9.00), T3=(9.01-65.25).

b: Modelos ajustado por las variable AsT\_B, AsB y creatinina transformadas a log, además de edad (años), edad al 1er embarazo (años), lactancia a lo largo de la vida (meses), IMC (kg/m<sup>2</sup>), tabaquismo (paquetes al año), alcohol (gramos por semana).

## REFERENCIAS

- Black, M., Fingerlin, T., Allayee, H., Zhang, W., & otros. (2008). Evidence of interaction between PPAR $\gamma$ 2 and HNF4A contributing to variation in insulin sensitivity in Mexican Americans. *Diabetes*, 57, 1048-1056.
- Dong, J.-T. (June de 2013). Anticancer activities of PPAR gamma in breast cancer are context-dependent. *The American Journal of Pathology*, 182(6), 1972-1973.
- Grommes, C., Landreth, G., & Heneka, M. (2004). Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*, 5, 419-429.
- International HAPMAP Project. (2014). *International HAPMAP Project*. Recuperado el 28 de Agosto de 2014, de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1801282](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801282)
- Li, J., Humphreys, K., Heikkinen, T., Aittomäki, K., Blomqvist, C., Pharoah, P., & otros. (2011). A combined analysis of genome-wide association studies in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 12(6), 717-727.
- López-Carrillo, L., & otros. (2014). Metilación de arsenico y riesgo de cancer mamario en mujeres del norte de Mexico.
- Mao, Q., Guo, H., Gao, L., Wang, H., & Ma, X. (Octubre de 2013). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 Pro12Ala (rs1801282) polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Med Rep*, 8, 1773-1778.
- Margalit, O., & otros. (2012). PPAR $\gamma$  agonists target aromatase via both PGE2 and BRCA1. *Cancer Pres Res*.
- Martinez-Nava, G., & otros, y. (2013). PPAR $\gamma$  y PPAR $\gamma$ 1CB polymorphisms modify the association between phthalate metabolites and breast cancer risk. *Biomarkers*.
- Memisoglu, A., & otros. (2002). Lack of association of the codon 12 polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene with breast cancer and body mass. *Pharmacogenetics*, 12(8), 597-603.
- Mueller, E., Sarraf, P., Tontonoz, P., & Evans, R. (1998). Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR $\gamma$ . *Mol. Cell*, 1, 465-470. *Mol. Cell.*, 1, 465-470.

- Randox. (15 de Septiembre de 2010). *Manual RX Monza*. Recuperado el 2 de Octubre de 2014, de Técnicas Randox: [istemainterno.com/web/wp-content/themes/aaclientesflash/gaamsa2011/pdf/MANUAL\\_QC\\_2013.pdf](http://istemainterno.com/web/wp-content/themes/aaclientesflash/gaamsa2011/pdf/MANUAL_QC_2013.pdf)
- Ruiz-Ramos, R., & otros. (2009). Sodium arsenate induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Elsevier*, 674, 109-115.
- Tachibana, K., & otros, y. (2008). Review article: The role of PPARs in cancer. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-15.
- Tontonoz, P., & Spiegelman, B. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPAR gamma. *Annu Rev Biochem*, 77, 289-312.
- Vogel, U., Christensen, J., Nexø, B., Wallin, H., Friis, S., & Tjønneland, A. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor2 Pro12Ala, interaction with alcohol intake and NSAID use, in relation to risk of breast cancer in a prospective study of Danes. *Carcinogenesis*, 28(2), 427–434.
- Wang, Y., McCullough, M., Stevens, V., Rodriguez, C., Jacobs, E., Teras, L., & otros. (2007). Nested case-control study of energy regulation candidate gene single nucleotide polymorphisms and breast cancer. *Anticancer Res*, 27, 589-593.
- Wauson, E., Langan, A., & Vorce, R. (2002). Sodium arsenite inhibits and reserves expression of adipogenic and fat cell-specific genes during in vitro adipogenesis. *Toxicological Sciences*, 65, 211-219.
- Weitzel, J., Lagos, V., Blazen, K., & otros. (2005). Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 1666-1671.
- Wirtenberger, M., Tchatchou, S., Hemminki, K., Schmutahard, J., Sutter, C., Schumutzler, R., & otros. (2006). Associations of genetic variants in the estrogen receptor coactivators PPARGC1A, PPARGC1B y EP300. *Carcinogenesis*, 27, 2201-2208.
- Wu, M., Chu, C., Chou, Y., Chou, W., Yang, T., Hsu, G., & otros. (2011). Joint effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma genetic polymorphisms and estrogen-related risk factor on breast cancer risk: results from a case-control study in Taiwan. *Breast Cancer Res Treat*, 127, 777-784.

Xu, Y., & otros. (2013). Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. *Arch Toxicol*, 88, 263-274.

Yadav, S., & otros. (2012). Arsenic inhibits the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells by down-regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma and CCAAT enhancer-binding proteins. *Toxicologic in vitro*, 27, 211-219.