

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE NUTRICIÓN

Trabajo de Investigación de Licenciatura en Nutrición

“ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CYP1A2 EN FLUIDOS BIOLÓGICOS DE PARTICIPANTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA QUE ASISTEN AL CENTRO MÉDICO PRIVADO “SAN RICARDO PAMPURI” DE LA CIUDAD DE VILLA CARLOS PAZ, CÓRDOBA”

DIRECTORA: Dra. Reartes Gabriela

CO-DIRECTOR: Prof. Dr. Repossi Gastón

ALUMNAS:

Beggiatto, Florencia Antonella

Bruno, Romina

González Rearte, Azul Marina



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

Se encuentra ubicada en la Biblioteca de la Escuela de Nutrición,
Fac. de Ciencias Médicas, U.N.C.

HOJA DE APROBACIÓN

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE LICENCIATURA EN NUTRICIÓN

"Actividad enzimática de CYP1A2 en fluidos biológicos de participantes con diagnóstico de Cáncer de mama que asisten al Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri” de la ciudad de Villa Carlos Paz, Córdoba”

Autoras:

Beggiatto, Florencia Antonella

Bruno, Romina

González Rearte, Azul Marina

Directora:

Dra. Reartes, Gabriela

Co-Director:

Prof. Dr. Repossi, Gastón

Tribunal examinador:

Med. Manzur, Sara

Mgter. Demmel, Gabriela

Dra. Reartes, Gabriela

CALIFICACIÓN FINAL:

Córdoba, / / 2017

Art.28: "Las opiniones expresadas por las autoras de este seminario final no representan necesariamente los criterios de la Escuela de Nutrición de la Facultad de Ciencias Médicas"

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Directora Dra. Reartes Gabriela y Co-Director Prof. Dr. Repossi Gastón por su tiempo, dedicación y apoyo en este proceso de aprendizaje.

A los miembros del tribunal evaluador, Med. Manzur Sara y Mgter. Demmel Gabriela.

Al Centro Médico Privado "San Ricardo Pampuri" de la ciudad de Villa Carlos Paz y su Director Dr. Díaz Gustavo como así también a las bioquímicas que colaboraron en el presente trabajo.

A las mujeres que participaron del estudio por su predisposición y valioso tiempo.

Por último, a nuestras familias y amigos por acompañarnos y apoyarnos incondicionalmente. Y a todos aquellos que de alguna manera nos ayudaron a transitar este camino.

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	5
Planteamiento y delimitación del problema	7
Objetivos	8
Marco Teórico	
1. Relación de la actividad enzimática y Cáncer	9
2. Cafeína	12
2.1 Absorción y metabolismo de la cafeína	13
2.2 Uso de la cafeína como sonda metabólica	16
3. Identificación de los metabolitos	17
Hipótesis y Variables	19
Diseño metodológico	
1. Tipo de estudio	20
2. Universo y muestra	20
3. Operacionalización de las variables	22
4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	23
Tratamiento de la muestra en orina	25
Tratamiento de la muestra en sangre	27
Plan de tratamiento y análisis de los datos	28
Resultados	29
Discusión	39
Conclusión	42
Guía de abreviaturas	43
Referencias bibliográficas	44
Anexos	52
Glosario	78

RESUMEN

"Actividad enzimática de CYP1A2 en fluidos biológicos de participantes con diagnóstico de Cáncer de mama que asisten al Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri” de la ciudad de Villa Carlos Paz, Córdoba”

Área de Investigación: Nutrición Clínica y Dietoterapia

Autores: Beggiatto FA, Bruno R, González Rearte AM, Repossi G, Reartes G.

Introducción: Existen ciertos compuestos pro-cancerígenos que forman parte de la dieta que son metabolizados por el organismo a través de enzimas hepáticas, como CYP1A2, cuya actividad puede determinarse en ciertos fluidos biológicos (orina y sangre).

Objetivo: Analizar la actividad enzimática de CYP1A2 en fluidos biológicos (orina y sangre) en participantes con y sin diagnóstico de cáncer de mama (CM), que asisten al Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri” en Villa Carlos Paz, Córdoba, durante el periodo Junio – Septiembre 2017.

Población y Métodos: Estudio descriptivo simple, observacional, experimental, correlacional, de corte transversal. La muestra estuvo conformada por n=12 mujeres (6 de ellas con diagnóstico de CM y 6 sin diagnóstico). Variables: edad, ingesta alimentaria, estado nutricional, tipo y cantidad de metabolitos de la cafeína en orina y sangre. Se utilizó la Prueba de correlación de Pearson y test T de Student.

Resultados: El promedio de edad fue de 57 años. Consumo adecuado principalmente del grupo de carnes y huevos entre las participantes con diagnóstico de CM. Entre las participantes sin diagnóstico, el mismo fue de frutas y verduras, y cereales y legumbres. Del total de la muestra el 50% presentó Sobrepeso. Se observó un predominio del fenotipo rápido en el 92% de las muestras. Las participantes sin diagnóstico presentaron valores más altos de la actividad enzimática de CYP1A2 en plasma que las participantes con diagnóstico de CM.

Conclusión: Se observaron diferencias significativas sólo en los niveles plasmáticos de CYP1A2 entre las participantes con y sin diagnóstico de CM. No se encontraron diferencias significativas de correlación en los fenotipos de ambos grupos

Palabras Claves: Fenotipificación- Cáncer de mama - Actividad enzimática - CYP1A2.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), entre las que se incluye el cáncer, son actualmente la principal causa de mortalidad mundial. Estas enfermedades se asocian con procesos inflamatorios crónicos de bajo grado, cuyo efecto constituye una vía etiopatogénica compartida por el cáncer y otras ECNT (Albala *et al.*, 2001; Abriata, 2013). En Argentina, las mismas representan más del 60% del total de las defunciones ocurridas anualmente y los procesos tumorales constituyen el 20% (Antolini *et al.*, 2015).

Dentro de estas enfermedades, el cáncer es una de las principales, siendo el de mama el tumor maligno más frecuente en las mujeres. Su incidencia, cercana al 70%, es la más alta de Argentina según las tasas de cáncer estimadas por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, 2012). En la ciudad de Córdoba, los tumores mamarios representan el 25% del total de los tumores y son la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres (Díaz *et al.*, 2009). Se conoce que algunos factores como la edad, género y características genéticas individuales (polimorfismos genéticos, interacciones gen-gen, interacción genes-medio ambiente) contribuyen a aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama. Además, existe evidencia que el consumo de una dieta alta en grasas, la ingesta de alcohol y el uso de la terapia hormonal de estrógeno y progestágeno sintético combinado pueden aumentar el riesgo de padecer CM (Kruk, 2014; Tumas *et al.*, 2015; Pou *et al.*, 2014).

Estudios epidemiológicos previos del Grupo de Epidemiología Ambiental del Cáncer en Córdoba (GEACC), han mostrado que el patrón de mortalidad por cáncer a nivel nacional está relacionado con los niveles de exposición a contaminantes de origen antrópico, como los plaguicidas, según índices de exposición instantánea y acumulada, también construidos por el GEACC (Pou *et al.*, 2010).

Desde el enfoque de la Epidemiología Nutricional existen estudios que demuestran que la población cordobesa adhiere fundamentalmente a tres patrones alimentarios, el primero en importancia es el patrón “Cono Sur” caracterizado por altas ingestas de carnes principalmente grasas, vegetales amiláceos y vino sobre el resto de los alimentos. El segundo patrón “Bebidas azucaradas” fue caracterizado por elevado consumo de gaseosas y jugos concentrados; y un tercer patrón, el “Saludable” con mayor consumo de frutas y

vegetales no amiláceos. Los dos primeros patrones resultaron asociados a mayores riesgos de padecer cáncer de mama, de próstata, colorrectal y de vías urinarias (Pou *et al.*, 2014; Tumas *et al.*, 2015; Pou *et al.*, 2012).

Por lo tanto, cabe destacar que ciertas condiciones ambientales, sumado a la disminución de la actividad física, la exposición a contaminantes ocupacionales y presentes en el ambiente, y modificaciones perjudiciales en los hábitos alimentarios, constituyen factores de riesgo concurrentes para el desarrollo del cáncer y otras enfermedades crónicas asociadas (Román *et al.*, 2014; Pou *et al.*, 2012; Mok *et al.*, 2012; Aballay *et al.*, 2012). Ciertos xenobióticos que forman parte de la dieta, también pueden desempeñar un papel en la iniciación del cáncer humano, tal es el caso de las aminas heterocíclicas (AHC) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). La capacidad del organismo de metabolizar estos compuestos pro-cancerígenos depende de enzimas hepáticas tales como el Citocromo P450 1A2 (CYP1A2) cuya actividad puede determinarse en ciertos fluidos biológicos como saliva, orina y sangre. Se ha demostrado que el aumento de la actividad de dicha enzima se asocia con un mayor riesgo de desarrollar CM.

Por todo lo expresado anteriormente, se propone conocer la relación de la actividad enzimática de CYP1A2 en fluidos biológicos como orina y sangre en participantes con y sin diagnóstico de cáncer de mama, que asisten al Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri” en la ciudad de Villa Carlos Paz, Córdoba, en el periodo Junio – Septiembre 2017.

Este estudio pretende continuar con la línea de investigación de trabajos anteriores, dirigidos por la Dra. Reartes, para conocer la predisposición del grupo bajo estudio a padecer cáncer de mama, y de ésta manera contribuir a la promoción de la salud y prevención de ECNT.

PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existen diferencias en la actividad enzimática de CYP1A2 en fluidos biológicos (orina y sangre) en las participantes con y sin diagnóstico de cáncer de mama, que asisten al Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri” de la ciudad de Villa Carlos Paz, Córdoba, durante el periodo Junio – Septiembre 2017?

El diseño experimental del trabajo de investigación, se llevó a cabo en el Instituto de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, en el cual fueron analizadas las muestras de las participantes.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar la actividad enzimática de CYP1A2 en fluidos biológicos (orina y sangre) en participantes con y sin diagnóstico de cáncer de mama, que asisten al Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri” de la ciudad de Villa Carlos Paz, Córdoba, durante el periodo Junio - Septiembre 2017.

Objetivos Específicos

- Conocer la Ingesta Alimentaria de las participantes bajo estudio.
- Determinar el Estado Nutricional según medidas antropométricas de las participantes bajo estudio.
- Caracterizar el fenotipo de las participantes, según la actividad de CYP1A2, utilizando como sonda metabólica la cafeína y sus metabolitos urinarios.
- Determinar la actividad enzimática de CYP1A2 en las participantes, a través de los metabolitos de la cafeína en sangre.
- Comparar la actividad enzimática de CYP1A2 de ambos fluidos biológicos (orina y sangre) entre las participantes con y sin diagnóstico.

MARCO TEÓRICO

1. RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CÁNCER

Los individuos están expuestos a un gran número de diferentes tóxicos denominados xenobióticos que se encuentran tanto en el medio ambiente como en los componentes de la dieta y que, de acuerdo a su naturaleza, si son absorbidos, pueden acumularse de manera excesiva y provocar un desequilibrio funcional en el organismo (Coutiño Rodríguez *et al.*, 2010).

Algunos de estos compuestos pueden desempeñar un papel en la iniciación del cáncer humano, tal es el caso de las aminas heterocíclicas (AHC) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Estos últimos son formados en la preparación de diversos alimentos a elevadas temperaturas, especialmente en carnes asadas, pero también en cereales cocinados a horno de leña y en contacto directo con la llama (Tang *et al.*, 2007).

Trabajos epidemiológicos previos que se vienen realizando en la ciudad de Córdoba por la Dra. Reartes Gabriela, dieron a conocer que los métodos de cocción por calor seco directo producen la formación de costra tostada, la cual genera compuestos altamente mutágenos y carcinogénicos, llamados Aminas Aromáticas Heterocíclicas (HAA) (Navarro *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1998).

Existen, además, otros compuestos no tóxicos, tales como la cafeína, la cual comparte la misma vía metabólica que los anteriores, por lo que será utilizada como sonda metabólica en el presente estudio.

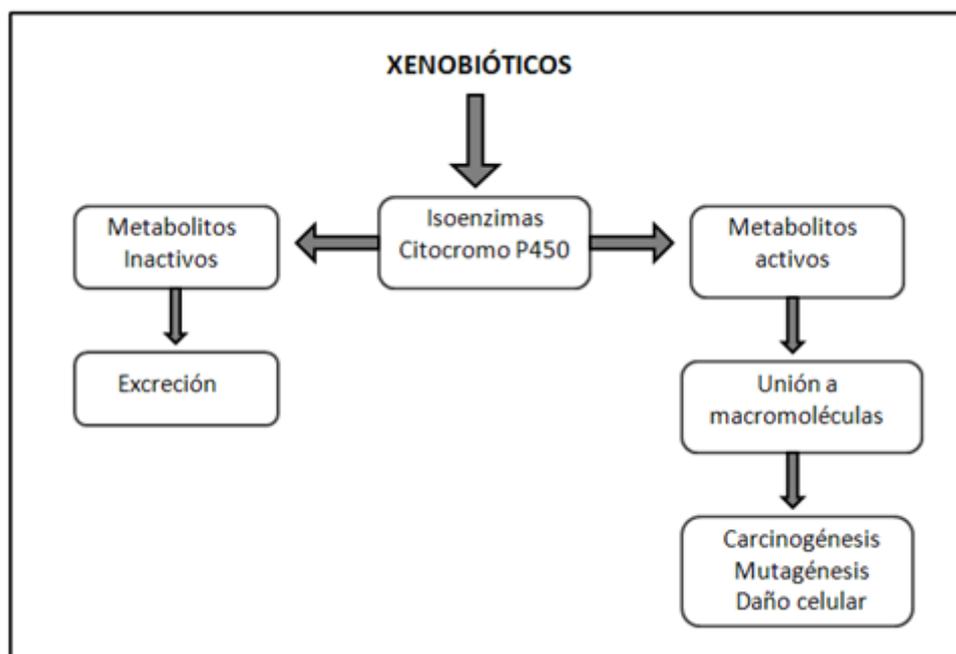
La capacidad del organismo de metabolizar y degradar estos compuestos pro-cancerígenos depende de un complejo enzimático denominado Citocromo P450, el cual se encuentra en gran variedad de órganos, glándulas y tejidos, pudiendo destacar entre otros, riñones (Ogita *et al.*, 1983), cerebro (Cohen, 1983), testículos (Nakajin *et al.*, 1981), mucosa intestinal (Kaku *et al.*, 1984), membrana basal (Dalh *et al.*, 1982), garganta (Serajbit-Singh *et al.*, 1980; Williams *et al.*, 1984) e hígado (van der Hoeven *et al.*, 1974).

El mismo constituye una superfamilia de enzimas esenciales que participan en reacciones de oxidación, peroxidación, y en el metabolismo reductivo de un grupo de diversos compuestos, que incluyen esteroides, ácidos biliares, ácidos grasos o vitaminas

liposolubles (A y D), prostaglandinas, leucotrienos y xenobióticos (Wislocki *et al.*, 1986; Ortiz de Montellano, 1995).

La mayoría de estos compuestos se comportan como sustratos para el complejo enzimático, actuando algunos como inductores y/o como inhibidores para algunas de las familias del complejo. De tal manera que un compuesto inductor, aumentará la actividad del sistema enzimático y por tanto la velocidad de formación de metabolitos. Por el contrario, si la sustancia que interactúa se comporta como inhibidor, se reduce la actividad enzimática y disminuye la velocidad de formación de los mismos (Coutiño Rodríguez *et al.*, 2010). (Ver Figura 1).

Figura 1: Reacciones de activación o inactivación mediadas por enzimas Citocromo P450



Fuente: Orellana *et al.*, 2004

Estas enzimas que metabolizan los compuestos xenobióticos se han clasificado históricamente en dos categorías o fases: las de fase I, que cumplen una misión metabolizadora y las de fase II, que tienen la misión de conjugar los sustratos con otros compuestos.

El Citocromo P450, compuesto principalmente por enzimas del metabolismo de fase I, actúa dentro de la célula acompañado de las enzimas de fase II, encargadas de la conjugación de los metabolitos producidos por las primeras, entre las que se encuentran las glutatión-S-transferasas (GST) y las N-acetiltransferasas (NAT). La mayor o menor acción de unas y otras va a tener como consecuencia que las sustancias exógenas que llegan a la célula, ya sean agentes terapéuticos, drogas o carcinógenos, resulten inocuos, tengan un efecto tóxico o un efecto beneficioso y eficaz.

Estas sustancias van a ser reconocidas por las células como señales exógenas mediante diversos mecanismos de recepción y entrarán en ella por difusión pasiva o mediante transportadores activos. Una vez adentro actuarán las enzimas de fase I, los metabolitos que se generan y las propias moléculas no metabolizadas podrán actuar sobre su diana y ser eficaces, o podrán resultar tóxicos para la célula. (Nebert *et al.*, 1987; Nebert, 1999).

Dentro del Citocromo P450 se han descrito 74 familias, de las cuales 14 están presentes en mamíferos. Éstas comprenden a su vez a 26 subfamilias de las que 20 se han identificado en el genoma humano (Nelson *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1998).

Las familias 1, 2 y 3 son las únicas que participan en el metabolismo de sustancias exógenas. Prácticamente el 50% de la totalidad de este citocromo en humanos pertenecen a alguna de estas tres familias (Shimada *et al.*, 1996).

Particularmente, la familia CYP1 está constituida por los genes CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1. Los tres comparten las características de ser activados por HAP y por el tabaco. Todos ellos son activos en la metabolización de HAP a compuestos intermediarios que pueden unirse a ADN, pudiendo llegar a provocar, en algunos casos, mutaciones involucradas en procesos de transformación neoplásica (Shimada *et al.*, 1996), es por ello que han sido relacionados con la formación de cánceres de origen químico (Nebert *et al.*, 1996).

La CYP1A2 representa aproximadamente el 15% del contenido total de proteínas del Citocromo P450. Se expresa principalmente en el hígado y está involucrada en el metabolismo de sustancias como la cafeína (Lim *et al.*, 2010) y otras sustancias exógenas tales como drogas, pesticidas, pro-carcinógenos, anestésicos y solventes orgánicos (Goeptar *et al.*, 1995).

Su expresión está inducida por factores tales como la alimentación, edad, especie, sexo, tejidos y estado hormonal. Los más importantes a destacar son el humo del tabaco, carne

con costra, verduras crucíferas (brócoli, coliflor, repollo y repollitos de bruselas), pomelo, alcohol, rifampicina y omeprazol (Landi *et al.*, 1999).

Existen 6 variantes alélicas del gen CYP1A2, las cuales podrían explicar, al menos parcialmente, las diferencias interindividuales observadas en la actividad enzimática cuando se evalúa con cafeína como sonda (Wislocki *et al.*, 1986; Ortiz de Montellano, 1995), ya que el 90% de su depuración es mediada por esta enzima (Kalow *et al.*, 1993).

La modulación de la actividad de CYP1A2 puede ser importante en la etiología del cáncer (Ayari *et al.*, 2013), siendo los tipos más frecuentes el cáncer de pulmón, colorrectal, mama y próstata (MSN, 2016). Debido a esto, cabe señalar que a nivel mundial el CM es el segundo cáncer más común y entre las mujeres el más frecuente. Se trata de una enfermedad que afecta mayoritariamente a mujeres de entre 45 y 70 años de edad, sobre la cual se desconocen cuáles son los causantes, aunque se reconocen algunos factores que aumentan el riesgo de enfermar.

De acuerdo con recientes estadísticas globales de cáncer publicados por el IARC (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer), éste representa el 25% de todos los tipos de casos de cáncer y el 15% de todas las muertes por cáncer entre las mujeres (INC, 2012).

En Argentina el CM es el de mayor incidencia en mujeres, alcanzando la cifra de 5600 casos por año (INC, 2015). Más precisamente, en la provincia de Córdoba datos recientes afirman que se diagnostican 1500 casos nuevos al año y mueren alrededor de 525 mujeres a causa de esta enfermedad (Ministerio de Comunicación Pública y Desarrollo Estratégico, 2015).

2. CAFEÍNA

La cafeína (1, 3, 7- trimetilxantina) es el estimulante psicoactivo leve más consumido en el mundo por personas de casi todas las edades y estratos socioeconómicos. En estado puro es un sólido cristalino, blanco e inodoro que se encuentra en forma de agujas blancas o polvo, y posee gusto muy amargo. Es un alcaloide del grupo de las xantinas, concretamente forma parte de la familia de las metilxantinas (Calle Aznar, 2011; Pardo Lozano *et al.*, 2007).

También es parte de las mezclas químicas y complejos insolubles guaranina (encontrada en la guaraná), mateína (encontrada en el mate), y teína (encontrada en el té), las cuales contienen además algunos alcaloides adicionales como los estimulantes cardíacos teofilina y teobromina, y a menudo otros compuestos químicos como los polifenoles, los cuales pueden formar complejos insolubles con la cafeína (Calle Aznar, 2011; Miners *et al.*, 1996).

La fuente habitual de cafeína es el café, sin embargo, también se encuentra en el mate, té, guaraná, cacao, refresco de cola, productos farmacéuticos y bebidas energéticas, entre otras (Calle Aznar, 2011; Miners *et al.*, 1996).

2.1 Absorción y Metabolismo de la Cafeína

La cafeína se absorbe de forma rápida y completa, siendo el 99% de la dosis absorbida dentro de los 45 minutos posteriores a la ingesta (Poos *et al.*, 1999).

Las concentraciones plasmáticas máximas se producen en unos 30- 45 minutos, con una vida media de 4hs en adultos. Ésta atraviesa casi todas las membranas biológicas, incluyendo la placentaria y la hematoencefálica, también traspasa a la saliva, bilis y leche materna. Las diferencias interindividuales observadas en la concentración plasmática se deben principalmente a la ingesta de alimentos y a las variaciones en el metabolismo que dependen de los polimorfismos genéticos, la existencia de enfermedades hepáticas y las características individuales de peso, género y etnia. (Pardo Lozano *et al.*, 2007; Kot *et al.*, 2008).

El principal órgano metabolizador es el hígado, donde se producen un conjunto de reacciones de degradación, mediadas por la acción catalítica de distintas enzimas, que dan origen a diferentes metabolitos que posteriormente son eliminados en orina.

El proceso de biotransformación se subdivide en etapas o fases:

Fase I

Engloba procesos químicos de distinta naturaleza (principalmente oxidación, oxigenación, reducción e hidrólisis). Como resultado se obtiene la modificación química de las moléculas con la aparición de nuevos grupos funcionales. El metabolito resultante es más polar, más reactivo, y sensiblemente menos lipófilo. Estos procesos son

mayoritariamente catalizados por enzimas presentes principalmente en los hepatocitos (Castell, 2017).

El grupo más importante de enzimas metabolizadoras de drogas de fase I está representado por monooxigenasas de función mixta, formadas por un complejo de Citocromo P450 y la enzima Citocromo P450- reductasa (Angeli de Greaves, 2008).

Fase II

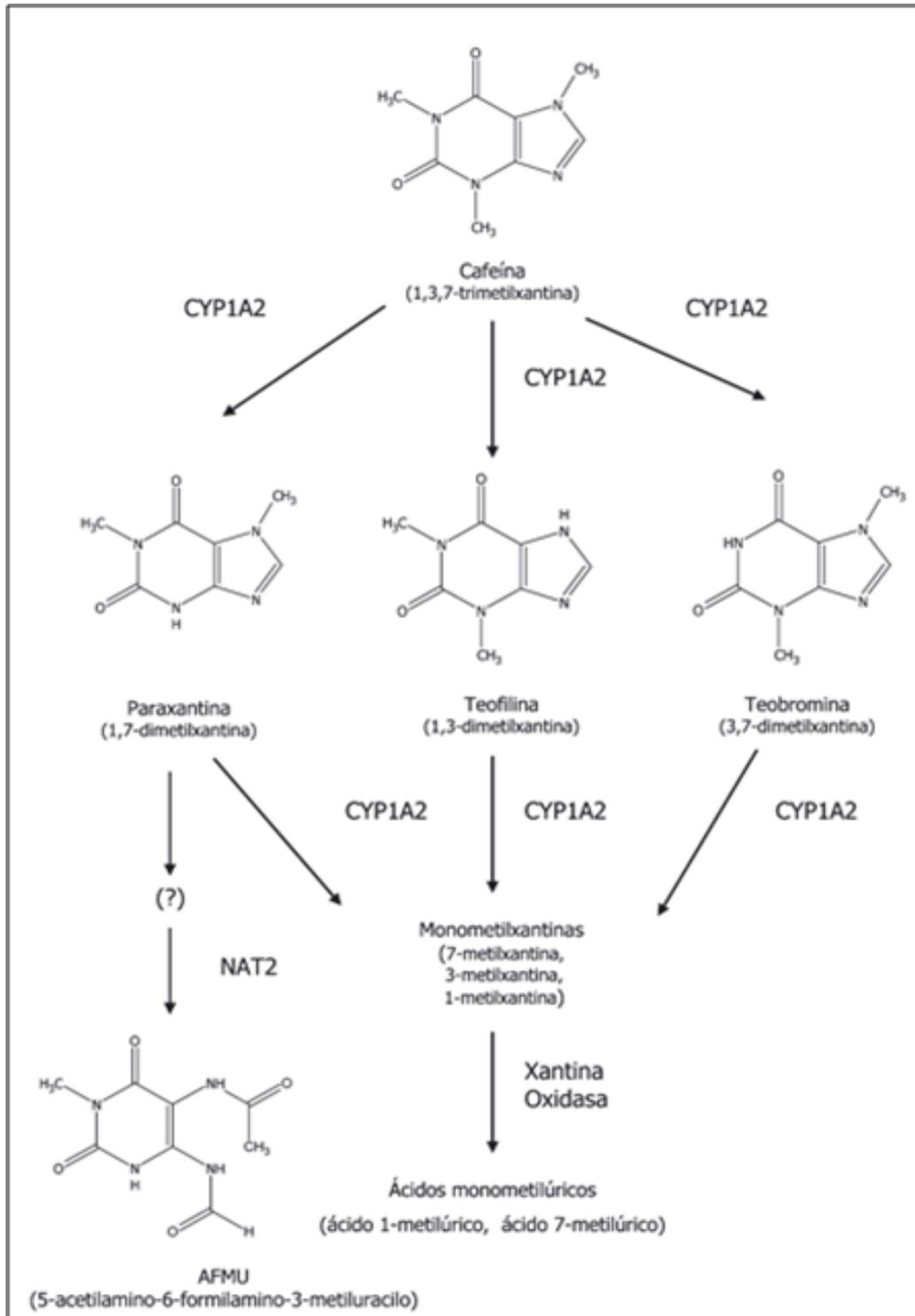
Las reacciones de FASE II son reacciones de conjugación (glucuronidación, sulfonación y conjugación), donde los xenobióticos polares, son conjugados con sustancias endógenas hidrofílicas (ácido glucurónico, sulfato, glutatión). Estas reacciones enzimáticas están encaminadas a aumentar aún más la hidrosolubilidad de sustratos y por lo tanto hacerlos más fácilmente excretables por el organismo (Castell, 2017).

Las enzimas metabolizadoras de la fase II son las arilaminas N-acetiltransferasas (NAT), éstas son enzimas citosólicas metabolizadoras de xenobióticos que a través de una reacción enzimática de N-acetilación hepática, catalizan la conjugación de un grupo acetilo de acetil-CoA en una fracción amina de un compuesto aromático (Luca *et al.*, 2008).

En los seres humanos estas enzimas se expresan de dos formas: NAT1 y NAT2. (Windmill *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2009).

A través del proceso de biotransformación de la cafeína se han podido identificar por lo menos 25 metabolitos. Menos del 5% de la cafeína ingerida se excreta inalterada en orina. La CYP1A2 metaboliza por desmetilación la mayor parte de la cafeína (95%) y la transforma en paraxantina (1,7-dimetilxantina (17X)), teofilina (1,3- dimetilxantina (13X)) y teobromina (3,7- dimetilxantina (37X)). Éstos bajo la acción de la misma enzima son metabolizados a monoxantina (7- metilxantina; 3- metilxantina; 1- metilxantina) que serán sustrato de la xantinaoxidasas (XO) dando como resultado ácidos monometilúricos: ácido 1- metilúrico (1U); ácido 7- dimetilúrico (7U). La paraxantina es metabolizada por la CYP1A2 a 1,7- ácido dimetilúrico (17U) y por la NAT2 dando como resultado AFMU (5- acetilamino- 6- formilamino- 3- metiluracilo) (Pardo Lozano *et al.*, 2007). (Ver Figura 2).

Figura 2: Metabolismo de la cafeína



Fuente: Pardo Lozano *et al.*, 2007.

2.2 Uso de la cafeína como sonda metabólica

Dado el papel potencialmente importante de la activación metabólica de ciertas sustancias consideradas tóxicas y cancerígenas, ha habido un considerable interés en la

identificación de sustratos que pueden utilizarse como sonda metabólica para así poder determinar su comportamiento en el organismo (Miners *et al.*, 1996).

En los últimos años se ha intensificado el uso de la cafeína como sonda metabólica, la cual es un sustrato marcador de primera elección por su relativa seguridad, amplia disponibilidad y favorables características farmacocinéticas (absorción completa y vida media corta). Por otra parte, mediante su estudio se puede determinar el comportamiento de las enzimas CYP1A2 Y NAT2 a través del proceso de fenotipificación, el cual permite identificar la capacidad metabólica de los sistemas enzimáticos que participan en el metabolismo de este sustrato (Gil, 2010; Miners *et al.*, 1996).

Como resultado de este proceso se logra determinar el fenotipo, el cual puede ser lento o rápido, lo que va a permitir clasificar a los individuos como metabolizadores lentos (ML) o metabolizadores rápidos (MR). Esto se establece a partir de distintos puntos de corte, de acuerdo a la clasificación adaptada de Lang (Lang, *et al.*; 1994) (Ver Tabla 1).

Tabla 1: Puntos de corte para determinar el fenotipo

Fenotipo (CYP1A2)	RM
Lento	< 2,9
Rápido	≥ 2,9

Fuente: Lang, *et al.*, 1994

Los primeros son sujetos con una función enzimática deficiente para eliminar esta sustancia, mientras que los últimos son individuos con capacidad de biotransformación libre de inhibiciones, que las eliminan más rápidamente (Lang, *et al.*, 1994).

Para determinar el fenotipo se realiza el cálculo de la razón metabólica (RM) que consiste en calcular la relación entre la fracción de la cafeína inalterada excretada en orina y cada uno de sus metabolitos urinarios. Es así que para determinar el fenotipo de la enzima CYP1A2 y NAT2 se realizan las siguientes ecuaciones (Grant *et al.*, 1983):

$$\text{CYP1A2} = \frac{\text{AFMU} + 1\text{U} + 1\text{X}}{17\text{U}}$$

$$\text{NAT2} = \frac{\text{AFMU}}{1\text{X}}$$

Por otro lado, para determinar la actividad enzimática de la cafeína en plasma, se realiza una ecuación a partir de sus metabolitos, en la cual se mide el cálculo de la relación molar (Tanaka *et al.*, 1992):

$$\text{RM: } \frac{17\text{X} + 13\text{X} + 37\text{X}}{137\text{X}}$$

Esta medición evalúa la capacidad del hígado para metabolizar la cafeína a través de la actividad de la enzima CYP1A2.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS

La preparación de las muestras para la determinación y cuantificación, demanda la purificación de los fluidos biológicos a procesar para asegurar cantidades mensurables de los compuestos de interés (Cárdenas *et al.*, 2012).

Para la identificación y cuantificación de los metabolitos de la cafeína presentes en orina y sangre se utilizó la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Dicha técnica se basa en dos tipos de análisis; el análisis cualitativo, el cual está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención), y el análisis cuantitativo basado en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración.

Actualmente la técnica de separación más ampliamente utilizada es la HPLC. Este es un método de separación y análisis basado en la presencia de dos fases dispuestas de tal manera que mientras la fase estacionaria permanece fija dentro del sistema, la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil). La clave de la separación de la cromatografía reside en la velocidad con la que se mueve cada sustancia que va a depender de su afinidad relativa por ambas fases (equilibrio de distribución) (Geanta, 2009).

Los componentes de una muestra y la fase móvil se hacen pasar por la fase estacionaria donde se producen distintos tipos de interacción entre cada uno de los componentes (interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares, electrostáticas, etc.), estas interacciones son responsable de la mayor o menor afinidad de

cada uno de los componentes de la muestra. Los componentes más afines a la fase estacionaria avanzarán lentamente (más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (menos retenidos) se moverán con mayor rapidez. De esta forma los solutos fueron separados en orden creciente a sus coeficientes de distribución con respecto a la fase estacionaria. El medio cromatográfico (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación y mediante el uso de un detector, su caracterización química.

En el caso de la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de la columna que contiene la fase estacionaria. Esta fase es un líquido que recubre el interior de un tubo capilar o la superficie de partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna. La cromatografía líquida se llevó a cabo en la columna. Se colocó la muestra y se hizo fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad (Geanta, 2009; Bravo Tovar, 2004).

El fluido que entra por la columna se llama eluyente y el fluido que sale por el extremo de la misma se llama eluato.

HIPÓTESIS

- La actividad enzimática de CYP1A2 difiere en las participantes con diagnóstico de cáncer de mama en relación a las participantes sin diagnóstico de cáncer, en ambos fluidos biológicos.
- Las participantes con diagnóstico de cáncer de mama, presentan un fenotipo lento, en relación a las participantes sin diagnóstico de cáncer.

VARIABLES

- Edad
- Ingesta Alimentaria
- Estado Nutricional según medidas antropométricas
- Tipo de metabolitos de la cafeína en orina y en sangre
- Cantidad de metabolitos de la cafeína en orina y en sangre

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio

El presente Trabajo de Investigación fue de modalidad descriptivo simple, observacional, experimental, correlacional, de corte transversal.

Descriptivo: Dado que busca especificar propiedades, características, y rasgos importantes de cualquier fenómeno que se analice, describiendo tendencias de un grupo o población.

El mismo pretende medir o recoger información de manera independiente o conjunta sobre los conceptos o las variables a los que se refiere (Sampieri *et al.*, 2007).

Observacional: Ya que deja que la naturaleza siga su curso, es decir, el investigador mide pero no interviene (Sampieri *et al.*, 2007).

Experimental: Debido a que se manipularon las variables.

Correlacional: Puesto a que asocia variables mediante un patrón predecible para un grupo o población. Tiene como propósito conocer la relación que existe entre dos o más conceptos, variables o categorías en un contexto particular (Canales *et al.*, 1986).

Transversal: En lo que refiere al periodo y secuencia del estudio, ya que se estudiaron las variables como se presentaron en el momento de la investigación, y se hizo un corte en el tiempo.

Universo y Muestra

Universo: Todas las mujeres de 40 a 75 años de la ciudad de Villa Carlos Paz, Córdoba, que asistieron al Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri”, durante el periodo Junio – Septiembre 2017.

Muestra:

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron 12 mujeres (mayores de edad de entre 40-75 años) mediante un muestreo por conveniencia, 6 de ellas con diagnóstico de cáncer de mama que cumplieron con los criterios de inclusión para participar en este estudio y 6 mujeres sin diagnóstico de CM (con parentesco de primer grado de las participantes, para minimizar la heterogeneidad genética). De cada una de ellas se obtuvieron 3 submuestras

conformadas por dos muestras de orina (con y sin cafeína) y una de sangre post ingesta de café. Conformando una totalidad de 36 submuestras.

Criterios de inclusión y exclusión:

Participantes de sexo femenino de 40-75 años, que cumplieron con las siguientes características:

- Que posean parentesco de primer grado (sexo femenino).
- Ausencia de factores de riesgo (condiciones ambientales, disminución de la actividad física, exposición a contaminantes ocupacionales y ambientales, modificaciones perjudiciales en los hábitos alimentarios y ciertos xenobióticos) que interfieran en el funcionamiento adecuado del hígado y riñones.
- No fumadoras (al menos 6 meses antes del estudio).
- Con ausencia de patologías hepáticas y renales.
- Que consuman habitualmente una dieta equilibrada y balanceada en Macro y Micronutrientes (basadas en las Recomendaciones de las Guías Alimentarias de la Población Argentina) (MSN, 2016).
- Que no hayan consumido 72hs antes del estudio alimentos, bebidas o fármacos que contengan cafeína, vegetales crucíferos, productos que contengan Lactobacillus (probióticos), y suplementos de vitaminas y minerales (Ver Anexo 1).
- Que no hayan estado expuestas a inhalación y contacto directo con pinturas.
- Que hayan dado su aprobación por escrito firmando una carta de consentimiento informado (Ver Anexo 2).
- Que residan en Villa Carlos Paz, Córdoba, durante el periodo en el que se realice el estudio.
- Sin adherencia a tratamientos terapéuticos en los últimos 6 meses.
- Desde el aspecto ético se obtuvieron los consentimientos informados de las participantes seleccionadas, a través de la firma de un documento escrito en el que se describe el protocolo N°3342 del proyecto marco titulado “Estudio de la actividad enzimática de CYP1A2, sus polimorfismos genéticos y marcadores inflamatorios como indicadores de susceptibilidad para Cáncer de Mama en Córdoba”, llevado a cabo por la Dra. Reartes, y el Prof. Dr. Reossi. El mismo fue leído detalladamente y firmado en el lugar donde se llevó a cabo el estudio ante la presencia de testigos. El protocolo y el

consentimiento contaron con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas (HNC- UNC) en el año 2017. (ver Anexo 2)

Operacionalización de las Variables

- Edad

Definición: Mujeres con edad ≥ 40 años y \leq a 75 años

Unidad de medida: Años

- Ingesta Alimentaria

Definición: Es la incorporación de alimentos en el aparato digestivo en relación con las necesidades dietéticas del organismo.

Unidad de medida: Adecuada o no, según Guías Alimentarias para la Población Argentina (MSN, 2016).

- Estado Nutricional según medidas antropométricas

Definición: Es la condición física que presenta una persona como resultado del balance entre sus necesidades e ingesta de energía y nutrientes; que determina la salud e influye sobre la enfermedad (FAO, 2016).

Unidad de medida: Índice de Masa Corporal (kg/m^2): Bajo peso $<$ a 18,5; Peso Normal de 18,5 a 24,9; Sobrepeso de 25 a 29,9; Obesidad $>$ a 30 (OMS 2000).

- Tipo de metabolitos de la cafeína en orina

Definición: Se incluye como metabolitos a la cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina); 5-acetilamino-6-formilamino-3-metiluracilo, 1-metilxantina, 1-ácido metilúrico, 1,7-ácido dimetilúrico. Se identificaron a través de HPLC-MS/MS, según la relación masa/carga (m/z) de cada metabolito.

Unidad de medida: micromol (μmol)

- Tipo de metabolitos de la cafeína en sangre

Definición: Se incluye como metabolitos a la Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); Paraxantina (17X), Teobromina (37X) y Teofilina (13X) (Tanaka *et al.*, 1992).

Unidad de medida: micromol (μmol)

- Cantidad de metabolitos de la cafeína en orina

Definición: Área de los picos de metabolitos urinarios de la cafeína, obtenidos mediante HPLC-MS/MS.

Unidad de medida: micromoles por litro ($\mu\text{mol/L}$)

- Cantidad de metabolitos de la cafeína en sangre

Definición: Área de los picos de metabolitos sanguíneos de cafeína, obtenidos mediante el cálculo de la relación molar de $(17X+13X+37X) / 137X$ (Tanaka *et al.*, 1992).

Unidad de medida: micromoles por litro ($\mu\text{mol/L}$)

Técnica e instrumentos de recolección de datos

1. Desde el aspecto ético se elaboró un documento escrito (Consentimiento Informado) en el que se describe el protocolo N° 3342 del proyecto marco mencionado anteriormente, el cual fue aprobado por el Comité de Ética del HNC-UNC.
2. Se realizó una reunión informativa en el Centro Médico Privado “San Ricardo Pampuri” con las mujeres dispuestas a participar del estudio y que cumplían con los criterios de inclusión.
3. Las participantes dieron su consentimiento por escrito mediante la firma de dicho documento donde se avaló su participación voluntaria en este estudio de investigación luego de haber recibido una explicación oral y escrita acerca del mismo.
4. Se realizó una encuesta para conocer la Ingesta Alimentaria de las participantes (Ver Anexo 3), mediante un formulario adaptado y validado de Navarro *et al.* (Navarro *et al.*, 2001), el cual viene siendo utilizado por el Grupo de Epidemiología Ambiental del Cáncer en Córdoba (GEACC). Dicho instrumento fue adaptado para el presente estudio, ya que solo se utilizó el segundo módulo del mismo, el cual está compuesto por una frecuencia de consumo alimentario.

5. Se tomaron medidas antropométricas tales como Peso y Talla para determinar el Estado Nutricional de dichas participantes, mediante el Índice de Masa Corporal. Para conocer el peso corporal se utilizó una balanza de pie "C.A.M." de precisión con margen de error de 100 g. La participante debió ubicarse de pie, parado en el centro de la balanza, con ropa liviana y sin zapatos. Para la Talla se utilizó el altímetro de la balanza, la persona se ubicó de pie, descalza, con el cuerpo erguido, la cabeza erecta y mirando al frente.
6. Se entregó un folleto informativo (Ver Anexo 4) el cual contenía los pasos a seguir previo a la toma de las muestras, y una lista de los alimentos y bebidas que no se podían consumir 72hs antes del estudio, principalmente aquellos que contienen cafeína o derivados, Lactobacillus (probióticos), suplementos de vitaminas y minerales y algunos medicamentos (Ver Anexo 1).
7. Ese mismo día se le entregó a cada una de las participantes un envase estéril de 120 mL para que recolectaran la primera orina el día de la toma de las muestras.
8. Las participantes 72hs antes de la toma de las muestras, realizaron la dieta explicada previamente y un ayuno de 8hs la noche previa. Antes de asistir al estudio recogieron la primera orina del día (Grant *et al.*, 1983) en el envase estéril provisto con anterioridad.
9. El día de la obtención de la muestra se recibieron los envases con la orina y se rotularon con las iniciales del nombre y apellido de cada participante (que permitió no hacer la identificación personalizada y resguardar la confidencialidad de los datos) seguido de la letra "B" que es la muestra "blanco" (sin cafeína) y por último la letra "O" representando la orina.
10. Posteriormente, se procedió a servir a cada una de ellas, una infusión de café, la cual fue preparada con 250 cc de agua hervida y 2 cucharadas de café instantáneo de 2 g cada una (equivalentes a 140 mg de cafeína) (Spigelman *et al.*, 1995; Ayari *et al.*, 2015) acompañado de dos medialunas.
11. Una vez transcurridas las 4hs posteriores a la toma del café se les entregó a las participantes otro recipiente esterilizado y se procedió a la recolección de una nueva muestra de orina, las cuales fueron rotuladas con las iniciales del nombre y apellido de cada participante seguido de la letra "C" que representa la muestra con cafeína y por último la letra "O" representando la orina. Luego se realizó la extracción de sangre

para determinar la actividad de la enzima CYP1A2. Esta etapa estuvo a cargo de las bioquímicas del Centro Médico y del Instituto de Biología Celular. Cada unidad muestral fue rotulada con las iniciales del nombre y apellido de cada participante seguido de la letra "C", y por último la letra "S" representando la sangre.

12. Una vez obtenidas las muestras las mismas fueron filtradas mediante una membrana Amicon Ultra-0.5 (Millipore®) para su posterior análisis en el Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicios en Alimentos (ISIDSA) a través del Equipo HPLC Agilent MS/MS.

Tratamiento de la muestra en orina:

Una vez obtenidas las muestras de orina de cada participante, estas fueron procesadas mediante un protocolo modificado de Ptolemy *et al.* (Ptolemy *et al.*, 2010).

Se recolectaron las muestras con una pipeta esterilizada 2 mL de orina que fueron colocadas en un recipiente esterilizado y etiquetado con las iniciales de los participantes. Las muestras de orina sin tratar fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

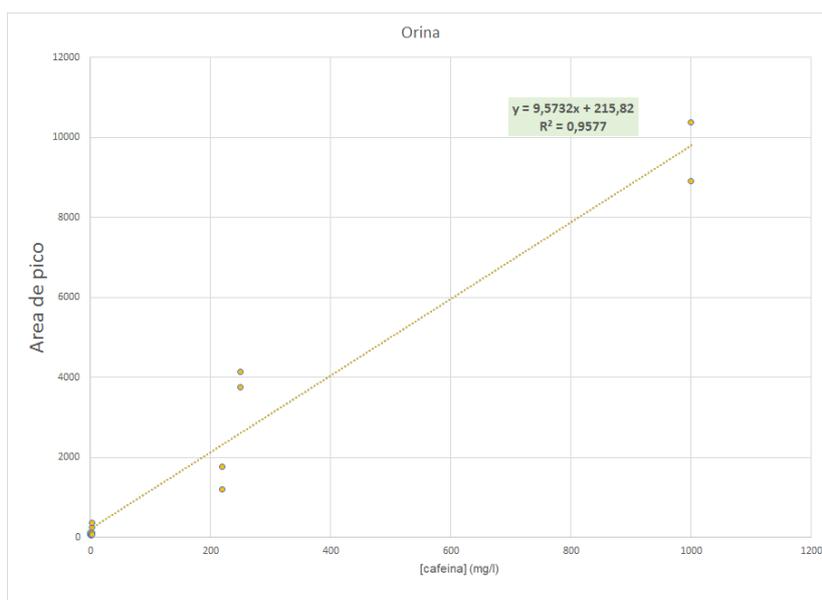
Para comenzar con el método de extracción, las muestras de orina se descongelaron hasta alcanzar temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos para remover partículas del fluido. Posteriormente una alícuota de 500 μL del sobrenadante fue transferida a la membrana Amicon Ultra-0.5 (Millipore®) (tamaño nominal de corte: 10 kDa) y centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm, obteniendo un filtrado de bajo peso molecular. Previo al análisis, se probaron diferentes diluciones del filtrado, con el objetivo de minimizar el efecto de la matriz en el espectrómetro de masas. El producto del filtrado de bajo peso molecular se diluyó con una proporción 1:20 con agua de calidad Milli-Q y se filtró con una membrana de 0,45 micras para su posterior análisis mediante HPLC.

Las muestras fueron analizadas en el Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicio en Alimentos (ISIDSA) de la Universidad Nacional de Córdoba. Para el desarrollo de este trabajo se utilizó un equipo HPLC Agilent MS/MS provisto de una bomba binaria (Agilent G1312B SL Binary), inyector automático (Agilent G1367 D SL+WP) y desgasificador (Agilent G1379 B). Se utilizó una columna para HPLC de fase reversa (Zorbax Eclipse XDB, C_{18} ; 1,8 μm ; 50 mm x 3,0 mm). El sistema de HPLC se

encuentra acoplado a un detector de diodo (Agilent G1315 C Satarlight DAD) y un espectrómetro de masas (micrOTOF-Q1 Series, Bruker), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fórmico 0,5% (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El volumen de inyección fue de 5 μL a un flujo de 0,25 mL/min.

La identificación y cuantificación de cafeína se llevó a cabo mediante el tiempo de retención y el área de pico, respectivamente, obtenidas a partir de un estándar comercial. La identificación del resto de los metabolitos urinarios de la cafeína (1-ácido metilúrico (1U); 1-metilxantina (1X); AFMU; 1,7-ácido dimetilúrico (17U) se estimaron a partir de datos disponibles en bibliografía (Ptolemy *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012).

Figura 3: Curva de cafeína en orina



Tratamiento de la muestra en sangre:

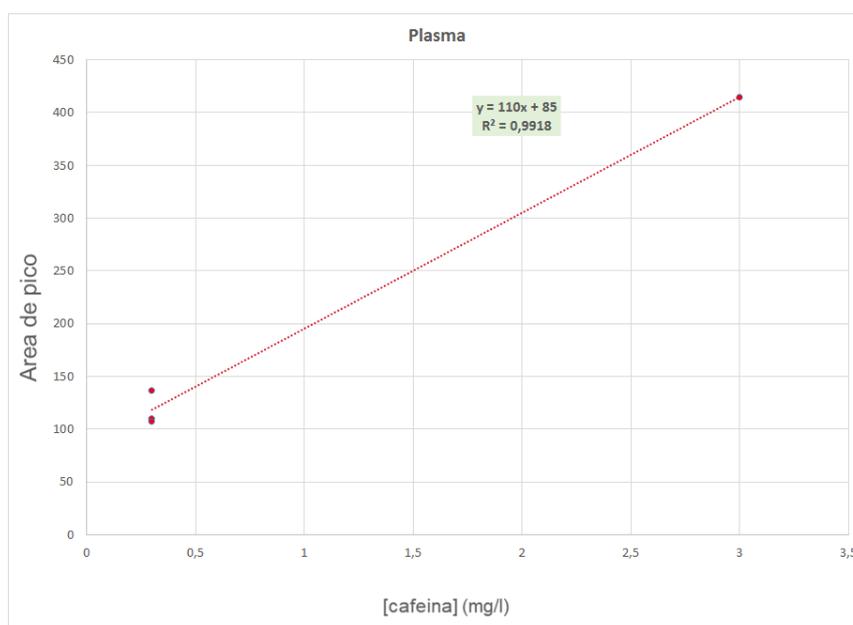
Una vez obtenidas las muestras de sangre (5 mL) de cada participante, fueron analizadas teniendo en cuenta un protocolo de análisis publicado por Ptolemy *et al.* (Ptolemy *et al.*, 2010).

El plasma se aisló a partir de sangre -a través de 7 minutos de centrifugación a 2000 rpm y 5 °C. Las muestras de plasma no tratadas se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Para comenzar con el método de extracción, las muestras de sangre se descongelaron a temperatura ambiente. A continuación, todas las muestras se inocularon inicialmente con el patrón interno de cafeína $^{13}C_3$ y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos para eliminar cualquier materia en partículas del fluido. Luego se transfirieron 500 μ L del sobrenadante a un filtro de corte de peso molecular (MWCO) de 10 kDa (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) y se centrifugaron durante 10 min a 12.000 rpm. El filtrado de bajo peso molecular se diluyó y se usó para su posterior análisis.

Finalmente, las muestras fueron llevadas a analizar mediante HPLC- MS/MS en el Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicio en Alimentos (ISIDSA) de la Universidad Nacional de Córdoba.

Figura 4: Curva de cafeína en plasma



Plan de tratamiento y análisis de datos:

Una vez llevado a cabo el trabajo de campo, donde se recolectó la información a través de una encuesta alimentaria, y obtenidas las medidas antropométricas de las participantes, se procedió a realizar el procesamiento de los datos. Para ello se codificaron y categorizaron las variables, ubicándolas en una base de datos de Microsoft Excel 2010 para su posterior análisis.

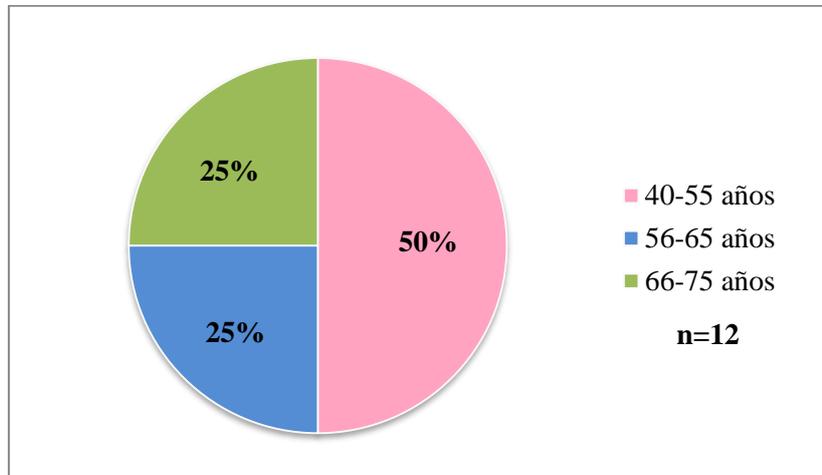
Para el tratamiento de datos se realizó primeramente la tabulación de los mismos, para luego llevar a cabo un análisis estadístico descriptivo a través de la construcción de tablas y gráficos de distribución de frecuencias (absolutas y relativas) y el cálculo de medidas resúmenes de posición y dispersión de las variables según su naturaleza. Además, se realizó una comparación entre variables. Para ello se utilizó la prueba de correlación de Pearson y test T de Student, que nos permitieron analizar la asociación entre los datos.

Por otra parte, mediante la observación de los metabolitos (en orina y sangre) se logró obtener datos representativos de las características de las muestras, los cuales fueron codificados y registrados en una planilla para ser analizados.

La etapa de análisis fue llevada a cabo por la Dra. Reartes y el Prof. Dr. Repossi en el Instituto de Biología Celular; mediante la realización de una curva de cafeína a partir de la identificación y cuantificación de sus metabolitos, mediante el tiempo de retención y área de pico, respectivamente, obtenidas a partir de un estándar comercial.

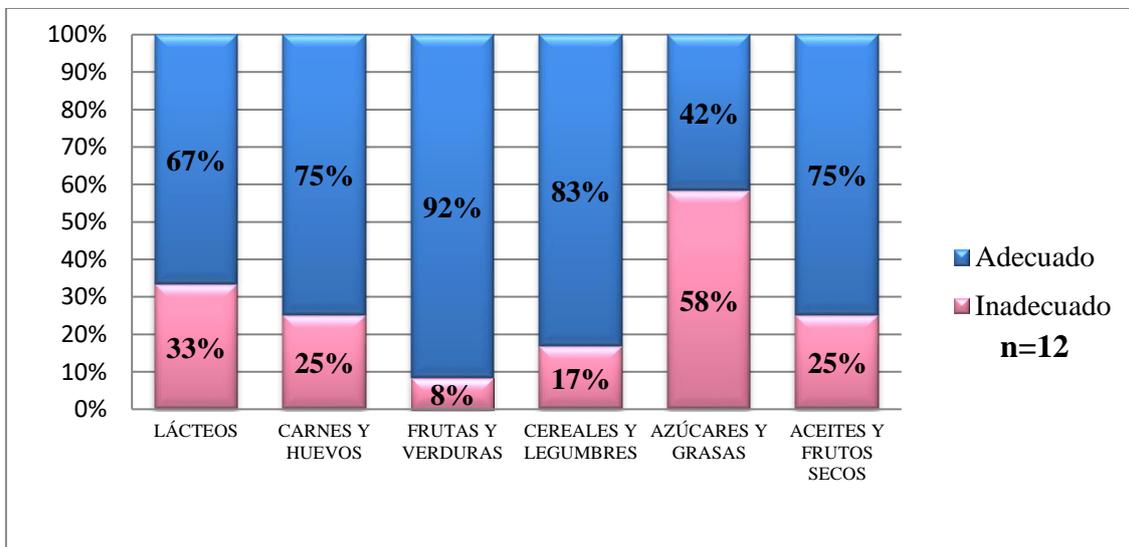
RESULTADOS

Figura 5: Edad del total de las participantes



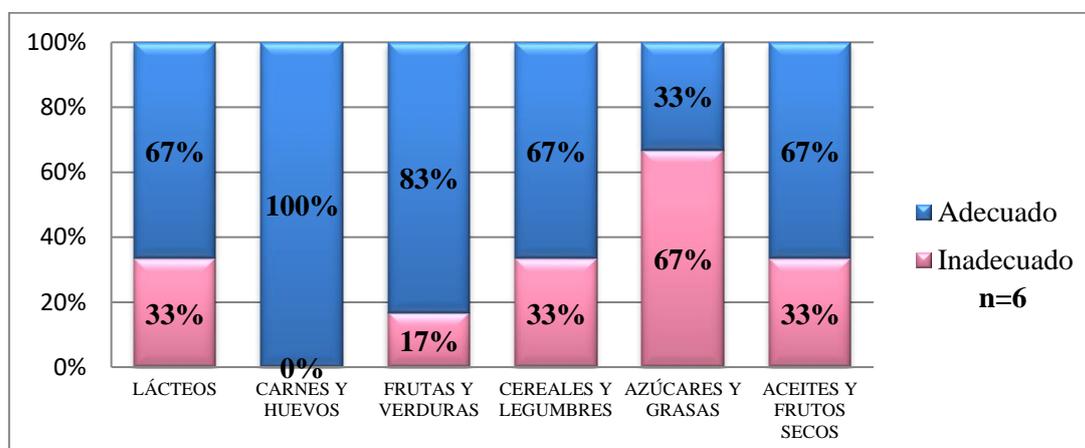
Interpretación: Se observa que del total de las participantes, un 50% presentó una edad comprendida entre 40 y 55 años, un 25% entre 56 y 65 años y el 25% restante entre 66 y 75 años.

Figura 6: Consumo de grupos de alimentos del total de las participantes



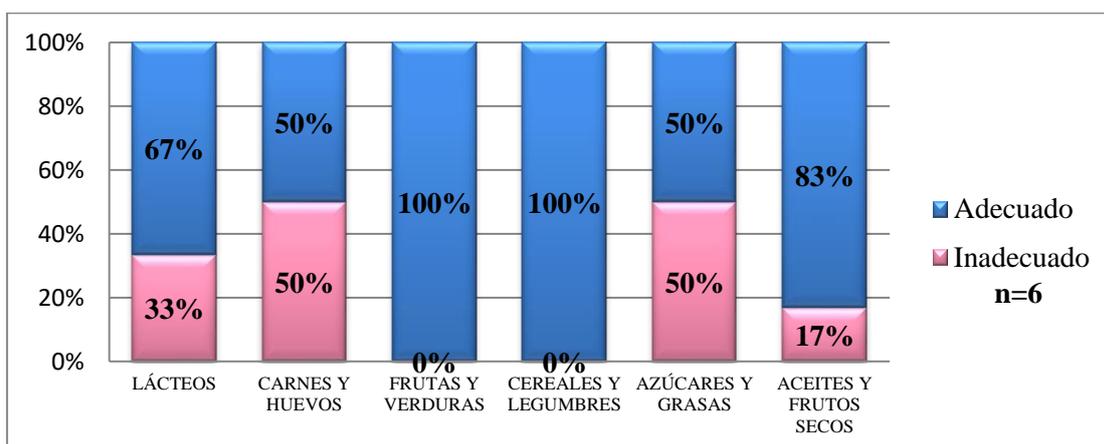
Interpretación: Se observa que del total de las participantes, la mayoría presentó un consumo adecuado principalmente del grupo de frutas y verduras (92%), seguido del grupo de cereales y legumbres (83%). Por otra parte, se puede observar un consumo inadecuado especialmente del grupo azúcares y grasas (58%)

Figura 7: Consumo de grupos de alimentos de las participantes con diagnóstico de cáncer de mama



Interpretación: Se observa que las participantes con diagnóstico de CM presentan un consumo adecuado principalmente del grupo de carnes y huevos (100%), seguido del grupo de frutas y verduras (83%), y en iguales proporciones los grupos de cereales y legumbres, aceites y frutos secos y lácteos (67%). Por otra parte se puede observar un consumo inadecuado del grupo azúcares y grasas (67%).

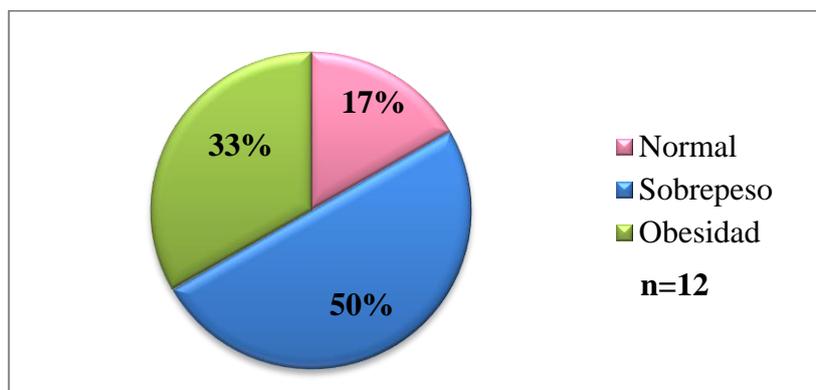
Figura 8: Consumo de grupos de alimentos de las participantes sin diagnóstico de cáncer de mama



Interpretación: Se observa que las participantes sin diagnóstico de CM presentaron un consumo adecuado principalmente de los grupos de frutas y verduras (100%), y cereales y legumbres (100%), seguido del grupo de aceites y frutos secos (83%) y lácteos (67%).

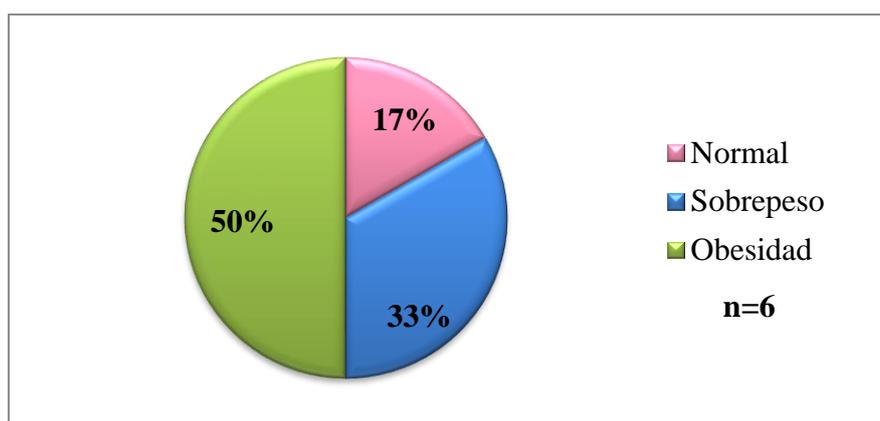
Por otra parte se puede observar un consumo inadecuado en los grupos de carnes y huevos, y azúcares y grasas (50%).

Figura 9: Distribución porcentual del Estado Nutricional del total de las participantes según IMC



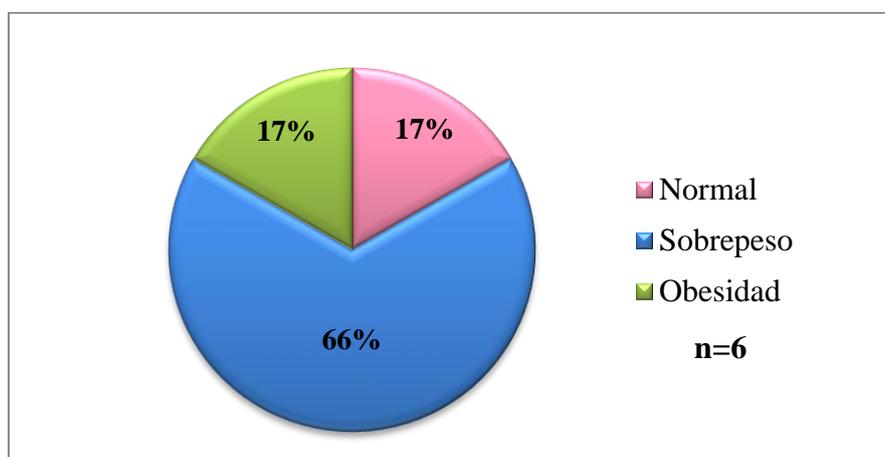
Interpretación: Se observa la distribución porcentual del Estado Nutricional de las participantes. Del total de ellas, la mitad (50 %) presentó un diagnóstico de Sobrepeso, con un IMC entre 25 a 29,9 kg/m², seguido de un importante porcentaje de casos de Obesidad (33%), con un IMC > a 30 kg/m², siendo poco frecuente un Estado Nutricional Normal (17%), con un IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m². La Media del IMC fue de 27,1 kg/m².

Figura 10: Distribución porcentual del Estado Nutricional de las participantes con diagnóstico de cáncer de mama según IMC



Interpretación: Se observa la distribución porcentual del Estado Nutricional de las participantes con diagnóstico de CM. Del total de ellas, la mitad (50%) presentó diagnóstico de Obesidad con un IMC > a 30 kg/m², seguido de un importante porcentaje de casos de Sobrepeso (33%) con un IMC entre 25 a 29,9 kg/m², siendo poco frecuente un Estado Nutricional Normal (17%), con un IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m².

Figura 11: Distribución porcentual del Estado Nutricional de las participantes sin diagnóstico de cáncer de mama según IMC



Interpretación: Se observa la distribución porcentual del Estado Nutricional de las participantes sin diagnóstico de CM. Del total de ellas, un 66% presentó diagnóstico de Sobrepeso con un IMC entre 25 a 29,9 kg/m², seguido de igual proporción de casos de Obesidad (17%) con un IMC >30 kg/m², y de Estado Nutricional Normal (17%), con un IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m².

Tabla2: Metabolitos urinarios de la cafeína expresados en micromolar (μmol)

METABOLITO	m/z	MUESTRAS											
		Participantes c/ diagnóstico de CM						Participantes s/ diagnóstico de CM					
		ALK	AB	HC	MMC	MD	TT	ANK	NM	LC	EM C	RD	ET
1- ácido metilúrico (1 U)	182,0	90	68	76	55	80	48	67	52	46	87	49	66
1- metilxantina (1X)	166,1	83	42	42	69	66	32	50	33	34	42	37	41
AFMU	226,1	115	86	108	131	101	77	63	79	52	139	97	68
1,7- ácido dimetilúrico (17U)	196,1	86	81	49	37	80	31	44	28	35	56	28	43
Cafeína (137X)	194,2	65	106	96	128	91	91	59	112	57	95	76	92

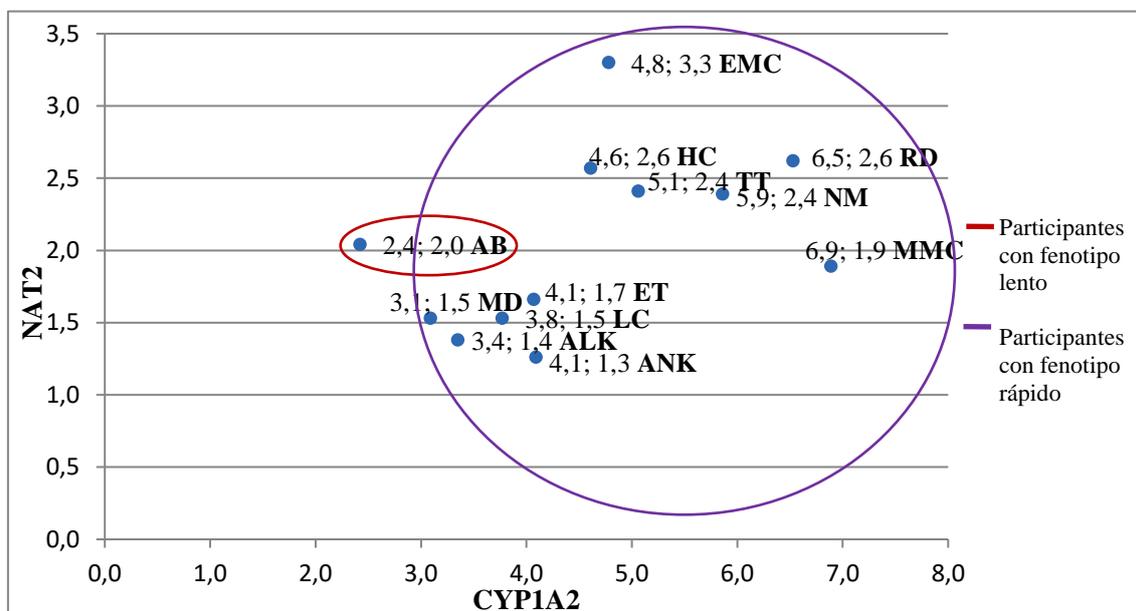
Determinaciones con HPLC MS/MS, relación masa/carga (m/z).

Tabla3: Actividad enzimática CYP1A2, NAT2, y fenotipificación

Actividad enzimática	MUESTRAS											
	Participantes c/ diagnóstico de CM						Participantes s/ diagnóstico de CM					
	ALK	AB	HC	MMC	MD	TT	ANK	NM	LC	EMC	RD	ET
Actividad enzimática de CYP1A2 Fenotipo (AFMU + 1U + 1X/ 17U)*	3,4	2,4	4,6	6,9	3,1	5,1	4,1	5,9	3,8	4,8	6,5	4,1
Actividad enzimática de NAT2 Fenotipo (AFMU/1X)*	1,4	2,0	2,6	1,9	1,5	2,4	1,3	2,4	1,5	3,3	2,6	1,7

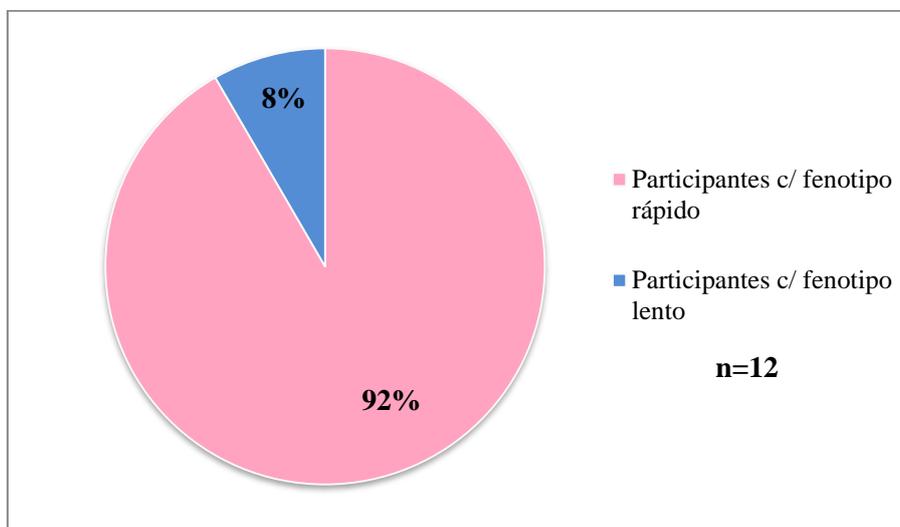
*Lang et al., 1994

Figura 12: Fenotipificación de CYP1A2 y NAT2 en orina del total de las participantes



Interpretación: Se puede observar un predominio de participantes con fenotipo rápido en relación a la actividad enzimática de CYP1A2. No se observan diferencias significativas entre las participantes con y sin diagnóstico de CM.

Figura 13: Distribución porcentual de los fenotipos del total de las participantes



Interpretación: Se observa que, del total de las participantes, un 92% presentó un fenotipo rápido, mientras que sólo un 8% de las participantes presentó un fenotipo lento. No se encuentran diferencias significativas entre las participantes con y sin diagnóstico de CM.

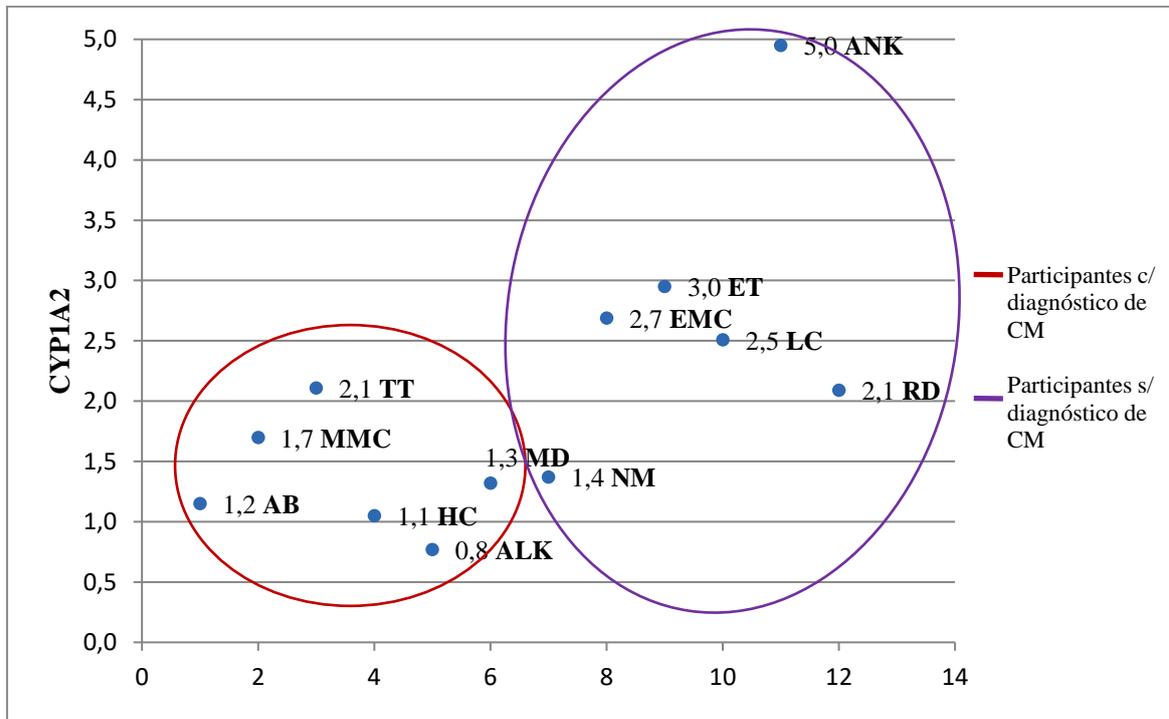
Tabla 4: Metabolitos de la cafeína en plasma expresados en micromolar (μmol)

METABOLITO	m/z	MUESTRAS											
		Participantes c/ diagnóstico de CM						Participantes s/ diagnóstico de CM					
		ALK	AB	HC	MMC	MD	TT	ANK	NM	LC	EMC	RD	ET
Paraxantina (17X)	180,2	25	87	54	83	54	81	91	58	86	135	91	83
Teobromina (37X)	180,2	16	30	23	46	21	32	6	26	36	19	42	22
Teofilina (13X)	180,2	7	6	5	9	7	24	7	12	11	16	11	7
Cafeína (137X)	194,2	62	107	78	81	62	65	21	70	53	63	69	38

Tabla 5: Actividad enzimática CYP1A2 en plasma

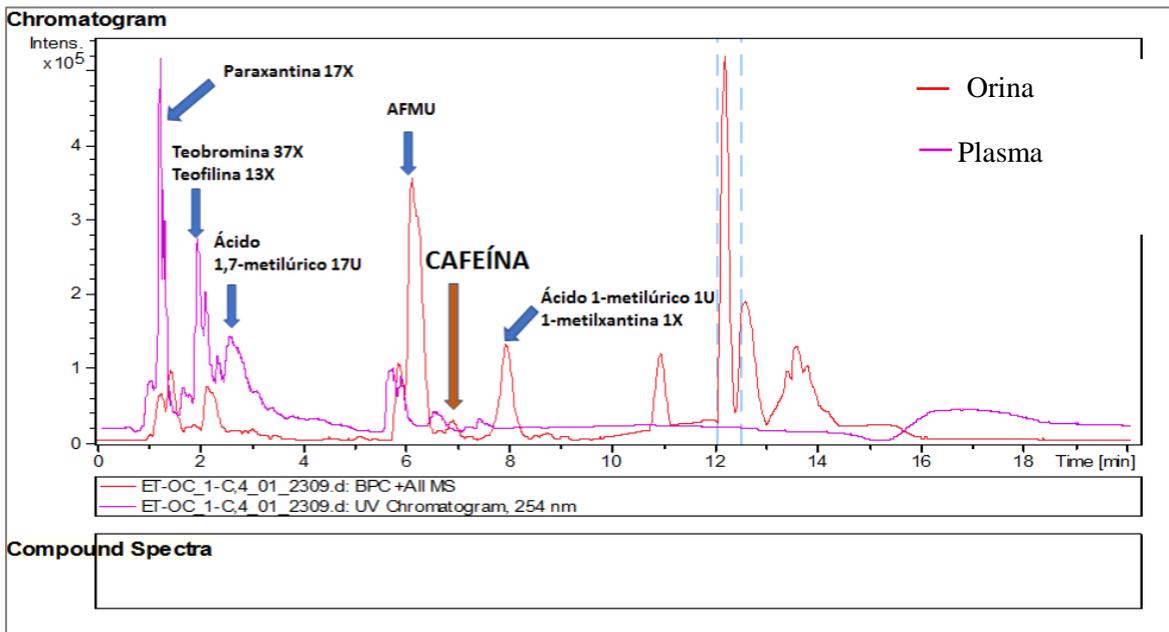
	MUESTRAS											
	Participantes c/ diagnóstico de CM						Participantes s/ diagnóstico de CM					
Actividad enzimática	ALK	AB	HC	MMC	MD	TT	ANK	NM	LC	EMC	RD	ET
Actividad enzimática de CYP1A2	0,8	1,2	1,1	1,7	1,3	2,1	5,0	1,4	2,5	2,7	2,1	3,0

Figura 14: Actividad enzimática de CYP1A2 en plasma del total de las participantes



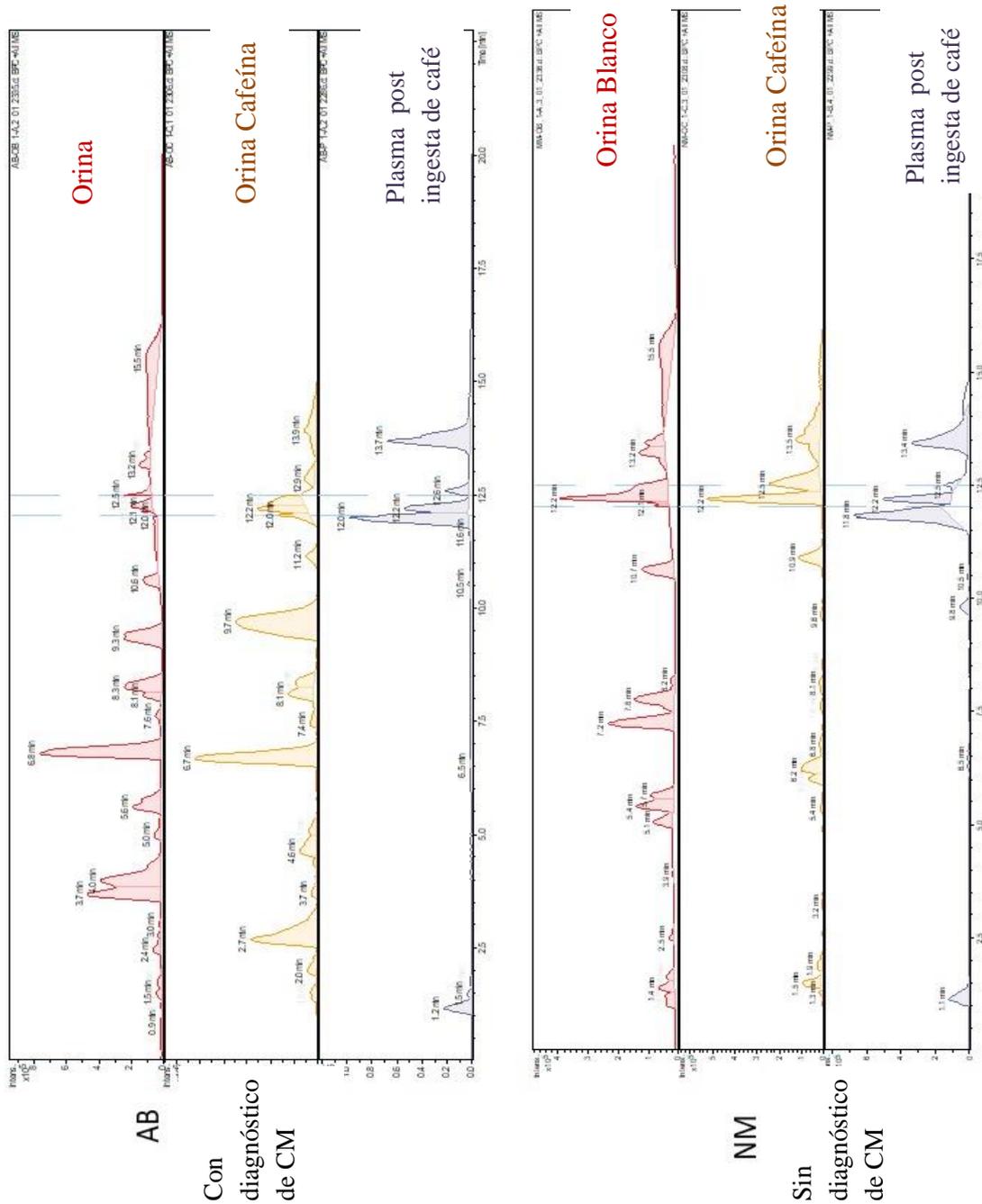
Interpretación: Se puede observar que las participantes sin diagnóstico de CM presentaron valores más altos de la actividad enzimática de CYP1A2 en plasma, que las participantes con diagnóstico de CM, por lo que las primeras presentan una mayor actividad enzimática que estas últimas.

Figura 15: Ejemplo de corrida de las muestras



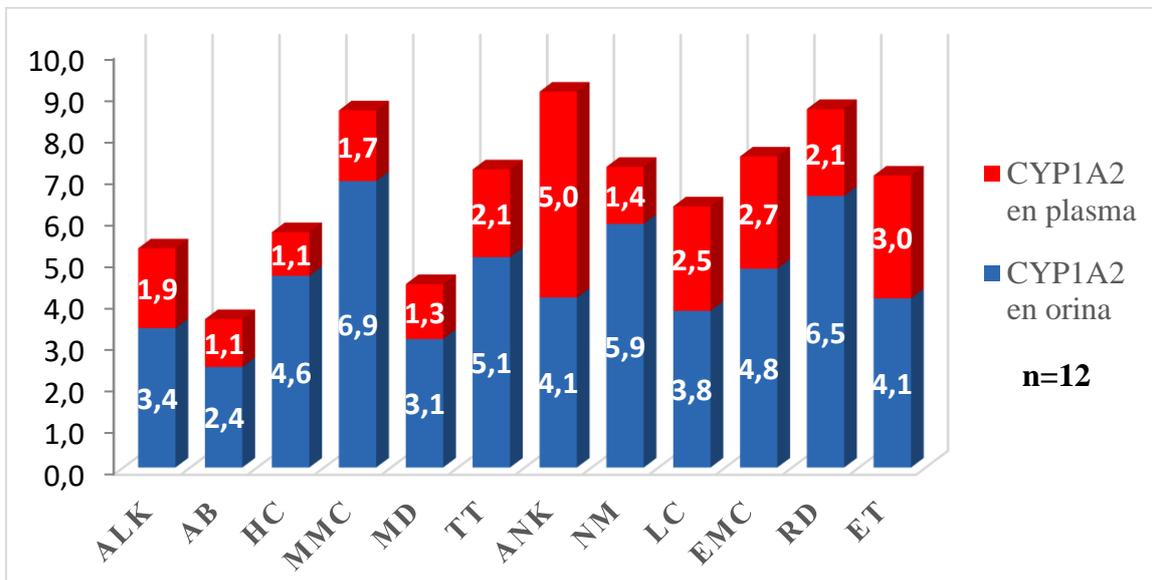
Interpretación: Se observa, a modo de ejemplo, la corrida de una muestra, donde se pueden ver los distintos picos, pudiéndose identificar la cafeína y sus metabolitos tanto urinarios como plasmáticos.

Figura 16: Corrida de las muestras AB y NM en orina y plasma, dilución 1:20



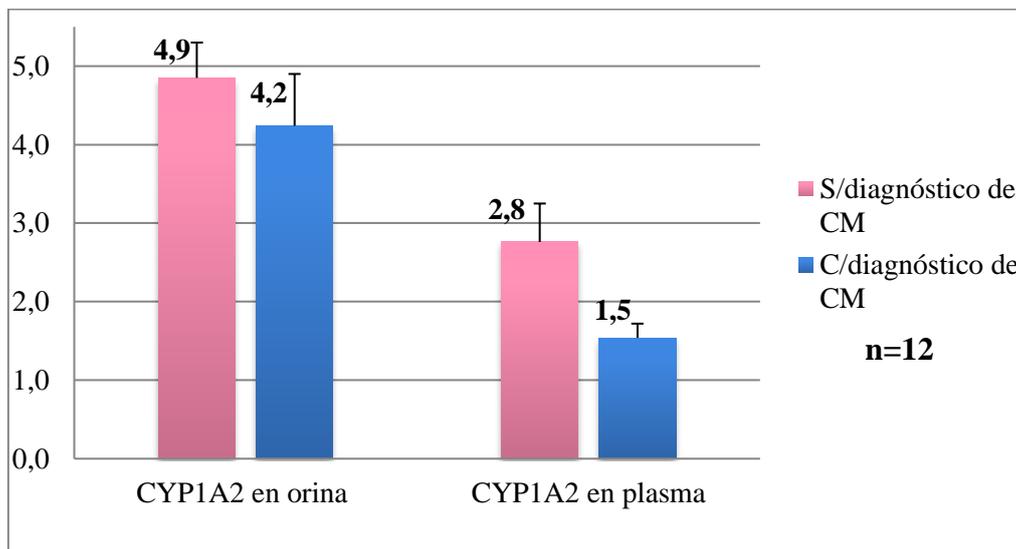
Interpretación: Se observa, a modo de ejemplo, la corrida de las muestras de dos participantes, una de ellas con diagnóstico de CM (AB) y su pareja sin diagnóstico (NM). Se pueden ver representados los distintos picos y sus respectivos tiempos de retención, identificándose a la cafeína y sus metabolitos en orina y plasma.

Figura 17: Actividad enzimática de CYP1A2 en orina y plasma del total de las participantes



Interpretación: Se pueden observar los valores de la actividad enzimática de CYP1A2 en orina y plasma del total de las participantes.

Figura 18: Media de la actividad enzimática de CYP1A2 en orina y plasma en participantes con y sin diagnóstico de CM



Interpretación: Se observa diferencias significativas en las Medias de la actividad enzimática en plasma de las participantes con y sin diagnóstico de CM ($P < 0,05$), siendo superiores los valores de las participantes sin diagnóstico.

DISCUSIÓN

Se han demostrado en diversos estudios que existen en la dieta muchos factores que pueden influir en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, tal es el caso de ciertos xenobióticos (AHC y HAP). Para conocer como el organismo metaboliza estas sustancias, diferentes autores han estudiado la actividad enzimática de CYP1A2 (Sachse *et al.*, 2003; Ayari *et al.*, 2015; González Arguello, 2002; Yuan *et al.*, 2008).

En el presente estudio el promedio de edad del total de las participantes fue de 57 años, similar a la media observada en un estudio realizado en Los Ángeles, la cual fue de 56 años (Yuan *et al.*, 2008). Estos valores se aproximan a la edad media a nivel global, estudiada por Flores Luna (Flores Luna *et al.*, 2008) la cual se sitúa en torno a los 60 años y por encima de los 65 supone un incremento en el diagnóstico de casos de CM.

Acorde a la Ingesta Alimentaria, se pudo observar un consumo adecuado principalmente del grupo de carnes y huevos entre las participantes con diagnóstico de CM, a diferencia de las participantes sin diagnóstico que presentaron un consumo adecuado principalmente del grupo de frutas y verduras. Estudios anteriores realizados por Pou *et al.*, (Pou *et al.*, 2014; Tumas *et al.*, 2015; Pou *et al.*, 2012) en la ciudad de Córdoba, demostraron que la población adhiere a tres patrones alimentarios, dos de ellos caracterizados por el alto consumo de carnes y bebidas azucaradas, que resultaron asociados a mayores riesgos de padecer cáncer de mama, próstata, colorrectal y de vías urinarias.

Con respecto al Estado Nutricional se observa un IMC correspondiente a Sobrepeso en un 50%, sin observar diferencias significativas entre las participantes con y sin diagnóstico de CM, en relación a esto, estudios similares realizados en Córdoba (Pou *et al.*, 2014; Tumas *et al.*, 2015; Pou *et al.*, 2012) encontraron un IMC correspondiente a Obesidad en un 34% de participantes con diagnóstico de cáncer de mama, hallando diferencias entre los participantes con y sin diagnóstico.

Para caracterizar el fenotipo de la población bajo estudio se utilizó la cafeína como sonda metabólica, por ser una sustancia inocua, accesible y de alta biodisponibilidad cercana al 100%, la cual es metabolizada principalmente en hígado por las enzimas CYP1A2 y NAT2, por lo que es utilizada para determinar su actividad (González Arguello, 2002). La cafeína fue suministrada a los participantes en forma de café instantáneo (140 mg de cafeína), al igual que el estudio realizado en Los Ángeles (Yuan *et al.*, 2008) y en Reino Unido (Sachse *et al.*, 2003) que utilizaron las mismas cantidades que en el presente

estudio. A diferencia de esto, los estudios realizados en Costa Rica (González Arguello, 2002) y Túnez (Ayari *et al.*, 2015) utilizaron cafeína pura.

Continuando con la línea de investigación de trabajos anteriores dirigidos por la Dra. Reartes, y la utilización del protocolo de Ptolemy *et al.*, (Ptolemy *et al.*, 2010) para la obtención de las muestras, se logró identificar y cuantificar los metabolitos de la cafeína tales como 1-ácido metilúrico (1U); 1-metilxantina (1X); AFMU; 1,7-ácido dimetilúrico (17U), presentes en orina, para conocer la actividad enzimática de CYP1A2 y el fenotipo, mientras que en plasma sólo se conoció la actividad de dicha enzima, a partir de sus metabolitos, paraxantina (17X), teobromina (37X) y teofilina (13X).

Se utilizaron puntos de corte de acuerdo a la clasificación adaptada de Lang (Lang *et al.*, 1994) para identificar a los fenotipos lentos (ML) o rápidos (MR), a partir de valores por encima y debajo de 2,9; mientras que los estudios realizados en Costa Rica (González Arguello, 2002) y Reino Unido (Sachse *et al.*, 2003), utilizaron valores comprendidos entre 0,6 y 13,4. Por otra parte, el estudio realizado en Los Ángeles (Yuan *et al.*, 2008) utilizó como punto de corte valores por encima y debajo de 0,34.

En relación a la fenotipificación de las participantes se observó un predominio del fenotipo rápido, sin encontrar diferencias significativas entre participantes con y sin diagnóstico, esto coincide con el estudio realizado por Ayari en la ciudad de Túnez (Ayari *et al.*, 2015) y el realizado por Lang en Estados Unidos (Lang *et al.*, 1994) los cuales también observaron un predominio del fenotipo rápido, sin encontrar diferencias significativas entre grupos con y sin diagnóstico de cáncer de mama y colorrectal respectivamente. En plasma se observó que las participantes sin diagnóstico de CM presentaban una actividad enzimática de CYP1A2 con valores superiores a las participantes con diagnóstico. En cuanto a esto, el estudio realizado en Túnez (Ayari *et al.*, 2015) no encontró diferencias significativas entre ambos grupos.

Entre las dificultades de nuestro estudio se destaca la búsqueda de las participantes debido a la complejidad de ciertos requisitos para participar del mismo, ya que las participantes con diagnóstico de CM se negaban a la extracción de la muestra de sangre y a la realización de la dieta.

Cabe destacar que sería oportuno continuar con esta línea de investigación, incluyendo el análisis de la vida media de la cafeína en plasma, para poder determinar la actividad enzimática de CYP1A2 con mayor precisión. Además sería de suma importancia, que el

análisis o estudio de la actividad enzimática sea utilizado como un biomarcador novedoso de factores de riesgo, para la prevención de distintos tipos de cáncer.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la actividad enzimática de CYP1A2 en fluidos biológicos (orina y sangre) en participantes con y sin diagnóstico de CM, de la ciudad de Villa Carlos Paz, Córdoba, durante el periodo Junio – Septiembre 2017.

En relación a la ingesta, se observó un consumo adecuado principalmente del grupo de carnes y huevos entre las participantes con diagnóstico de CM. Entre las participantes sin diagnóstico, el consumo adecuado estuvo representado principalmente por los grupos de frutas y verduras, y cereales y legumbres, respectivamente.

El Estado Nutricional del total de las participantes presentó un predominio de sobrepeso (50%) y obesidad (33%). Se hallaron correlaciones directas entre IMC y la actividad enzimática de CYP1A2 en orina, en participantes sin diagnóstico de CM (Coeficiente de Pearson: 0,53). Se encontraron correlaciones inversas entre IMC y la actividad enzimática de CYP1A2 en plasma, en participantes con diagnóstico (Coeficiente de Pearson: -0,54).

En cuanto a la fenotipificación, el 92% de las participantes presentaron un fenotipo rápido y sólo un 8% presentó un fenotipo lento, lo que induce a pensar que no existe diferencia real en cuanto a la capacidad metabólica de CYP1A2 en las participantes con y sin diagnóstico de CM.

Se observó que la actividad enzimática de CYP1A2 en plasma de las participantes sin diagnóstico de CM presentaba valores superiores a las participantes con diagnóstico, por lo que la capacidad del hígado para metabolizar sustancias tóxicas sería mayor en las primeras.

En relación a la primera hipótesis planteada, podemos decir que se observaron diferencias significativas sólo en los niveles plasmáticos de CYP1A2 entre las participantes con y sin diagnóstico de CM. En cuanto a la segunda hipótesis, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

Pretendemos con esto, generar nuevos interrogantes que sirvan de iniciativa para posteriores investigaciones relacionadas a la presente línea de investigación. Y, como futuras Licenciadas en Nutrición, es de gran importancia tomar compromiso en la promoción de la salud y prevención de enfermedades crónicas, como el cáncer de mama, para el logro de una mejor calidad de vida.

GUÍA DE ABREVIATURAS

- 137X: 1,3,7-trimetilxantina (Cafeína)
- 13X: 1,3- Dimetilxantina (Teofilina)
- 17U: 1,7- Ácido Dimetilúrico
- 17X: 1,7- Dimetilxantina (Paraxantina)
- 1U: 1- Ácido Metilúrico
- 1X: 1- Metilxantina
- 37X: 3,7- Dimetilxantina (Teobromina)
- 7U: 7- Ácido dimetilúrico
- AFMU: 5- acetilamino- 6- formilamino- 3- metiluracilo
- AHC: Aminas Heterocíclicas
- CA: Cáncer
- CM: Cáncer de mama
- HAA: Aminas aromáticas heterocíclicas
- HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- ML: Metabolizadores lentos
- MR: Metabolizadores rápidos
- RM: Razón metabólica
- XO: Xantinoxidasa

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aballay, L. R., Díaz, M. P., Francisca, F. M. & Muñoz, S. E. (2012). Cancer incidence and pattern of arsenic concentration in drinking water wells in Córdoba, Argentina. *International Journal of Environmental Health Research*, 22, 220-31.
- Abriata, M. G. (2013). Boletín de Vigilancia Epidemiológica del INC. Sistema de Vigilancia Epidemiológica y Reporte (SIVER). Instituto Nacional del Cáncer (INC), Ministerio de Salud de la Nación. *Octubre*, 4.
- Albala, C., Vaio, F., Kain, J. & Uauy, R. (2001). Nutrition transition in Latin America: the case of Chile. *Nutrition Reviews*, 59, 170-6.
- Angeli de Greaves, M. (2008). Metabolismo de Xenobióticos: Inducción e inhibición. Importancia de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Cátedra de Farmacología. Escuela de Medicina Luis Razetti. Universidad Central de Venezuela.
- Antolini, L., Biganzoli, E., Querzoli, P., Piantelli, M. & Alberti, S. (2015). Lymph Node Micrometastases Do Influence Breast Cancer Outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 3977-8.
- Ayari, I., Arnaud, M. J., Mani, A., Pavanello, S. & Saguem, S. (2015). Breast Cancer Association with CYP1A2 Activity and Gene Polymorphisms - a Preliminary Case-control Study in Tunisia. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 3559-63.
- Ayari, I., Fedeli, U., Saguem, S., Hidar, S., Khlifi, S. & Pavanello, S. (2013). Role of CYP1A2 polymorphisms in breast cancer risk in women. *Molecular Medicine Reports*, 7(1), 280-6.
- Bchir, F., Dogui, M., Ben Fradj, R., Arnaud, M. J. & Saguem, S. (2006). Differences in pharmacokinetic and electroencephalographic responses to caffeine in sleep-sensitive and non-sensitive subjects. *Comptes Rendus Biologies*, 329, 512-9.
- Bravo Tovar, B. B. (2004). *Reparto preferencial de ácidos carboxílicos en sistemas surfactante/agua/aceite por HPLC*. Tesis Doctoral presentada para optar al título de Doctora en Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Calle Aznar, S. (2011). *Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales*. PFC presentado para optar el título de Ingeniería Técnica

Industrial especialidad Química, Departamento de Química Industrial, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Barcelona, España.

- Canales, F. H., Alvarado, E. L. & Pineda, E. B. (1986). Metodología de la investigación. Manual para el desarrollo del personal de salud. *Limusa*. 7, 135.
- Cárdenas, C. V. & Litivinoff, C. (2012). Metabolitos de la cafeína como biomarcadores nutricionales de susceptibilidad. Córdoba, Argentina.
- Castell, J. V. El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. Cap. 3. Págs. 95-104. Disponible en http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf. (Consultada Febrero 2017).
- Cohen, G. (1983). In: Handbook of Neurochemistry, A. Lajtha, Ed, 2nd ed., Plenum, New York 4, 315-329.
- Coutiño Rodríguez, E. M. R., Purata, A. & Hernández Cruz, P. (2010). Citocromo P450 biomarcador de exposición terapéutico-toxicológico-carcinogénico. *Revista de educación bioquímica*, 29(2), 39-52.
- Dalh, A. R., Hadley, W. M., Hahn, F. F., Benson, J. M. & McClellan, R. O. (1982). Cytochrome P-450-dependent monooxygenases in olfactory epithelium of dogs: possible role in tumorigenicity, *Science*, 216(4541), 57-59.
- Díaz, M. P., Osella, A. R., Aballay, L. R., Muñoz, S. E., Lantieri, M. J., Butinof, M., Paz, R. M., Pou, S., Eynard, A. R. & La Vecchia, C. (2009). Cancer incidence pattern in Córdoba, Argentina. *European Journal of Cancer Prevention*, 18, 259–66.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud. Nutrición y salud, 2016.
- Flores Luna, L., Salazar Martínez, E., Duarte Torres, R. M., Torres-Mejía, G., Alonso Ruiz, P. & Lazcano Ponce, E. (2008). Prognostic factors related to breast cancer survival. *Salud pública Méx*, 50 (2).
- Geanta, R. M. (2009). *Recuperación de ácidos láctico y cítrico utilizando extracción micelar con membranas*. Tesis de Master. Departamento de biotecnología y Ciencias de los Alimentos, Área de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Burgos, Burgos, España.

- Gil, A. (2010). Tratado de Nutrición. Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. 2º Edición. *Editorial Médica Panamericana*; 737-39.
- Goeptar, A. R., Sheerens, H. & Vermeulen, N. P. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(1), 25-65.
- González Argüello, R. (2002). El citocromo 1A2 (CYP 1A2) en una población universitaria de Costa Rica. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 23(1-2), 25-31.
- Grant, D. M., Tang, B. K. & Kalow, W. (1983). Variability in caffeine metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 33(5), 591-602.
- Huang, M., Gao, J. Y., Zhai, Z. G., Liang, Q. L., Wang, Y. M., Bai, Y. Q. & Luo, G. A. (2012). An HPLC-ESI-MS method for simultaneous determination of fourteen metabolites of promethazine and caffeine and its application to pharmacokinetic study of the combination therapy against motion sickness. *J Pharm Biomed Anal*, 62, 119-28.
- IARC, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. (2012). *Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. WHO. Recuperado de <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- IARC, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. (2012). *Monographs Evaluate Consumption of Red Meat and Processed Meat*.
- INC, Instituto Nacional del Cáncer. (2015). *El Cáncer de mama en cifras en Argentina*. Ministerio de Salud de la Nación. Disponible en <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/cancer-de-mama/>.
- INC, Instituto Nacional del Cáncer. (2016). *Cáncer colorrectal*. Ministerio de Salud de la Nación. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/cancer-colorrectal/>.
- Kaku, M., Ichihara, K., Kusunose, E., Ogita, K., Yamamoto, S., Yano, I. & Kusunose, M. (1984). Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for prostaglandin and fatty acid hydroxylase activities from the microsomes of rabbit small intestinal mucosa. *Journal of Biochemistry*, 96, 1883-91.

- Kalow, W. & Tang, B.K. (1993). The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clin Pharmacol Ther*, 53, 503-14.
- Kot, M. & Daniel, W. A. (2008). Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacological Reports*, 60, 789-97.
- Kruk, J. (2014). Lifestyle Components and Primary Breast Cancer Prevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 10543–55.
- Landi, M. T., Sinha, R., Lang, N. P. & Kadlubar, F. F. (1999). Human cytochrome P450 1A2. *IARC Scientific Publications*, 148(148), 173-95.
- Lang, N. P., Butler, M. A., Massengill, J., Lawson, M., Craig Stotts, R., Hauer-Jensen, M. & Kadlubar, F.F. (1994). Rapid Metabolic Phenotypes for Acetyltransferase and Cytochrome P4501A2 and Putative Exposure to Food-borne Heterocyclic Amines Increase the Risk for Colorectal Cancer or Polyps. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 3, 675- 682.
- Lim, J. S., Singh, O., Ramasamy, R. D., Ramasamy, S., Subramanian, K., Lee, E. J., & Chowbay, B. (2010). Pharmacogenetics of CYP1A2, Novel Polymorphisms and Haplotypes in Three Distinct Asian Populations. *Drug Metab. Pharmacokinet*, 25(6), 616-23.
- Lin, J. H. & Lu, A. Y. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, 35(5), 361-90.
- Luca, F., Bubba, G., Basile, M., Brdicka, R., Michalodimitrakis, E., Rickards, O., Vershubsky, G., Quintana-Murci, L., Kozlov, A. I. & Novelletto, A. (2008). Multiple Advantageous Amino Acid Variants in the NAT2 Gene in Human Populations. *Plos one*, 3(9), 3136.
- Martínez Ortega, R. M., Tuya Pendás, L. C., Martínez Ortega, M., Pérez Abreu, A. & Cánovas, A. M. (2009). El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 8(2).
- Mensch, J., Noppe, M., Adriaensen, J., Melis, A., Mackie, C., Augustijns, P. & Brewster, M. E. (2007). Novel generic UPLC/MS/MS method for high throughput analysis applied to permeability assessment in early Drug Discovery. *J Chromatogr B Analyt Technol BiomedLifeSci*, 847(2), 182-7.
- Miners, J. O. & Birkett, D. J. (1996). The Use of Caffeine as a Metabolic Probe for Human Drug Metabolizing Enzymes. *Gen. Pharmacol*, 27(2), 245-9.

- Ministerio de comunicación pública y desarrollo estratégico. (2015). *Cáncer de mama: la detección temprana aumenta las chances de curación*. Recuperado de <http://prensa.cba.gov.ar/salud/cancer-de-mama-la-deteccion-temprana-aumenta-las-chances-de-curacion/>.
- Mok, Y., Won, S., Kimm, H., Nam, C., Ohrr, H. & Jee, S. H. (2012). Physical activity level and risk of death: the severance cohort study. *Journal of Epidemiology*, 22, 494-500.
- MSN, Ministerio de Salud de la Nación. (2016). Guías Alimentarias para la Población Argentina.
- Nakajin, S., Shively, J. E., Yuan, P. M. & Hall, P. F. (1981). Microsomal cytochrome P- 450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17, 20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry*, 20(14), 4037-42.
- Navarro, A. (1998). Fatty acids, fibres and colorrectal cancer risk in Córdoba, Argentina. *Journal of Epidemiology and Biostatistics*, 3, 415.
- Navarro, A., Muñoz, S. E. & Eynard, A. R. (1995). Diet, feeding habits and risk of colorrectal cancer in Córdoba, Argentina. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 14, 287-91.
- Navarro, A., Muñoz, S. E., Lantieri, M. J., Díaz, M. P., Cristaldo, P. E., Fabro, S. P. & Eynard, A. R. (2004). Meat cooking habits and risk of colorrectal cancer in Córdoba, Argentina. *Nutrition*, 20(10), 873-7.
- Navarro, A., Osella, A., Muñoz, S., Guerra, V, Eynard, A. & Lantieri, M. (2001). Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire in assessing dietary intakes and food habits in epidemiological cancer studies in Argentina. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Researc*, 20 (3), 365-370.
- Nebert, D. W. & González, F. J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem*, 56, 945-93.
- Nebert, D. W. (1999). Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist?. *Clin Genet*, 56 (4), 247-58.

- Nebert, D. W., Mckinnon, R. A. & Puga, A. (1996). Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biology*, 15(4), 273-280.
- Nelson, D., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Estabrook, R., Gunsalus, I. & Nebert, D. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6, 1-42.
- Ogita, K., Kusunose, E., Yamamoto, S., Ichihara, K. & Kusunose, M. (1983). Multiple forms of cytochrome P-450 from kidney cortex microsomes of rabbits treated with phenobarbital. *Biochem Int*, 6, 191-198.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2000).
- Orellana, B. M. & Guajardo, T. V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile*, 132, 1.
- Ortiz de Montellano, P. (1995). Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. *AM. CHEM. SOC*, 127(34).
- Pardo Lozano, R., Alvarez García, Y., Barr al Tafall, D. & Farré Albaladejo, M. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Revista Adicciones*, 19(3), 225-38.
- Poos, M. I, Costello, R. & Carlson-Newberry, S. J. (1999). Committee on Military Nutrition Research. Institute of Medicine (US). *National Academies Press (US)*.
- Pou, S. A., Díaz, M. D. & Osella, A. R. (2012). Applying multilevel model to the relationship of dietary patterns and colorectal cancer: an ongoing case-control study in Córdoba, Argentina. *European Journal of Nutrition*, 51, 755-64.
- Pou, S. A., Niclis, C., Aballay, L., Tumas, N., Román, M. D., Muñoz, S. E., Becaria Coquet, J. & Diaz, M. P. (2014). Cáncer y su asociación con patrones alimentarios en Córdoba, Argentina. *Nutrición Hospitalaria*, 29, 618-28.
- Pou, S. A., Osella, A. R., Eynard, A. R. & Diaz, M. P. (2010). Cancer mortality in Córdoba, Argentina, 1986-2006: an age-period-cohort analysis. *Tumori*, 96, 202-12.
- Ptolemy, A. S., Tzioumis, E., Thomke, A., Rifai, S. & Kellogg, M. (2010). Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a single analytical protocol applicable to

cocoa intervention studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 878(3-4), 409-16.

- Román, M. D., Niclis, C., Tumas, N., Diaz, M. P., Osella, A. R. & Muñoz, S. E. (2014). Tobacco smoking pattern and differential food effects on prostate and breast cancer among smokers and non-smokers in Cordoba, Argentina. *European Journal of Cáncer Prevention*, 23, 310-8.
- Sachse, C., Bhabra, U., Smith, G., Lightfoot, T. J., Barrett, J. H., Scollay, J., Garner, R. C., Boobis, A. R., Wolf, C. R. & Gooderham, N. J. (2003). Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 55(1), 68–76.
- Sampieri, R., Fernández Coliado, C. & Baptista P.L. (2007). Metodología de la Investigación. México. *Mc Graw Hill Inter americana*, 120-163.
- Serajbit-Singh C. J., Wolf C. R., Philpot R. M. & Plopper C. G. (1980). Cytochrome p- 450: localization in rabbit lung. *Science*, 207(4438), 1469-70.
- Shimada, T. & Hayes, C. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Re*, 56, 2979.
- Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P. & Sutter, T. R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res*, 1, 2979-84.
- Spigelman, A. D., Farmer, K. C. R., Oliver, S., Nugent, K. P., Bennett, P. N., Notarianni, L. J., Dobrocky, P. & Phillips, R. K. S. (1995). Caffeine phenotyping of cytochrome P4501A2, N-acetyltransferase, and xanthine oxidase in patients with familial adenomatous polyposis. *Gut*, 36, 251-254.
- Tanaka, E., Ishikawa, A. & Yamamoto, Y. (1992). A simple useful method for the determination of hepatic function in patients with liver cirrhosis using caffeine and its three major dimethylmetabolites. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology*, 30, 336-41.
- Tang, D., Liu, J. J., Rundle, A., Neslund-Dudas, C., Savera, A. T., Bock, C. H., Nock, N. L., Yang, J. J. & Rybicki, B. A. (2007). "Grilled Meat Consumption

and PhIP- DA Adducts in Prostate Carcinogenesis". *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 16(4), 803-8.

- Tumas, N., Niclis, C., Osella, A., Díaz, M. P. & Carbonetti, A. (2015). Tendencias de mortalidad por cáncer de mama en Córdoba, Argentina, 1986–2011: algunas interpretaciones sociohistóricas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 37, 330–6.
- Van der Hoeven, T. A. & Coon, M. J. (1974). Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from rabbit liver microsomes. *J Biol Chem*, 249, 6302-10.
- Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, 1(6), 80-83.
- Williams, D. E., Hale, S. F., Okita, R. F. & Masters, B. S. (1984). A prostaglandin omega-hydroxylase cytochrome P-450 (P-450PG-omega) purified from lungs of pregnant rabbits. *J Biol Chem*, 259(23), 14600-8.
- Windmill, K. F., Gaedigk, A., Hall, P., Samaratunga, H., Grant, D. M. & McManus, M. E. (2000). Localization of N-Acetyltransferases NAT1 and NAT2 in Human Tissues. *Toxicological sciences*, 54(1), 19-29.
- Wislocki, P. G. & Miwa, G. T. (1986). Enzymatic Basis of Detoxication. *J. Agric. Food Chem*, 34, 947- 952.
- Yuan, J. M., Chan, K. K., Coetzee, G. A., Castelao, J. E., Watson, M. A., Bell, D. A., Wang, R & Yu, M. C. (2008). Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Integrative Cancer. Research*, 29(7), 1386-93.
- Yun, J., Xu, C. T. & Pan, B. R. (2009). Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese. *World J Gastroenterol*, 15(7), 788-803.

ANEXOS

- **ANEXO I:** Lista de alimentos, bebidas y fármacos que no se pueden consumir

Alimentos y Bebidas con Cafeína	<ul style="list-style-type: none">• Café• Té• Mate cebado• Mate cocido• Bebidas Cola• Bebidas Energizantes (Speed, Red Bull, Monster, Vigoration)• Guaraná• Cacao• Chocolate
Vegetales Crucíferos	<ul style="list-style-type: none">• Brócoli• Coliflor• Repollo• Repollitos de Brusela
Alimentos con Lactobacillus	<ul style="list-style-type: none">• Yogur• Quesos (excepción queso crema)
Otros Alimentos	<ul style="list-style-type: none">• Pomelo• Carnes con costra (asada, a la plancha)
Fármacos c/ Cafeína	<ul style="list-style-type: none">• Ibuprofeno (Actrón, Ibuevanol)• Paracetamol• Diclofenac• Aspirina

- ✓ Evitar el consumo de alcohol y tabaco

- ✓ BEBIDAS E INFUSIONES QUE SE PUEDEN CONSUMIR:
 - Infusiones: Leche endulzada, leche con esencia de vainilla, té de limón; de frutas, jengibre, menta, hierbabuena, manzanilla, cola de caballo, boldo y valeriana.
 - Bebidas: Agua, soda, agua saborizada (limón, naranja, manzana, mandarina) jugos de frutas naturales o comerciales (excepto de pomelo), gaseosas no colas (excepto de pomelo), agua tónica, bebidas isotónicas (Gatorade, Powerade), limonada con menta y jengibre y licuados de frutas.

ANEXO II: Consentimiento informado

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

INTRODUCCIÓN

Usted está siendo invitado a participar de un proyecto de investigación denominado “Estudio de la actividad enzimática de CYP1A2, sus polimorfismos genéticos y marcadores inflamatorios como indicadores de susceptibilidad para Cáncer de Mama en Córdoba”, que se desarrolla en y/o coordinado por la Dra. Gabriela Reartes en el Instituto de Biología Celular, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Antes de firmar su consentimiento es importante que lea cuidadosamente y comprenda la información detallada sobre el presente estudio. Tómese el tiempo necesario para leerla cuidadosamente. Puede analizarla con amigos, familiares si lo desea y siéntase libre de hacer todas las preguntas que tenga sobre el mismo. Si hay palabras que no comprende con claridad, pídale al investigador que se las explique. No firme este formulario a menos que esté dispuesto a participar.

Se utilizarán los datos para una investigación cuyo objetivo es: Determinar perfiles con diferente susceptibilidad a partir de su capacidad metabólica para algunos tóxicos pro-cancerígenos, asociados al riesgo de padecer cáncer de mama, mediante el análisis de actividad enzimática, expresión de los polimorfismos de CYP1A2 y su correlación con marcadores inflamatorios en participantes de la provincia de Córdoba.

Le estamos solicitando su autorización para: estudiar la susceptibilidad individual a la carcinogénesis química, que es altamente variable, por la presencia de modificaciones en las enzimas (polimorfismos) que participan en el metabolismo de las sustancias tóxicas, originadas por factores ambientales o genéticos que derivan en variaciones de la eficiencia y/o velocidad de las rutas que metabolizan estas sustancias tóxicas para nuestras células. Para estudiar estas características se han utilizado diferentes sustancias inofensivas, como la cafeína presente en el café, que comparten la misma vía de metabolización que algunas sustancias tóxicas. Por esto estudiando la degradación de la

cafeína nos indica cómo se comportaría nuestro metabolismo frente a ciertas sustancias tóxicas pro-cancerígenas a las cuales habitualmente estamos expuestos.

El metabolismo de la cafeína se lleva a cabo principalmente en el hígado, en este proceso se encuentra involucrada especialmente la enzima CYP1A2, perteneciente al Citocromo P450. Para describir la manera en que se comporta esta enzima, se calculará el índice de la actividad metabólica de CYP1A2, que consiste en determinar la relación entre la fracción inalterada de cafeína excretada en orina y cada uno de sus metabolitos de degradación urinarios. Como resultado de esto se determinará el fenotipo que expresa la capacidad de dicha enzima. Así se puede clasificar a los individuos como metabolizadores rápidos (MR) o metabolizadores lentos (ML), asociándose este último con la mayor sensibilidad a ciertas sustancias tóxicas como las aminas heterocíclicas.

Se espera que los resultados obtenidos de este trabajo contribuyan a mejorar las medidas de prevención y tratamiento para personas con cáncer de mama o en riesgo de padecerlo. La primera instancia del presente estudio, consiste en la extracción de una muestra de 5 mL de sangre a las 5hs de haber ingerido una dosis de 140 mg de cafeína representada en una taza de café de 250 mL, llevado a cabo por personal capacitado y autorizado, bajo condiciones de higiene y con material estéril sellado herméticamente para disminuir cualquier complicación. Con dicha muestra se determinarán los polimorfismos de la enzima estudiada y se valorarán además biomarcadores de inflamación (interleuquina 6 (IL-6), proteína C reactiva (CRP)). También se les solicitará una muestra de orina de 120 mL a la misma hora de la extracción de sangre post ingesta de café, siguiendo un diseño experimental para determinar la actividad enzimática CYP1A2 y sus polimorfismos. Sólo deberá asistir una sola vez para la recolección de dichas muestras sin haber ingerido café ni derivados del mismo 72hs previas a la recolección de las muestras.

Reserva de muestras o procesamiento: para mantener la confidencialidad, se les asignará un código a las muestras biológicas de sangre como la de orina, para no ser identificables con el participante. Las mismas se procesarán en el Instituto de Biología Celular, FCM, UNC. Enf. Gordillo esq. Enrique Barros, Ciudad Universitaria. TE: (03514334020)- (Cel. 0351- 154597664). Lunes a viernes de 9 a 14 hs. Estas muestras no se utilizarán para otro fin que el indicado en este estudio y luego de procesadas se destruirá inmediatamente.

Riesgos e incomodidades previstas: los posibles riesgos de participar en el estudio, son mínimos. Es posible que experimente alguna incomodidad al momento de la extracción de las muestras de sangre, además la misma puede provocar dolor, o moretones en el lugar de la aplicación. Si experimentara algún efecto colateral durante este estudio, debe informarlo a los profesionales responsables del estudio de inmediato. Asistirá una sola vez al Instituto de Biología Celular y el tiempo insumido será de una hora.

Además, cabe destacar, que no recibirá remuneración ni beneficio alguno por parte de los investigadores y /o de otras instituciones participantes. Asimismo, puede abandonar el estudio o suspender su participación cuando así lo desee y sin mediar explicación alguna y que su rechazo a participar no le ocasionará ningún perjuicio. El participante podrá retirarse hasta la inclusión de sus datos en los resultados globales, donde ya no podrán ser individualizados. Además, los gastos serán totalmente asumidos por los responsables del estudio y como participante no tendrá ninguna responsabilidad en este hecho.

Mediante la firma del consentimiento informado, usted no renuncia a ninguno de los derechos que le corresponden según las leyes de nuestro país y está de acuerdo en permitir al personal de la investigación, las dependencias sanitarias del gobierno y los Consejos de Ética de la investigación, que valoren el desarrollo de la investigación. Su nombre se mantendrá en total confidencialidad hasta el punto que la ley lo permita. La información que Usted proporcione o que se recopile no será divulgada a terceros sin su permiso explícito. Si los resultados del estudio se publican o se presentan en congresos, no incluirán datos personales que puedan identificarlos. La Ley 25326 de protección de datos personales salvaguarda su información personal. Los datos personales, es decir que los registros que se efectúen serán identificados con un código y no con el uso de su nombre y sólo se utilizarán para los propósitos mencionados en este estudio.

El conocimiento que se logre construir con su participación servirá para actualizar información acerca de: especificar los potenciales beneficios sociales de la investigación. Además, será útil para: señale otra importancia siempre social que justifique la investigación.

Si tiene dudas como sujeto que participa en una investigación puede contactar al comité de Ética de las Investigaciones en Salud que ha aprobado este estudio del Hospital Nacional de Clínicas, coordinadora Dra. Susana Vanoni, lunes a viernes de 08 a 15 hs, Santa Rosa 1564, B° Clínicas y/o al Consejo de Evaluación Ética de las Investigaciones en Salud – CoEIS – Belgrano 1500 esq. Richardson, lunes a jueves de 09 a 12 hs).

Para consultas relacionadas con el diseño de la investigación puede contactar al equipo de investigadores: Dra. Reartes Gabriela. Instituto de Biología Celular, INICSA. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. E-mail: gabyreartes@yahoo.com.ar. Lugar y Teléfono de contacto: Instituto de Biología Celular, FCM, UNC. Enf. Gordillo esq. Enrique Barros, Ciudad Universitaria. TE: (03514334020)- (Cel. 0351- 154597664). Lunes a viernes de 9 a 14 hs.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Al firmar expreso mi conformidad para participar de una investigación que me ha sido claramente explicada. He leído y comprendido la hoja de información y he tenido la posibilidad de formular las preguntas y estoy satisfecho con la información recibida. He sido informado por un investigador cuyo nombre y apellido se hace constar al pie de este documento.

Tengo conocimiento que mi participación es libre y voluntaria y que puedo retirarme sin perjuicio. Se me ha informado que los datos que deriven de este estudio solo podrán ser suprimidos de la base de datos hasta el momento que sean integrados y publicados de manera anónima, donde no habrá ya forma de suprimirlos.

Acepto la realización de los distintos procedimientos implicados y conozco los riesgos eventuales y debo manifestar cualquier molestia que se presente durante los mismos.

Entiendo que no recibiré remuneración por participar ni otros beneficios. La investigación tampoco me generará erogaciones.

Los resultados podrán ser presentados en reuniones científicas o publicados en revistas especializadas manteniendo siempre la reserva de los datos personales.

PARTICIPANTE / PACIENTE

FIRMA:.....

ACLARACIÓN:.....

DNI:.....

FECHA:.....

INVESTIGADOR QUE OBTUVO EL CONSENTIMIENTO:

FIRMA:.....

ACLARACIÓN:.....

DNI:.....

FECHA:.....

• ANEXO III: Encuesta Alimentaria

Copyright© Navarro, Alicia.1999

ENCUESTA ALIMENTARIA

8

COD.	¿Qué alimentos consumía habitualmente?.. ALIMENTOS Tipos de cocción	¿Con que frecuencia?...			¿Qué cantidad?...			Observaciones
		N	Días/ Mes	Días/ Sem.	Veces /Día	P	M	
L908	LECHE DESCREMADA							
L554	LECHE ENTERA							
L832	YOGUR ENTERO							
L243	YOGUR DESCREMADO							
L768	QUESO MANTECOSOS							
L557	QUESO SEMI-DURO (Tipo Senda)							
L135	QUESO DE RALLAR							
L380	QUESO RALLADO							
L578	RICOTTA							
H500	HUEVO FRITO							
H380	HUEVO ENTERO							
C672	CARNE MAGRA HERVIDA							
C698	CARNE MAGRA PLANCHA C/C							
C052	CARNE MAGRA PLANCHA S/C							
C406	CARNE MAGRA PARRILLA C/C							
C804	CARNE MAGRA PARRILLA S/C							
C731	CARNE MAGRA HORNO C/C							
C269	CARNE MAGRA HORNO S/C							
C002	CARNE FRITA C/C							
C096	CARNE FRITA S/C							
C402	CARNE GRASA HERVIDA							
C851	CARNE GRASA PLANCHA C/C							
C554	CARNE GRASA PLANCHA S/C							
C908	CARNE GRASA PARRILLA C/C							
C832	CARNE GRASA PARRILLA S/C							
C089	CARNE GRASA HORNO C/C							
C803	CARNE GRASA HORNO S/C							
C001	CARNE GRASA FRITA C/C							
C067	CARNE GRASA FRITA S/C							
C822	PUCHERO HERVIDO C/ CARACU							
C336	PUCHERO HERVIDO S/ CARACU							
C161	ASADO DE TIRA-COSTILLA/PARRILLA C/C							
C621	ASADO DE TIRA-COSTILLA/PARRILLA S/C							
C192	MOLLEJA PARRILA C/C							
C927	MOLLEJA PARRILLA S/C							
C284	LENGUA HERVIDA							
C886	CHINCHULIN PARRILA C/C							
C282	CHINCHULIN PARRILA S/C							
C881	SESOS HERVIDOS							

Prof. Dr. HUGO O. VILARRODONA
COORDINADOR

ESTA HOJA DE REGISTRO INFORMADO DE
AL POLICIA HA SIDO APROBADA POR EL C.I.E.I.S.
POLICIA HOSPITALARIO EL 13 FEB 2006

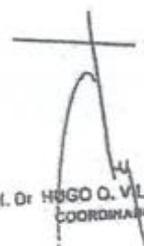
123

COD.	ALIMENTOS Tipos de cocción	N	Días/ Mes	Días/ Sem.	Veces /Día	P	M	G	Observaciones
C243	CHORIZO HERVIDO (GUIZO)								
C254	CHORIZO PARRILA C/C								
C472	CHORIZO PARRILA S/C								
C768	MORCILLA								
C557	SALCHICHA PARRILERA HERVIDA								
C835	SALCHICHA PARRILERA PARRILLA C/C								
C566	SALCHICHA PARRILERA PARRILLA S/C								
C135	SALCHICHA DE VIENA HERVIDA								
C607	CERDO HERVIDO								
C075	CERDO PLANCHA C/C								
C993	CERDO PLANCHA S/C								
C174	CERDO PARRILLA C/C								
C788	CERDO PARRILLA S/C								
C262	CERDO HORNO C/C								
C654	CERDO HORNO S/C								
C618	GALLINA C/PIEL HERVIDA								
C350	GALLINA S/PIEL HERVIDA								
C396	POLLO C/PIEL HERVIDO								
C518	POLLO S/PIEL HERVIDO								
C854	POLLO C/PIEL PLANCHA C/C								
C500	POLLO C/PIEL PLANCHA S/C								
C353	POLLO S/PIEL PLANCHA C/C								
C465	POLLO S/PIEL PLANCHA S/C								
C359	POLLO C/PIEL PARRILLA C/C								
C218	POLLO C/PIEL PARRILLA S/C								
C659	POLLO S/PIEL PARRILLA C/C								
C403	POLLO S/PIEL PARRILLA S/C								
C144	POLLO C/PIEL HORNO C/C								
C663	POLLO C/PIEL HORNO S/C								
C616	POLLO S/PIEL HORNO C/C								
C732	POLLO S/PIEL HORNO S/C								
C865	POLLO C/PIEL FRITO C/C								
C219	POLLO C/PIEL FRITO								
C573	POLLO S/PIEL FRITO C/C								
C946	POLLO S/PIEL FRITO S/C								
P339	PESCADO GRASO PLANCHA C/C								
P338	PESCADO GRASO PLANCHA S/C								
P944	PESCADO GRASO PARRILLA C/C								
P503	PESCADO GRASO PARRILLA S/C								
P004	PESCADO GRASO FRITO C/C								
P314	PESCADO GRASO FRITO S/C								

Prof. Dr. HUGO O. VILARRODONA
COORDINADOR

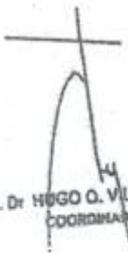
ESTA Hoja de consentimiento informado de
los FOLIOS HA SIDO APROBADA POR EL C.E.I.S.
POLO HOSPITALARIO EL 13 FEB 2006

COD.	ALIMENTOS Tipos de cocción	N	Días/ Mes	Días/ Sem.	Veces /Día	P	M	G	Observaciones
P388	PESCADO MAGRO HERVIDO								
P669	PESCADO MAGRO PLANCHA C/C								
P469	PESCADO MAGRO PLANCHA S/C								
P319	PESCADO MAGRO PARRILLA C/C								
P939	PESCADO MAGRO PARRILLA S/C								
P568	PESCADO MAGRO HORNO C/C								
P399	PESCADO MAGRO HORNO S/C								
P005	PESCADO MAGRO FRITO C/C								
P153	PESCADO MAGRO FRITO S/C								
P724	ATUN Y CABALLA								
P383	SARDINA EN ACEITE								
C017	BONDIOLA								
C380	SALAMIN								
C578	JAMON CRUDO								
C388	JAMON COCIDO-PALETA								
C105	MORTADELA								
C724	SALCHICHON								
C383	SALAME MILAN								
C306	PANCETA-TOCINO FRITO C/C								
C379	PANCETA-TOCINO HERVIDO (guiso)								
C242	QUESO DE CERDO								
V698	ACELGA OTRA COCCION								
V118	ACHICORIA								
V318	AJO COCIDO								
V145	AJO CRUDO								
V822	ALCAUCIL OTRA COCCION								
V282	APIO CRUDO								
V426	ARVEJAS FRESCAS O EN LATA								
V406	BATATA OTRA COCCION								
V804	BERENJENA OTRA COCCION								
V889	BERRO CRUDO								
V017	BROCOLI OTRA COCCION								
V231	CALABAZA O CALABACIN OTRA COCCION								
V927	CEBOLLA CRUDA								
V562	CEBOLLA FRITA								
V972	CEBOLLA OTRA COCCION								
V953	CHAUCHA OTRA COCCION								
V629	CHOCLO OTRA COCCION								
V242	COLIFLOR OTRA COCCION								
V243	ESPARRAGO OTRA COCCION								
V862	ESPINACA OTRA COCCION								
V580	LECHUGA								


 Prof. Dr. HUGO O. VILARRODONA
 COORDINADOR

ESTA HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE
 LOS FOLIOS HA SIDO APROBADA POR EL C.E.I.S.
 POLO HOSPITALARIO EL 13.EEB.2008.

COD.	ALIMENTOS Tipos de cocción	N	Días/ Mes	Días/ Sem.	Veces /Día	P	M	G	Observaciones
V016	PAPA FRITA								
V078	PAPA OTRA COCCION								
V404	PEPINO CRUDO								
V947	PIMIENTO CRUDO								
V638	PIMIENTO OTRA COCCION								
V089	RABANITO CRUDO								
V573	REMOLACHA OTRA COCCION								
V803	REPOLLO CRUDO								
V748	REPOLLO OTRA COCCION								
V041	TOMATE CRUDO								
V746	TOMATE OTRA COCCION								
V938	ZANAHORIA CRUDA								
V310	ZANAHORIA OTRA COCCIO								
V192	ZAPALLITO OTRA COCCION								
V269	ZAPALLO OTRA COCCION								
F211	ANANA (crudo)								
F926	ANANA CONSERVA								
F337	BANANA (cruda)								
F254	CIRUELA (cruda)								
F605	CIRUELA OTRA COCCION								
F472	DAMASCO (crudo)								
F432	DURAZNO (crudo)								
F273	DURAZNO OTRA COCCION								
F665	FRUTILLA (cruda)								
F077	KIWI (crudo)								
F208	LIMON (crudo)								
F675	MANDARINA (cruda)								
F434	MANZANA (cruda)								
F735	MANZANA OTRA COCCION								
F242	MELON (crudo)								
F867	NARANJA (cruda)								
F594	PERA (cruda)								
F556	PERA OTRA COCCION								
F377	POMELO (crudo)								
F453	SANDIA (cruda)								
F804	UVA (cruda)								
N371	MANI								
N375	NUEZ								
N711	ALMENDRA								


 Prof. Dr. HUGO O. VILARRODONA
 COORDINADOR

ESTA HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE
 27 SOLICITANTES HA SIDO APROBADA POR EL C.I.E.I.S.
 POLO HOSPITALARIO EL 13 FEB. 2006

--

COD.	ALIMENTOS Tipos de cocción	N	Días/ Mes	Días/ Sem.	Veces /Día	P	M	G	Observaciones
T379	PAN FRANCES								
T631	PAN NEGRO								
T613	CRIOLLOS								
T301	PAN CON GRASA								
T300	TORTA FRITA								
T297	TORTA								
T303	FACTURAS								
T811	GALLETITAS DULCES								
T892	GALLETITAS SALADAS								
T655	GALLETITAS INTEGRALES								
T920	GRANOS NO INTEGRALES								
T393	GRANOS INTEGRALES								
T188	PASTAS								
D802	LENTEJA								
D951	SOJA								
D231	POROTO-GARBANZO-ARVEJA								
G262	ACEITE DE GIRASOL (crudo)								
G654	ACEITE DE MAIZ (crudo)								
G338	ACEITE DE OLIVA (crudo)								
G788	ACEITE DE UVA (crudo)								
G993	ACEITE MEZCLA (crudo)								
G188	ACEITE PATITO (crudo)								
G075	CREMA DE LECHE (cruda)								
G908	GRASA DE CERDO (cruda)								
G832	GRASA DE VACA (cruda)								
G557	MANTECA (cruda)								
G244	MARGARINA (cruda)								
G607	MAYONESA								
1803	CAFÉ								
1426	MATE BOMBILLA								
1940	MATE COCIDO								
1089	TE								
M803	CACAO								
A889	AZUCAR								
A916	DULCE DE LECHE								
A242	MERMELADAS								
A089	MIEL								


 Prof. Dr. HUGO Q. VILARRODONA
 COORDINADOR

ESTA HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE
 AL FOLIOS HA SIDO APROBADA POR EL C.I.E.I.S.
 POLO HOSPITALARIO EL 13 FEB 2006

ANEXO IV: Folleto Informativo



¿QUIÉNES PUEDEN PARTICIPAR?

Mujeres de 40 a 75 años que:

- « Posean hermana o hija
- « No sean fumadoras
- « No tengan patologías hepáticas y/o renales
- « No estén en tratamiento terapéutico (últimos 6 meses)

PROMOCIÓN DE LA SALUD Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES CRÓNICAS



Instituto de Biología Celular - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba

Centro Médico Privado “Ricardo Pampuri”

Intendente J. García 457, Villa Carlos Paz, Córdoba
Teléfono: (03541) 436772 o (05412) 430557
Correo electrónico: info@fgad.org.ar
Web: www.fgad.org.ar

Las enfermedades crónicas (EC), entre las que se incluye el cáncer, son las de mayor prevalencia e importancia a nivel mundial.

En Argentina el cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente y en la ciudad de Córdoba representa el 25% total de los mismos

¿Cuáles son los FACTORES DE RIESGO?

Se conoce que algunos factores de riesgo contribuyen a aumentar el riesgo de padecer estas enfermedades. Tales como:

- Edad
- Género
- Características genéticas individuales
- Exposición a contaminantes
- Hábitos alimentarios inadecuados
- Disminución de la actividad física
- Ingesta de alcohol

Llevaremos a cabo un ESTUDIO..

... en el que se pretende conocer la predisposición a padecer algún tipo de proceso tumoral, con el objetivo de contribuir a la PROMOCIÓN de la salud y la PREVENCIÓN de EC.

¿EN QUÉ CONSISTE?

- > Conocer la Ingesta Alimentaria (Encuesta)
- > Conocer el Estado Nutricional (Peso y Talla)
- > Realizar una Dieta durante 2 días
- > Obtención de 1 muestras de Sangre y 1 de Orina
- > Consumo de una infusión de Café

ANEXO V. I: Tabla de frecuencia del consumo alimentario del total de las participantes

	Lácteos		Carnes y Huevos		Frutas y Verduras		Cereales y Legumbres		Azúcares y Grasas		Aceites y Frutos secos	
	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %
Adecuado	8	67	9	75	11	92	10	83	5	42	9	75
Inadecuado	4	33	3	25	1	8	2	17	7	58	3	25
TOTAL	12	100	12	100	12	100	12	100	12	100	12	100

ANEXO V. II: Tabla de frecuencia del consumo alimentario de las participantes con diagnóstico de CM

	Lácteos		Carnes y Huevos		Frutas y Verduras		Cereales y Legumbres		Azúcares y Grasas		Aceites y Frutos secos	
	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %
Adecuado	4	66	6	100	5	83	4	67	2	33,3	4	67
Inadecuado	2	33	0	0	1	17	2	33	4	66,7	2	33
TOTAL	6	100	6	100	6	100	6	100	6	100	6	100

ANEXO V. III: Tabla de frecuencia del consumo alimentario de las participantes sin diagnóstico de CM

	Lácteos		Carnes y Huevos		Frutas y Verduras		Cereales y Legumbres		Azúcares y Grasas		Aceites y Frutos secos	
	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %	ni	fi %
Adecuado	4	67	3	50	6	100	6	100	3	50	5	83
Inadecuado	2	33	3	50	0	0	0	0	3	50	1	17
TOTAL	6	100	6	100	6	100	6	100	6	100	6	100

ANEXO VI. I: Tabla del Estado Nutricional del total de las participantes según IMC

PARTICIPANTES	PESO(Kg)	TALLA(m²)	IMC (Kg/m²)	ESTADO NUTRICIONAL
AB	62,7	1,50	29,0	SOBREPESO
ET	62,4	1,46	29,3	SOBREPESO
MMC	56,6	1,58	22,7	NORMOPESO
NM	64,7	1,60	25,3	SOBREPESO
LC	49,8	1,56	20,5	NORMOPESO
TT	97,1	1,60	35,7	OBESIDAD
HC	87,2	1,65	35,4	OBESIDAD
EMC	73,7	1,57	29,2	SOBREPESO
ANK	67,1	1,59	27,9	SOBREPESO
ALK	74,8	1,63	28,2	SOBREPESO
RD	90,3	1,60	35,3	OBESIDAD
MD	85,0	1,60	33,2	OBESIDAD

ANEXO VI. II: Tabla de distribución porcentual del Estado Nutricional del total de las participantes

Estado Nutricional de las participantes	ni	fi %
Normopeso	2	17
Sobrepeso	6	50
Obesidad	4	33
TOTAL	12	100

ANEXO VI. III: Tabla de distribución porcentual del Estado Nutricional de las participantes con diagnóstico de CM

Participantes c/ diagnóstico de CM		
IMC	n	f%
Normal	1	17
Sobrepeso	2	33
Obesidad	3	50
TOTAL	6	100

ANEXO VI. IV: Tabla de distribución porcentual del Estado Nutricional de las participantes sin diagnóstico de CM

Participantes s/ diagnóstico de CM		
IMC	n	f%
Normal	1	17
Sobrepeso	4	67
Obesidad	1	17
TOTAL	6	100

ANEXO VII: Tabla de distribución porcentual de los fenotipos del total de las participantes

Participantes	n	fi%
Participantes c/ fenotipo lento	11	92
Participantes c/ fenotipo rápido	1	8
TOTAL	12	100

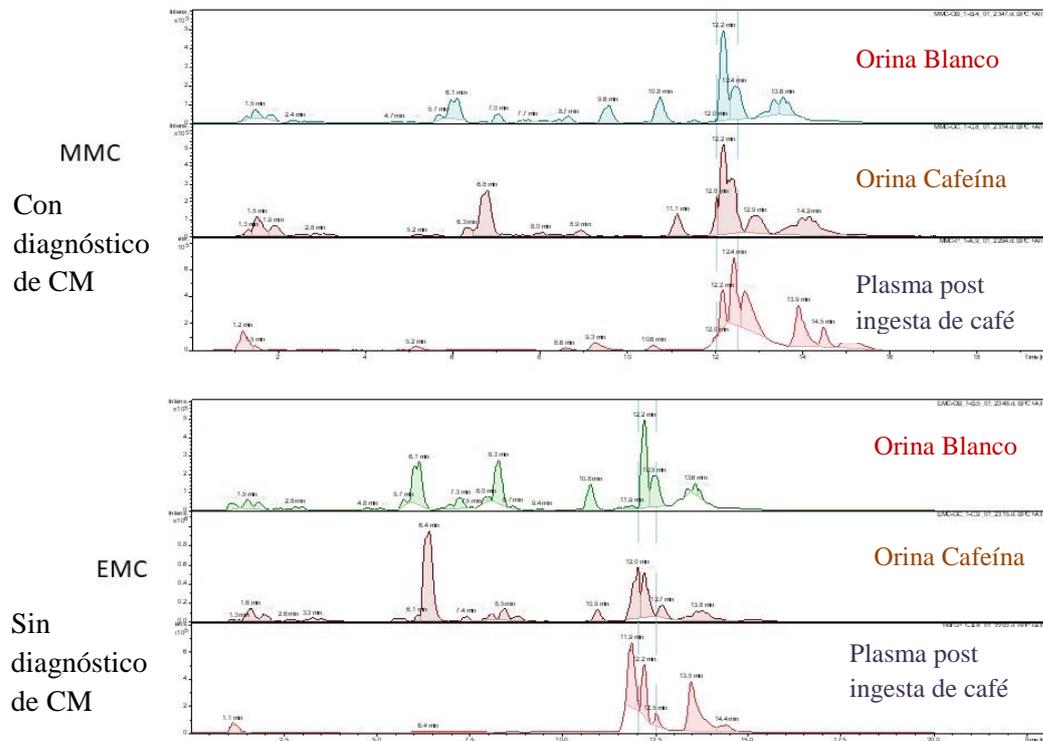
ANEXO VIII. I: Tabla de actividad enzimática y fenotipificación de CYP1A2 en orina

Muestras	CYP1A2
c/ diagnóstico de CM	
AB	2,4
MMC	6,9
TT	5,1
HC	4,6
ALK	3,4
MD	3,1
s/diagnóstico de CM	
NM	5,9
EMC	4,8
ET	4,1
LC	3,8
ANK	4,1
RD	6,5

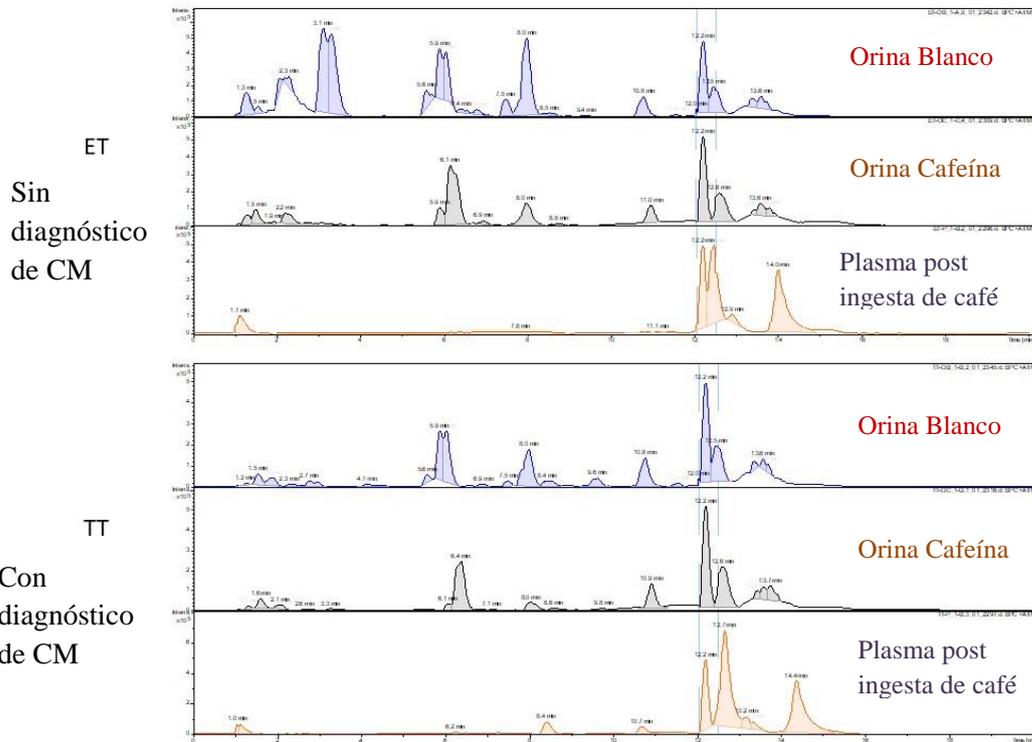
ANEXO VIII. II: Tabla de actividad enzimática de CYP1A2 en plasma

Muestras	CYP1A2
c/diagnóstico de CM	
AB	1,2
MMC	1,7
TT	2,1
HC	1,1
ALK	0,8
MD	1,3
s/diagnóstico de CM	
NM	1,4
EMC	2,7
ET	3,0
LC	2,5
ANK	5,0
RD	2,1

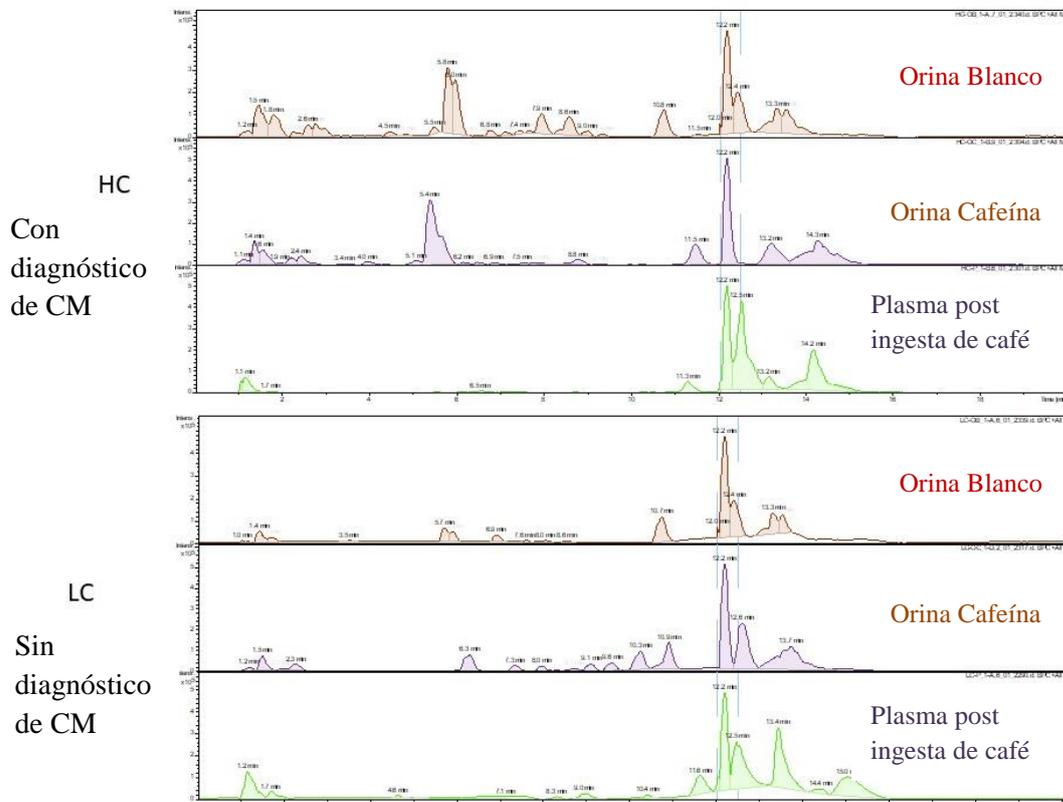
ANEXO IX. I: Corrida de las muestras MMC y EMC dilución 1:20



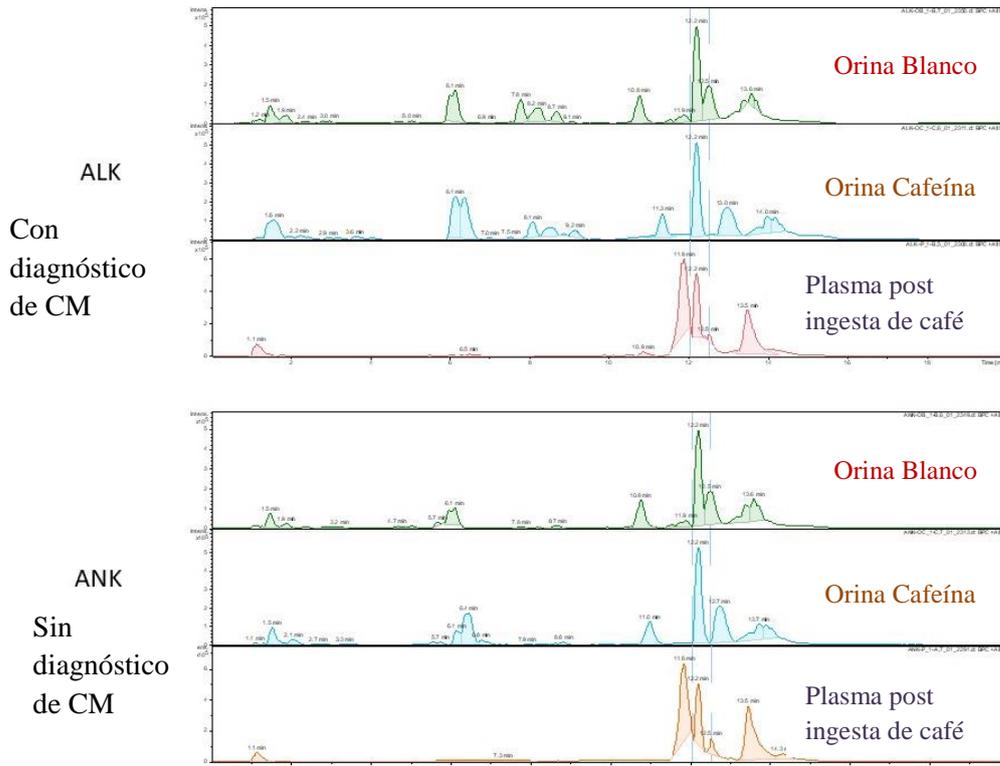
ANEXO IX. II: Corrida de las muestras ET y TT dilución 1:20



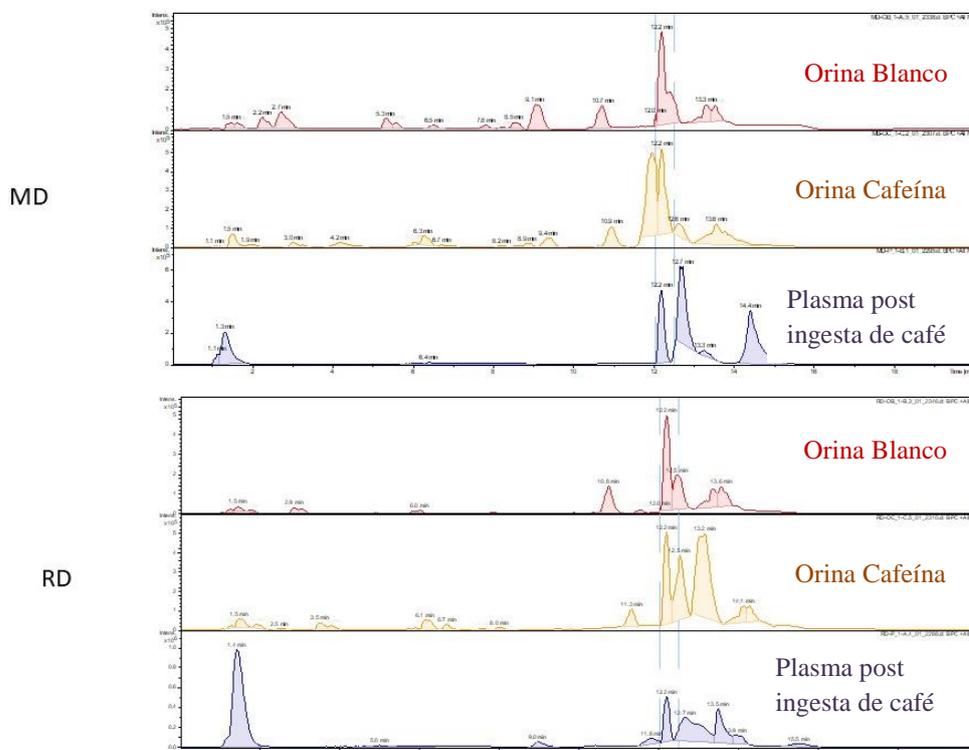
ANEXO IX. III: Corrida de las muestras HC y LC dilución 1:20



ANEXO IX. IV: Corrida de las muestras ALK y ANK dilución 1:20



ANEXO IX. V: Corrida de las muestras MD y RD dilución 1:20



ANEXO X. I: Tabla de la actividad enzimática de CYP1A2 en orina y plasma del total de las participantes

Participantes	CYP1A2	
	Orina	Plasma
ALK	3,4	1,9
AB	2,4	1,2
HC	4,6	1,1
MMC	6,9	1,7
MD	3,1	1,3
TT	5,1	2,1
ANK	4,1	5,0
NM	5,9	1,4
LC	3,8	2,5
EMC	4,8	2,7
RD	6,5	2,1
ET	4,1	3,0

ANEXO X. II: Tabla de la Media de la actividad enzimática de CYP1A2 en orina y plasma en participantes con y sin diagnóstico de CM

Diagnostico	Variable	Media	E.E.
S/diagnóstico de CM	CYP1A2 en orina	4,9	0,5
	CYP1A2 en plasma	2,8	0,5
C/diagnóstico de CM	CYP1A2 en orina	4,2	0,7
	CYP1A2 en plasma	1,5	0,2

ANEXO XI: Reunión informativa en el Centro Médico Privado "San Ricardo Pampuri"



ANEXO XII: Instrumento de recolección de datos



Balanza de pie y altímetro “C.A.M.” de precisión

ANEXO XIII: Firma del consentimiento informado

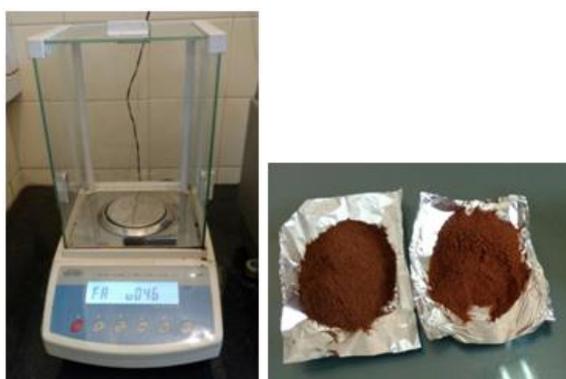


ANEXO XIV: Toma de muestras de orina y sangre a las participantes



Tubos rotulados con las iniciales de las participantes

ANEXO XV: Tratamiento de las muestras en el laboratorio



Balanza para pesar el café



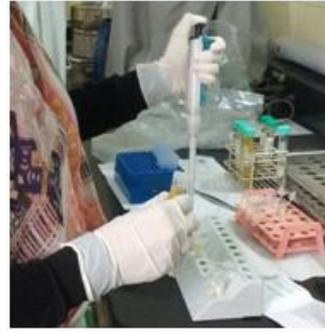
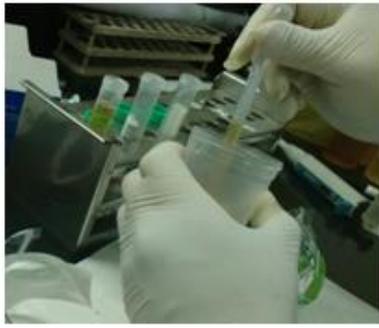
Cafeína utilizada para obtener la curva



Pipeta automática



Membrana Amicon Ultra-0.5 (Millipore ®)



Transferencia de alícuotas de orina a recipientes



Recipientes esterilizados y etiquetados para su posterior filtrado



Filtrado de muestras a través de las membranas Amicon Ultra- 0.5 (Millipore ®)



Recipientes etiquetados para su posterior análisis mediante HPLC



Dilución del producto filtrado



Membrana de 0.45 micras



Centrifugación de las muestras de orina en el dispositivo Amicom Ultra- 0.5



Centrifugación de las muestras de sangre en tubos de ensayo

ANEXO XVI: Equipo HPLC Agilent MS/MS.



GLOSARIO

A

- **Acetil-CoA:** Metabolito intermediario que se origina a partir de glúcidos, algunos aminoácidos y ácidos grasos. Es una encrucijada metabólica.
- **Alcaloide:** Se llaman alcaloides (de *álcali*, carbonatos de alcalinos, y *-oide*, parecido a, en forma de) a aquellos compuestos químicos que poseen un nitrógeno heterocíclico procedente del metabolismo de aminoácidos; de proceder de otra vía, se define como pseudoalcaloide.
- **Alelo:** Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.
- **Aminas:** Derivados de aminoácidos formados por descarboxilación. Generalmente actúan en el organismo como mediadores intercelulares.
- **Aminas Aromáticas Heterocíclicas:** Compuestos con una elevada actividad mutagénica que se generan durante el procesado térmico de alimentos proteicos.
- **Arilaminas:** Nombre que se da a las aminas aromáticas nucleares.

B

- **Biotransformación:** Conjunto de procesos metabólicos que se producen en el organismo sobre las moléculas extrañas a él.

C

- **Cancerígeno:** Agente físico, químico o biológico que puede actuar sobre los tejidos vivos produciendo cáncer.
- **Citocromo:** Proteína que transporta electrones a través de los iones hierro de grupos hemo.
- **Cromatografía:** Técnica analítica que permite la separación analítica y la cuantificación de moléculas.

D

- **Desmetilación:** Reacción química por la cual una sustancia pierde un radical metilo (CH_3).
- **Difusión Pasiva:** Consiste en la difusión de sustancias a través de una membrana sin gasto de energía metabólica y sin ayuda de proteínas transportadoras.

E

- **Electrospray:** Técnica utilizada en espectrometría de masas para producir iones.
- **Enzima:** Sustancia macromolecular, natural o sintética, compuesta principalmente de proteína, que cataliza una o más reacciones bioquímicas de forma específica.
- **Espectrómetro de masas:** Dispositivo que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación entre masa y carga (m/z).

F

- **Fenotipo:** Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

G

- **Gen:** Unidad de herencia en un cromosoma; secuencia de nucleótidos en la molécula de ADN que desempeña una función específica, como la de codificar una molécula de ARN o un polipéptido.
- **Genoma:** Complemento cromosómico básico, que contiene toda la información genética del individuo.
- **Glucuronidación:** Conversión de compuestos químicos en glucurónidos, es un método que los metabolismos animales usan para ayudar en la excreción de sustancias tóxicas, fármacos u otras sustancias que no se pueden utilizar como una energía de origen.
- **Glutatiión:** Tripéptido compuesto por cisteína, ácido glutámico y glicina. Pasa fácilmente, y de forma reversible, de su forma oxidada a su forma reducida, y desempeña así un papel importante en el organismo como transportador de hidrógeno.

- **Guaranina:** Compuesto alcaloide, del grupo de las xantinas que se encuentra en las semillas, hojas y frutos de más de 60 plantas.

H

- **Heparina:** Glicosaminoglicano muy sulfatado, se utiliza ampliamente como anticoagulante inyectable, y tiene la densidad de carga más alta conocida de todas las biomoléculas.
- **Hidrocarburos:** Cada uno de los compuestos químicos resultantes de la combinación del carbono con el hidrógeno. Se pueden encontrar en el petróleo, gas, etc.
- **Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos:** Compuestos orgánicos que se componen de anillos aromáticos simples que se han unido, y no contiene heteroátomos ni lleva sustituyentes. Se encuentran en el petróleo, el carbón y en depósitos de alquitrán y también como productos de la utilización de combustibles.
- **Hidrólisis:** Desdoblamiento de una molécula en dos por la acción de iones de H y OH a partir del agua.

L

- **Leucotrienos:** Moléculas derivadas del ácido araquidónico por la acción oxidativa de la 5-lipooxigenasa.

M

- **Mateína:** Compuesto alcaloide, del grupo de las xantinas, que actúa como estimulante. Se encuentra principalmente en la yerba mate, en semillas, hojas, y frutos de más de 60 plantas.
- **Metabolito:** Intermedio químico en las reacciones del metabolismo catalizadas por enzimas. Puede tener, o no, actividad biológica.
- **Mutación:** Cualquier cambio en la secuencia de un nucleótido o en la organización del ADN (genotipo) de un ser vivo, que produce una variación en las características de este y que no necesariamente se transmite a la descendencia.
- **Mutágeno:** Agente físico, químico o biológico que altera o cambia la información genética (usualmente ADN) de un organismo y ello incrementa la frecuencia de mutaciones por encima del nivel natural.

N

- **Neoplasia:** Crecimiento descontrolado de células o tejidos anormales en el organismo, es decir, la formación de un tumor. El tumor puede ser benigno o maligno.

O

- **Olanzapina:** Fármaco antipsicótico atípico, aprobado por la FDA para el tratamiento de la esquizofrenia. Es metabolizado en hígado por el Citocromo P-450.

P

- **Polifenoles:** Conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Una de las principales características de estas moléculas es su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular.
- **Progestágeno:** Grupo de hormonas en el que se incluye la progesterona.
- **Prostaglandina:** Conjunto de sustancias de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides), que contienen un anillo ciclopentano y constituyen una familia de mediadores celulares, con efectos diversos, a menudo contrapuestos.
- **Psicoactivo:** Sustancia química de origen natural o sintético que al introducirse por cualquier vía (oral- nasal- intramuscular- intravenosa) ejerce en el organismo un efecto sobre el sistema nervioso central (SNC).

R

- **Rifampicina:** Antibiótico bactericida del grupo de las rifampicinas omeprazol.

S

- **Sulfato:** Anión de ácido sulfúrico.
- **Sulfonación:** Introducción de un grupo ácido sulfónico ($-SO_3H$) en un compuesto orgánico.

T

- **Teína:** Sustancia estimulante, químicamente idéntica a la cafeína, que se encuentra en el té.
- **Transporte activo:** Movimiento de moléculas a través de una membrana celular desde una región de baja concentración a una región de alta concentración, o en dirección opuesta a algún gradiente o a algún otro factor obstructivo.
- **Tumor:** Cualquier alteración de los tejidos que produzca un aumento de volumen.

X

- **Xantinas:** Sustancias que pertenecen a un grupo de químico de bases purínicas que incluyen sustancias endógenas tan importantes como la guanina, adenina, hipoxantina y ácido úrico.
- **Xenobiótico:** Compuestos químicos que no se encuentra de manera normal en el organismo y que pueden ser capaces de provocar una intoxicación. Bajo esta denominación se incluyen productos químicos, fármacos, y productos naturales.