

REVISIÓN

Implicaciones clínico-biológicas de la aromatasa (*CYP19A1*) en el cáncer de mama hormonodependiente

J. A. López-Guerrero, Z. García-Casado

Unidad de Biología Molecular. Fundación Instituto Valenciano de Oncología

INTRODUCCIÓN

Con más de 1 millón de nuevos casos al año en el mundo, el cáncer de mama es la neoplasia más común en mujeres, y constituye el 18% de los cánceres del género femenino (1). En España se diagnostican cada año 15.000 nuevos casos y actualmente ya se manejan cifras que indican que una de cada 16-18 españolas tendrá un cáncer de mama, constituyendo, en la franja de edad de 45-55 años, la primera causa de muerte por cáncer en mujeres de nuestro país. A pesar de ello, la mortalidad por cáncer de mama ha ido disminuyendo en los últimos años, asociada fundamentalmente a dos causas. Por un lado, al incremento de los diagnósticos en fases tempranas o localizadas de la enfermedad; y por otro, a la estandarización de los tratamientos sistémicos adyuvantes en fases tempranas.

Aproximadamente dos tercios de los cánceres de mama en mujeres posmenopáusicas son hormonodependientes, es decir, que contienen receptores de estrógeno y requieren del estrógeno para su crecimiento tumoral. Los estrógenos producen su efecto fisiológico mediante su unión específica a los receptores nucleares RE α y RE β (2), siendo el RE α , el que se expresa con mayor frecuencia y el que desencadena la respuesta estrogénica en el tracto reproductivo femenino y en la glándula mamaria. Tras la unión del estrógeno a su receptor, los complejos estrógeno-RE forman homodímeros que interaccionan con elementos de secuencia-específica de respuesta a estrógenos en las regiones promotoras de determinados genes. La unión de estos complejos al ADN junto con la interacción con otras proteínas, inician la transcripción de genes relevantes en la respuesta hormonal que regulan la función, el crecimiento y la diferenciación celular (2).

Recibido: 27-01-07.

Aceptado: 09-04-07.

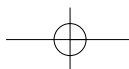
Correspondencia: José Antonio López-Guerrero. Unidad de Biología Molecular. Fundación Instituto Valenciano de Oncología. C/ Prof. Beltrán Báguena, 8-11. 46009 Valencia. e-mail: jalopez@fivo.org

GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE ESTEROIDES Y RIESGO AL CÁNCER DE MAMA

Algunos estudios han demostrado que la exposición a niveles altos de estrógeno se le asocia un mayor riesgo de cáncer de mama (3), sin embargo los mecanismos por los cuales se produce este fenómeno no están completamente dilucidados (4). Hay muchos factores que alteran la exposición a las hormonas endógenas, y muchos de ellos, como la edad en el momento de la menarquia, edad en el primer alumbramiento, número de nacimientos, y edad en la menopausia, alteran el riesgo a padecer cáncer de mama (5). Pero a nivel molecular existen muchos elementos implicados en el metabolismo de los estrógenos que tienen también su implicación en el cáncer de mama.

La síntesis de estrógeno está limitada por los niveles circulantes de androstendiona y testosterona, las cuales son sintetizadas a partir de la 17-hidroxipregnonelona y la 17-hidroxiprogesterona. Estas reacciones son catalizadas por la enzima 17 α -hidroxilasa codificada por el gen *CYP17*. Las interconversiones de la androstendiona y estrona biológicamente menos activas a sus homólogos más activos, testosterona y estradiol respectivamente, están catalizadas por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (codificada por el gen *EDH17B2*). Por último, el paso final de la síntesis de estrógeno está catalizado por la enzima aromatasa (codificada por el gen *CYP19A1*), y que convierte los andrógenos androstendiona y testosterona en estrógenos y estrona respectivamente (3) (Fig. 1).

Las hormonas sexuales en circulación están reguladas tras su síntesis por la SHBG (*sex hormone-binding globulin*). Tanto el estradiol como la testosterona se unen a SHBG, la cual restringe el paso de estas hormonas a través de la membrana celular. El estradiol es rescatado de la circulación por una serie de enzimas metabólicas, entre las que destacan la enzima de fase I *CYP1B1* y que es particularmente importante en el contexto del cáncer de mama, porque convierte el estradiol en 4-hidroxiestra-



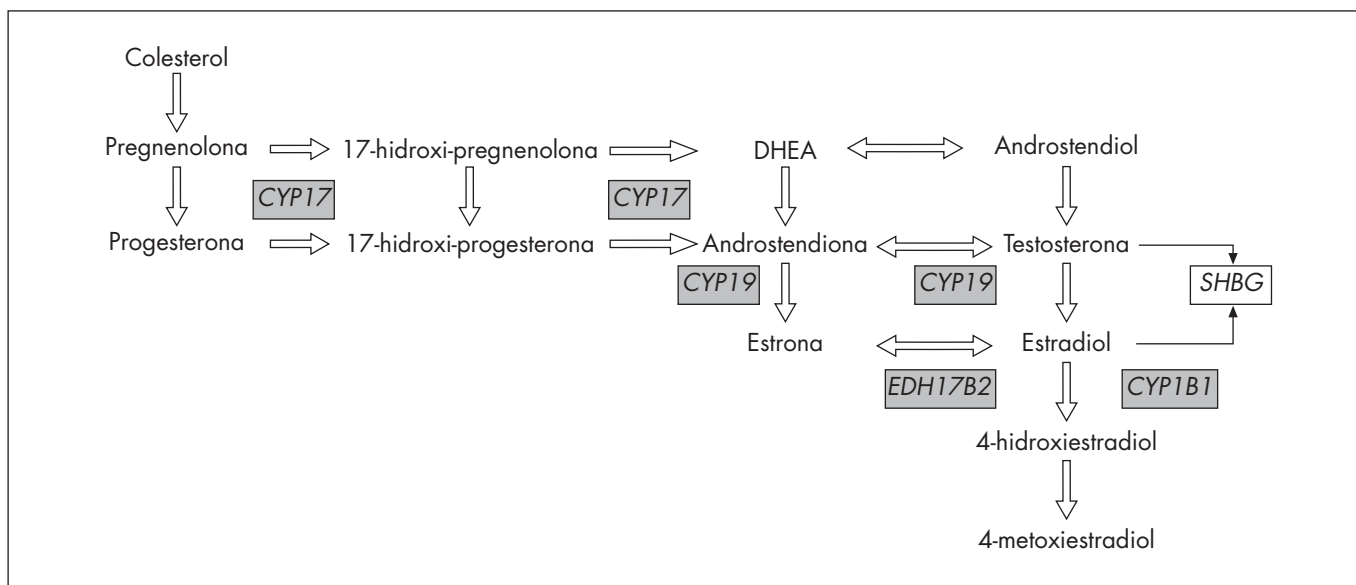
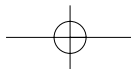


Fig. 1. Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de estrógenos. En recuadros grises están indicadas las principales enzimas implicadas. Adaptado de Dunning y cols. (3).

diol, un metabolito con efectos carcinogénicos en algunos modelos experimentales (3). Una de las principales vías que protegen contra este metabolito potencialmente peligroso implica a la catecol-O-metiltransferasa (COMT), que convierte el 4-hidroxiestradiol en 4-metoxiestradiol, menos dañino (6) (Fig. 1).

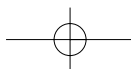
A nivel genético, la presencia de variaciones en la secuencia de ADN (polimorfismos) de los genes implicados en la síntesis de los estrógenos en cada individuo pueden hacer variar la función de estas proteínas y por tanto los niveles disponibles de estrógenos (Tabla I). En este sentido, son numerosos los estudios que han intentado demostrar la

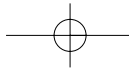
posible implicación de determinados polimorfismos en los genes que regulan el metabolismo de esteroides con el riesgo a padecer cáncer de mama (7), pero de entrada, la mayoría de estos estudios, que suelen ser de casos control, parten con excesivas limitaciones. Dunning y cols., en un meta-análisis de más de 46 estudios encontró que entre los genes implicados en el metabolismo de los estrógenos, sólo el polimorfismo (TTTA)₁₀ en el gen *CYP19A1* se asociaba a un mayor riesgo a padecer cáncer de mama (odds ratio = 2,33; p = 0,002) (Tabla II) (7). Posteriormente, este mismo autor demostró en una serie de casi 2.000 mujeres postmenopáusicas normales que otros dos polimorfismos

Tabla I. Polimorfismos genéticos y riesgo en cáncer de mama

Gen	Polimorfismo	Casos	Grupo de riesgo	OR (IC 95%); p
COMT	Val158Met	Todos	Val/Met	0,88 (0,75-1,05); 0,34
			Met/Met	0,86 (0,67-1,09)
	Val158Met	Premenopáusicas	Val/Met	0,96 (0,76-1,23); 0,88
			Met/Met	0,91 (0,63-1,31)
	Val158Met	Postmenopáusicas	Val/Met	0,83 (0,66-1,04); 0,26
			Val/Val	0,82 (0,59-1,13)
CYP17	Promotor T → C	Todos	Portador C	1,10 (0,93-1,3); 0,26
CYP19	(TTTA) _n	Todos	Portadores de (TTTA) ₁₂	1,26 (0,91-1,74); 0,16
		Todos	Portadores de (TTTA) ₁₀	2,33 (1,36-4,17); 0,002
ER	CCC325CCG	Todos	CG	1,34 (1,02-1,76); 0,09
			GG	1,25 (0,68-2,23)
			Portadores de G	1,25 (0,94-1,68)
PR	PROGINS	Todos	T1/T2	0,97 (0,73-1,28); 0,08
			T2/T2	0,41 (0,15-0,95)

OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.




Tabla II. Inhibidores de la aromatasa

Tipo de inhibidor	Acción	Ejemplos
<i>Inhibidores esteroideos</i>		
Inhibidores competitivos de la aromatasa	Moléculas que compiten con el sustrato de la aromatasa para la unión no covalente al sitio activo de la enzima	4-OH, formestano; 1-metil-ADD; 7 α -APTA; Ác. 7 α -ariralifático
Inhibidores basados en el mecanismo de acción enzimática	Mimetizan al sustrato y son convertidos por la aromatasa en un compuesto intermediario reactivo que inactiva de forma irreversible a la enzima	4-OH, formestano; MDL18.962; Exemestano (Aromasin [®]); 7 α -APTADD; 7 α -PEADD
<i>Inhibidores no esteroideos</i>		
Primera y segunda generación	Poseen un heteroátomo que interfiere con las hidroxilaciones por su unión con el hierro del grupo hemo del citocromo P450	Aminoglutelimida; Fadrazol
Tercera generación	Contienen un anillo de triazol en su estructura química. Muy efectivos. Reducen la producción de estrógenos en el organismo hasta en un 96%.	Anastrozol (Arimidex [®]); Letrozol (Femara [®])
<i>Inhibidores derivados de flavonoides</i>	Contienen sistemas de anillos de benzopironona. Muchos de estos compuestos están presentes en dietas de regiones donde la incidencia de cáncer de mama es baja. Posible utilidad terapéutica.	Crisin; Apigenina; Flavonona; 7,8-benzoflavona; biochanin A

en el gen *CYP19A1*, una IVS4 [tct]/- junto con el una sustitución C a T en la región 3'UTR, y dos polimorfismos en el gen *SHBG* [5'UTRg-a y D356N] influían de forma considerable en los niveles circulantes de hormonas sexuales, pero cuyos efectos no eran de una magnitud lo suficientemente importante como para tener algún tipo de implicación en el riesgo de cáncer de mama (3).

En el caso de los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), algunos trabajos en los que se han estudiado un mayor número de polimorfismos han encontrado asociaciones de determinados perfiles genéticos del RE con un menor [OR: 0,4 (95% IC: 0,2-08)] o mayor riesgo [OR: 2,1 (95% IC: 1,2-3,8)] a padecer cáncer de mama, en concreto aquellos constituidos por polimorfismos confinados en la región promotora y en el primer exón del gen (8). Los estudios realizados en relación al RP parecen mostrar una tendencia a que el alelo PROGINs conlleva un menor riesgo de cáncer de mama, pero en ningún caso llegando a la significación estadística (Tabla II) (7,9).

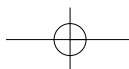
Pero de las enzimas implicadas en el metabolismo de estrógenos quizá la que tenga un mayor protagonismo en estos momentos sea la aromatasa por varias razones. En primer lugar, por ser la responsable directa de la síntesis de estrógenos; en segundo lugar, porque el gen *CYP19A1* presenta polimorfismos que modifican los niveles de hormonas sexuales en circulación (3), algunos de los cuales confieren un mayor riesgo a padecer cáncer de mama (7); y por último, por que constituye la diana terapéutica de la nueva generación de agentes antiestrogénicos de gran eficacia, los inhibidores de la aromatasa.

LA AROMATASA (*CYP19A1*)

La aromatasa se localiza en el retículo endoplásmico de las células productoras de estrógeno entre las que se incluyen las células de la granulosa ovárica, el sincitiotrofoblas-

to placentar, las células de Leyding testiculares, el cerebro, los fibroblastos de la piel y el tejido adiposo (10). Mientras los niveles más altos de aromatasa se localizan en las células de la granulosa ovárica durante la premenopausia, el tejido adiposo constituye la principal fuente de producción de aromatasa tras la menopausia (11,12), en esta situación, si bien los niveles de la aromatasa en el tejido adiposo pueden ser bajos, la suma del estrógeno originado por el conjunto de fibroblastos del tejido adiposo del cuerpo humano tiene su impacto fisiológico.

El gen que codifica la aromatasa se localiza en el brazo largo del cromosoma 15 (15q21.1) (Fig. 2) (12,13) y está constituido por una región codificante en una posición más centrométrica que contiene 9 exones (II-X), y una región más telomérica con varias zonas promotoras (14). El promotor más proximal al codón de iniciación de la transcripción (exón II) y específico de las gónadas es el II. Otros dos promotores, I.3 (expresado en el tejido adiposo y cáncer de mama) y I.6 (expresado en hueso) ocupan una región de 1 Kb también proximal al codón de iniciación. El promotor I.2, se localiza a 13 Kb del codón de iniciación, mientras que los promotores específicos de cerebro (I.f), células endoteliales (I.7), tejido fetal (I.5), tejido adiposo (I.4) y placenta (2a y I.1) se localizan en tándem a 33, 36, 43, 73, 78 y 93 Kb del exón II respectivamente (12,13). La transcripción iniciada por cada uno de los promotores, en sus tejidos específicos, origina un transcrito con una secuencia única en la región 5'-no codificante que contiene la secuencia correspondiente al primer exón inmediatamente posterior a cada promotor en particular. Por tanto, la región 5'-no codificante del mRNA de la aromatasa es específica de cada promotor y puede ser vista como una firma de cada promotor implicado. Conviene enfatizar que la proteína que se expresa en los diferentes tejidos es la misma independientemente del patrón de promotores (12,13) (Fig. 2).



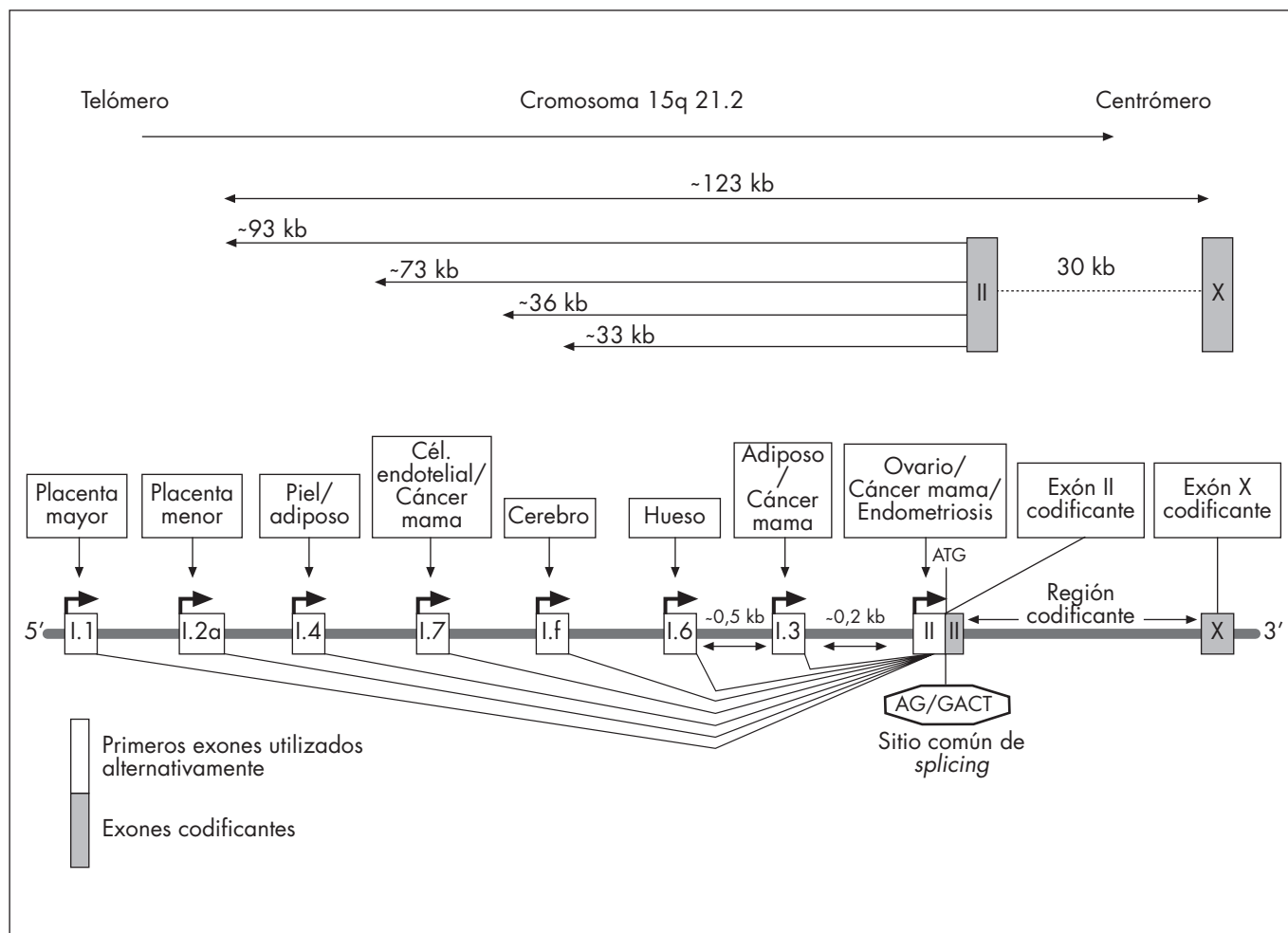
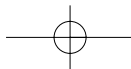


Fig. 2. Esquema del gen de la aromatasa (CYP19) en el que se representan las distintas regiones promotoras y en los tejidos que son activados, así como la distancia a la que se encuentran del codón de iniciación. Las región codificante está representada en gris. Adaptado de Bulun y cols. (12).

REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA AROMATASA EN CÁNCER DE MAMA

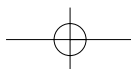
Ya en los años 60 se reconocía que la aromatasa de localización extraovárica jugaba algún tipo de papel en la fisiología y en la patología humana (15) puesto que se habían constatado evidencias de que el tejido adiposo y piel constituían la principal fuente de estrógenos en la mujer postmenopáusica (16,17).

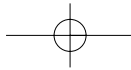
La formación de estrógeno extraovárico está estrechamente correlacionada con el exceso de peso tanto en mujeres pre- como en post-menopáusicas, y puede incrementar hasta 10 veces la morbilidad de las mujeres obesas en la postmenopausia (16,17). De hecho, en la actualidad se reconoce que la producción de forma continuada de estrógenos por parte del tejido adiposo y piel en estas mujeres es uno de los factores de riesgo a padecer hiperplasias de endometrio y cáncer.

También existe la convicción de que el estrógeno producido por el tejido adiposo y la piel pueda tener alguna implicación en el cáncer de mama. Así, la incidencia del cáncer de mama está directamente correlacionada con el

volumen de tejido graso o los niveles de estradiol en suero en mujeres postmenopáusicas, sugiriendo que el conjunto de estrógeno producido en los tejidos extraováricos alcanzan el tejido tumoral a través del sistema circulatorio de forma endocrina estimulando el crecimiento tumoral (18).

El tejido adiposo de la glándula mamaria está constituido principalmente por adipocitos maduros, así como por otros elementos estromales, entre los que destacan fibroblastos maduros (90%) y células endoteliales (7%), en los que se concentra el 80-90% de la actividad aromatasa (19). En el caso del cáncer de mama, la actividad enzimática de la aromatasa se localiza tanto en las células epiteliales malignas como en los fibroblastos que rodean el tumor, así como en las células endoteliales. Sin embargo, la mayor actividad enzimática se concentra en el tejido adiposo adyacente y su expresión está regulada por el promotor I.4 del gen. En estos tejidos, el promotor I.4 está regulado por la acción combinada de un glucocorticoide y un miembro de la familia de citocinas de clase I [Interleucina 6 (IL-6), IL-11, factor inhibidor de leucemia (LIF), u oncostatina-M] (20).





En el caso del cáncer de mama, las células tumorales inducen la expresión de la aromatasa mediante la activación de promotores aberrantes tanto en el tejido tumoral como en los fibroblastos adiposos próximos al tumor. El tejido adiposo de las glándulas mamarias de las mujeres sin enfermedad tumoral mantiene unos niveles bajos de expresión de la aromatasa vía el promotor I.4, mientras que los promotores proximales I.3 y II no se suelen activar en este contexto (21). Sin embargo, la transcripción como consecuencia de la activación de estos promotores, además del promotor endotelial I.7, es significativamente alta en los fibroblastos del estroma tumoral y en las células malignas tumorales (22). En definitiva, la suma de las diferentes especies de mRNA de aromatasa originados por estos promotores incrementa los niveles de aromatasa en cáncer de mama de forma considerable en comparación con el tejido mamario normal (Fig. 3A).

Las interacciones paracrinias entre las células epiteliales malignas, los fibroblastos adiposos y las células endoteliales son las responsables no sólo de la biosíntesis de estrógenos, sino también de la ausencia de diferenciación adipogénica del tejido mamario neoplásico, en el que la reacción desmoplástica (la formación de una capa densa de fibroblastos que rodean a las células epiteliales malignas) constituye un soporte estructural y bioquímico esen-

cial para el crecimiento tumoral. De hecho, los patólogos etiquetan hasta el 70% de los carcinomas de mama como escirrosos haciendo referencia a la consistencia indurada de estos tumores, que deriva fundamentalmente de la concentración celular de los fibroblastos adiposos alrededor de las células epiteliales malignas. Las células epiteliales malignas consiguen este efecto mediante la secreción de enormes cantidades de TNF e IL-11 que inhiben la diferenciación de los fibroblastos a adipocitos maduros (23). Este bloqueo de la diferenciación se consigue fundamentalmente mediante la inhibición selectiva de la expresión de factores de transcripción adipogénicos como son C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein) y PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) (23). Pero al mismo tiempo que el tumor asegura una concentración de células del estroma a su alrededor consigue incrementar la concentración local de estrógenos por la inducción de la expresión de la aromatasa principalmente en los fibroblastos indiferenciados del tejido adiposo (23,24) (Fig. 3B).

Por las razones que acabamos de exponer, la reducción de la biosíntesis de estrógenos en tejido adiposo en mujeres posmenopáusicas empleando inhibidores específicos de la aromatasa se ha planteado como una alternativa muy eficaz en el tratamiento del cáncer de mama hormono-dependiente (25).

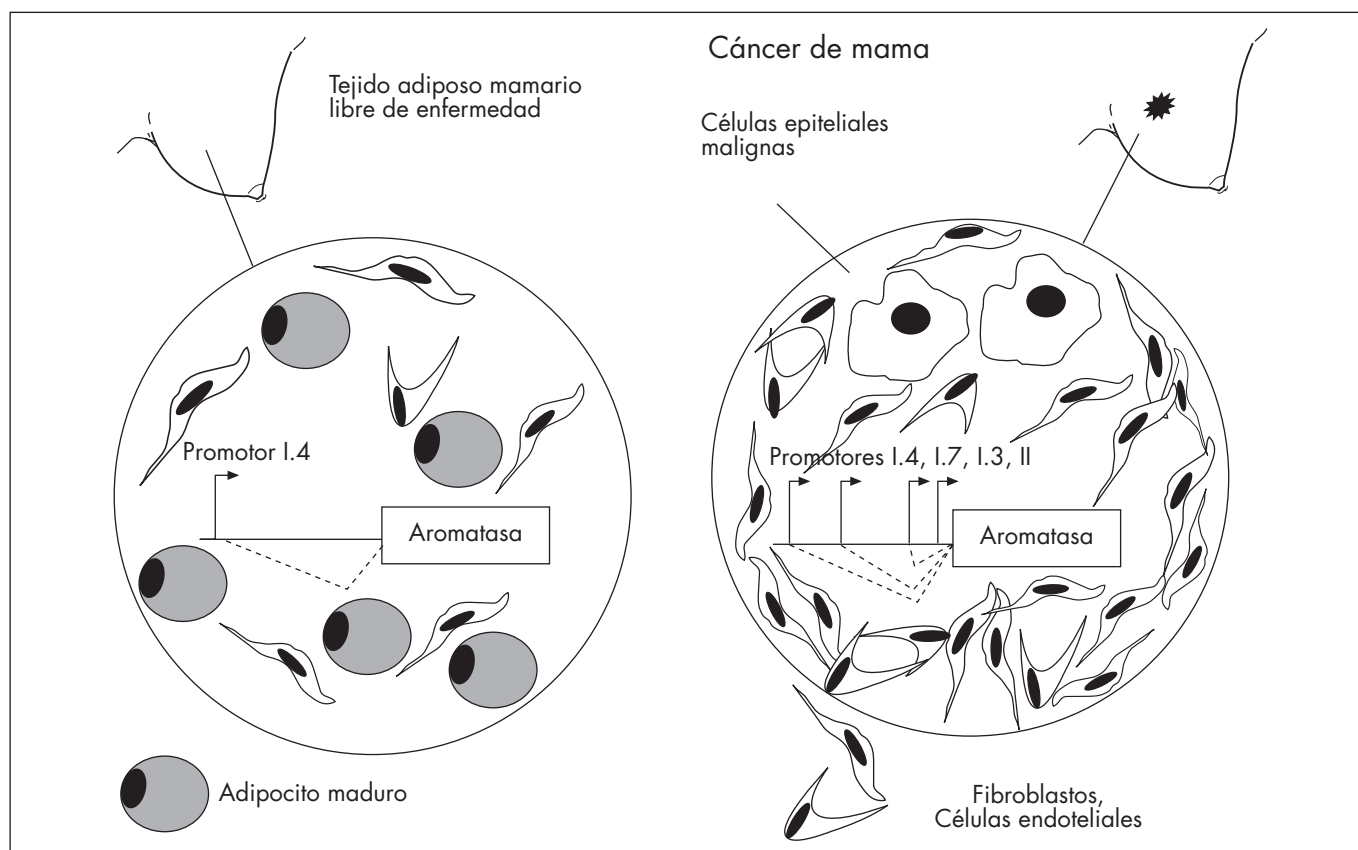
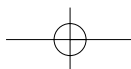


Fig. 3A. Regulación fisiológica del gen de la aromatasa. A) Promotores implicados en la regulación de la expresión de la aromatasa en la glándula mamaria normal (izquierda) y tejido neoplásico (derecha). Adaptado de Bulun y cols. (12).



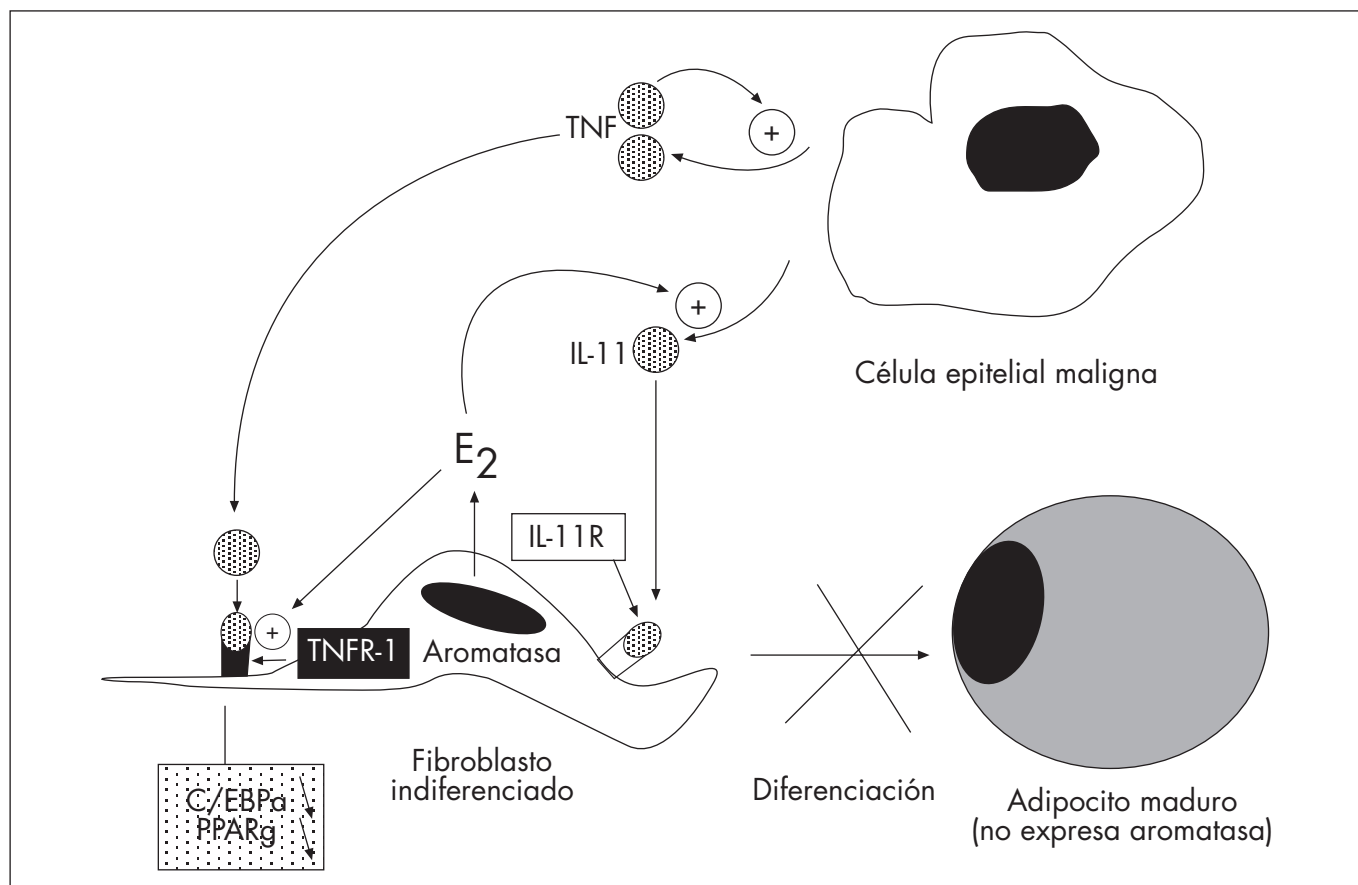
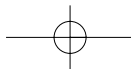


Fig. 3B. Regulación fisiológica del gen de la aromatasa. B) Interacción entre la célula epitelial maligna y las células del estroma que provoca un incremento en la producción local de estrógenos por la activación de la expresión de la aromatasa en fibroblastos indiferenciados (ver más detalles en el texto). Adaptado de Bulun y cols. (12).

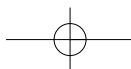
INHIBIDORES DE LA AROMATASA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

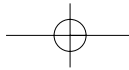
Para reducir los efectos de los estrógenos en el crecimiento tumoral existen principalmente dos aproximaciones. La primera, interferir la capacidad de unión del estrógeno a los receptores; la segunda, disminuir la cantidad de estrógeno circulante. En la primera situación lo que se pretende es competir con el estrógeno por el receptor y disminuir así el número de receptores libres disponibles para unirse al estrógeno. Esta modalidad ha sido muy eficaz en la estrategia anticancerosa y ha permitido el desarrollo de drogas muy activas como el tamoxifeno, que además exhiben una escasa toxicidad (2). La segunda opción se basa fundamentalmente en la inhibición de la actividad de la aromatasa mediante inhibidores de la aromatasa (Tabla II), que en la actualidad constituyen el tratamiento endocrino más efectivo del cáncer de mama hormono-sensible (26). De hecho, seis ensayos clínicos randomizados publicados desde el año 2000 han demostrado la mayor eficacia de los inhibidores de la aromatasa en relación con el tamoxifeno (27-34). De estos estudios se han podido sacar dos conclusiones. En primer lugar, es

más eficaz desde el punto de vista farmacológico bloquear la síntesis de estrógeno que la del receptor; y en segundo lugar, el efecto local de los inhibidores de la aromatasa a nivel del tejido diana para bloquear la formación de estrógeno local representa probablemente el mecanismo más crítico para un mayor potencial terapéutico de los inhibidores de la aromatasa.

El tratamiento de pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama con inhibidores de la aromatasa puede producir importantes cambios tanto moleculares como celulares. En este sentido, los protocolos de neoadyuvancia son particularmente ilustrativos.

En general, un importante número de casos (entre un 60-70%) receptor de estrógenos positivos manifiestan, entre el 3^{er} y 4^o mes de iniciado el tratamiento neoadyuvante una significativa respuesta patológica que se traduce en una reducción de la celularidad y/o un incremento de la fibrosis, pudiéndose observar también cambios en el grado histológico. Sin embargo, no todas las pacientes muestran una respuesta objetiva en los protocolos de neoadyuvancia, sino que existe una porción de mujeres que son refractarias al tratamiento (35) y son muchos los esfuerzos que se están realizando para encontrar marcadores





de resistencia al tratamiento con inhibidores de la aromatasa con el fin de ajustar el tratamiento de forma más eficaz a la población más sensible y proponer nuevas alternativas a las pacientes refractarias sobre una base racional.

Las plataformas de microarrays de expresión génica tienen una utilidad potencial muy elevada a la hora de identificar estos nuevos factores que pudieran predecir respuesta al tratamiento con inhibidores de la aromatasa (36). Esto resulta especialmente evidente en el caso de la neoadyuvancia donde podemos tomar muestras del tumor antes y durante el tratamiento y donde los cambios morfológicos y clínicos que se observan en los primeros meses del tratamiento nos indican el tipo de respuesta en un intervalo de tiempo no excesivamente largo, sin necesidad de esperar acontecimientos de progresión de la enfermedad que en muchos casos tardarían en aparecer meses incluso años.

Hasta la fecha, los estudios derivados de las plataformas de expresión son bastante preliminares. En un estudio americano de neoadyuvancia con letrozol en Fase II (NCI/SPORE/AVON TRIAL) en el que se analiza una biopsia al inicio y al mes del tratamiento se pueden observar los cambios de expresión génica derivados fundamentalmente de la eficacia del tratamiento de privación de estrógenos y sin relación con el tipo de respuesta. Por ejemplo, se observan disminuciones en la expresión de genes que regulan el ciclo celular, la supervivencia celular, la replicación del ADN, o la invasión y metástasis (37). Sin embargo, estudios más recientes, aunque todavía con un número limitado de casos, han demostrado perfiles de expresión que se asocian a los niveles intratumorales de receptores hormonales y han identificado un número importante de genes (casi 300) cuya expresión cambia entre los grupos de pacientes que progresan y en los que se observa una respuesta parcial al tratamiento (38). Pero si bien estos resultados son prometedores, todavía es pronto para definir un marcador o grupo de marcadores que pueda ser manejable desde el punto de vista clínico.

Recientemente, un estudio llevado a cabo sobre pacientes con enfermedad avanzada y tratadas en adyuvancia con letrozol intentó demostrar la posible implicación de dos polimorfismos de *CYP19A1* (uno en la región 3'UTR y otro en el intrón 4) como predictores de respuesta al tratamiento con inhibidores de la aromatasa. Estos autores encontraron que las pacientes con polimorfismos en la región 3'UTR presentaban tiempos libres de progresión significativamente más cortos que las pacientes con un genotipo más común (39). Sin embargo, hasta la fecha estos resultados no se han podido corroborar.

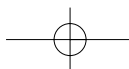
Posteriormente ha aparecido un estudio de genética de poblaciones realizado sobre *CYP19A1* que identifica hasta 85 polimorfismos, de los cuales: 4 están localizados en regiones codificantes y provocan un cambio de aminoácido (Trp³⁹Arg, Thr²⁰¹Met, Arg²⁶⁴Cys, y Met³⁶⁴Thr), y otros 3 consisten en inserciones o deleciones de parte de la secuencia. El resto de polimorfismos son sustituciones de una sola base localizadas en re-

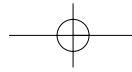
giones no codificantes. Lo que llama la atención de este estudio es que algunos de los polimorfismos de las regiones codificantes modifican la eficiencia de la actividad de la aromatasa así como la concentración del enzima, de modo que influirían de forma notable en los niveles de estrógeno sintetizado y por consiguiente podrían tener una implicación en el grado de respuesta al tratamiento con inhibidores de la aromatasa (40), lo que los convertiría en unos indicadores moleculares de respuesta muy útil y relativamente sencillos de estudiar y que consideramos es necesario explorar.

En resumen, hemos visto las implicaciones clínico-biológicas de la aromatasa en cáncer de mama como moduladora de la disponibilidad de estrógenos y como diana molecular de los inhibidores de la aromatasa. De cómo algunas variaciones genéticas de la aromatasa pueden influir en los niveles séricos de estradiol y en el riesgo a padecer cáncer de mama, y cómo el estudio de polimorfismos de *CYP19A1* puede constituir un modelo farmacogenético prometedor en la predicción de respuesta al tratamiento con inhibidores de la aromatasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321 (7261): 624-8.
2. Bruggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev* 2005; 26 (3): 331-45.
3. Dunning AM, Dowsett M, Healey CS, et al. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96 (12): 936-45.
4. Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 1988; 48 (2): 246-53.
5. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15 (1): 36-47.
6. Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, et al. Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000 (27): 95-112.
7. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF. A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8 (10): 843-54.
8. Gold B, Kalush F, Bergeron J, et al. Estrogen receptor genotypes and haplotypes associated with breast cancer risk. *Cancer Res* 2004; 64: 8891-900.
9. Pearce CL, Hirschhorn JN, Wu AH, et al. Clarifying the PROGENS allele association in ovarian and breast cancer risk: A haplotype-based Analysis. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 51-9.
10. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994; 15 (3): 342-55.
11. Bulun SE, Simpson ER. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis indicates that levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of women increase with advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78 (2): 428-32.
12. Bulun SE, Lin Y, Imir G, et al. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: From bench to treatment. *Pharmacol Rev* 2005; 57 (3): 359-83.
13. Sebastian S, Bulun SE. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (10): 4600-2.





14. Shozu M, Sebastian S, Takayama K, et al. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *N Engl J Med* 2003; 348 (19): 1855-65.
15. MacDonald P, Grodin J, Siiteri P, editors. The utilization of plasma androstenedione for estrone production in women. Mexico; 1968.
16. Hemsell DL, Grodin JM, Brenner PF, Siiteri PK, MacDonald PC. Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38 (3): 476-9.
17. Grodin JM, Siiteri PK, MacDonald PC. Source of estrogen production in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 36 (2): 207-14.
18. Hankinson SE, Willett WC, Michaud DS, et al. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91 (7): 629-34.
19. Price T, Aitken J, Head J, Mahendroo M, Means G, Simpson E. Determination of aromatase cytochrome P450 messenger RNA in human breast tissues by competitive polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1247-52.
20. Zhao Y, Nichols JE, Bulun SE, Mendelson CR, Simpson ER. Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue. Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose-specific promoter. *J Biol Chem* 1995; 270 (27): 16449-57.
21. Mahendroo MS, Mendelson CR, Simpson ER. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem* 1993; 268 (26): 19463-70.
22. Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81 (11): 3843-9.
23. Meng L, Zhou J, Sasano H, Suzuki T, Zeitoun KM, Bulun SE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 11 secreted by malignant breast epithelial cells inhibit adipocyte differentiation by selectively down-regulating CCAAT/enhancer binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma: Mechanism of desmoplastic reaction. *Cancer Res* 2001; 61 (5): 2250-5.
24. Zhou J, Gurates B, Yang S, Sebastian S, Bulun SE. Malignant breast epithelial cells stimulate aromatase expression via promoter II in human adipose fibroblasts: An epithelial-stromal interaction in breast tumors mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta. *Cancer Res* 2001; 61 (5): 2328-34.
25. Brodie A, Lu Q, Liu Y, Long B. Aromatase inhibitors and their anti-tumor effects in model systems. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6 (2): 205-10.
26. Santen RJ. To block estrogen's synthesis or action: That is the question. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87 (7): 3007-12.
27. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: First results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 2002; 359 (9324): 2131-9.
28. Baum M, Budzar A, Cuzick J, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* 2003; 98 (9): 1802-10.
29. Budzar AU, Vergote I, Sainsbury R. The impact of hormone receptor status on the clinical efficacy of the new-generation aromatase inhibitors: A review of data from first-line metastatic disease trials in postmenopausal women. *Breast J* 2004; 10 (3): 211-7.
30. Bonnetterre J, Thurlimann B, Robertson JF, et al. Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668 postmenopausal women: Results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J Clin Oncol* 2000; 18 (22): 3748-57.
31. Goss PE, Ingle JN, Martino S, et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 349 (19): 1793-802.
32. Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: Results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 2001; 19 (10): 2596-606.
33. Milla-Santos A, Milla L, Portella J, et al. Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy in postmenopausal patients with hormone-dependent advanced breast cancer: A prospective, randomized, phase III study. *Am J Clin Oncol* 2003; 26 (3): 317-22.
34. Paridaens R, Dirix L, Lohrisch C, et al. Mature results of a randomized phase II multicenter study of exemestane versus tamoxifen as first-line hormone therapy for postmenopausal women with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2003; 14 (9): 1391-8.
35. Dowsett M, Martin LA, Smith I, Johnston S. Mechanisms of resistance to aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 95 (1-5): 167-72.
36. Miller WR, Anderson TJ, White S, et al. Aromatase inhibitors: Cellular and molecular effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 95: 83-9.
37. Ellis MJ, Rosen E, Dressman H, Marks J. Neoadjuvant comparisons of aromatase inhibitors and tamoxifen: Pretreatment determinants of response and on-treatment effect. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86: 301-7.
38. Kristensen VN, Sorlie T, Geisler J, et al. Effects of anastrozole on the intratumoral gene expression in locally advanced breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 95: 105-11.
39. Lloveras B, Monzo M, Colomer R, et al. Letrozole efficacy is related to human aromatase CYP19 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in metastatic breast cancer patients. 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). *J Clin Oncol* 2004; 22 (14S): 507.
40. Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, et al. Human Aromatase: Gene Resequencing and Functional Genomics. *Cancer Res* 2005; 65 (23): 11071-82.

