

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Análisis de la correlación entre el patrón de metilación del promotor del gen *brca1* y la expresión de la proteína BRCA1 en neoplasias de mama en pacientes mexicanas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P r e s e n t a :

Mariana Berenice Moreno Arroyo

Director de tesis:

Dr. Normand García Hernández

México D.F

Junio 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Normand García por haber confiado en mí y permitirme ser parte de su equipo de investigación. Al Dr. Diego Arenas por aceptarme en el laboratorio de Genética Humana. Al resto de mis asesores por el tiempo que dedicaron al presente trabajo y por haber generado en mí el interés en esta área de la Biología.

Agradezco a mi familia, a cada uno de los integrantes que de una u otra forma, contribuyeron para que haya llegado hasta este lugar.

Agradezco a mis amigos por el apoyo que siempre me han brindado.

A todas la personas que me apoyaron para que esta tesis esté concluida.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por todos estos años de formación.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis muy especialmente a mi madre Carmen Arroyo por sus cuidados, amor, apoyo incondicional y los buenos consejos. A mi hermana la más hermosa Yanina, por escucharme, darme excelentes consejos, por ser mi mejor compañera en toda la vida, por todo su apoyo y amor, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible y a Punky por su incondicional compañía.

A mis abuelitos Evita y Erasmo por todo su amor y cuidados; a mis tíos Dionisio, Oscar, Erasmo, Paz, Javier, Manuel y a sus familias.

A mis primas Carolina, Laura y Marcela que son como mis hermanas.

También dedico este trabajo a mis amigos: Mónica, Alexa, Bere, Alberto; gracias por todos los momentos divertidos y por estar ahí cuando los he necesitado.

A mi Dios, que siempre me da el empujón para salir adelante.

Y a Arturo que ha sacado lo mejor de mí en los últimos meses.

ASESORES

Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez.

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Dr. Normand García Hernández

Dr. Federico Ávila Moreno

Dr. Diego J. Arenas Aranda

Índice

pág.

Abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tablas

Resumen

I. Introducción

- | | |
|--|----|
| 1. Epidemiología del cáncer a nivel mundial | 1 |
| 1.1 Epidemiología del cáncer de mama en México | 1 |
| 2. Generalidades del cáncer | 2 |
| 3. La glándula mamaria | 4 |
| 4. Factores de riesgo | 6 |
| 5. Tipos histológicos de cáncer de mama | 8 |
| 6. Etapas del cáncer de mama | 11 |
| 7. Biología del cáncer de mama | |
| 7.1 Cáncer de mama esporádico y hereditario | 13 |
| 7.2 Estructura, función y expresión del gen <i>brca1</i> | 14 |
| 8. Genética y Epigenética. | 18 |
| 8.1 Metilación del DNA | 20 |
| 8.2 Alteraciones en la metilación del ADN. | 20 |
| 8.3 Técnicas para el estudio de metilación | 21 |

II. Antecedentes 23

III. Planteamiento del problema 25

IV. Justificación 26

V. Objetivos 27

1. Objetivo general
2. Objetivos específicos

VI. Estrategia Experimental	28
VII. Metodología	
1. Diseño del estudio	29
2. Tamaño de la muestra y muestreo	29
3. Inclusión de los tejidos en parafina	30
4. Microarreglos de tejidos (MAT)	31
4.1 Obtención de laminillas	32
4.2 Inmunohistoquímica por el sistema Avidina-Biotina (ABC)	32
4.3 Contraintinción con Hematoxilina de Mayer y montaje	32
4.4 Digitalización de los TMAs y cuantificación	33
5. Extracción de DNA	33
6. Modificación del DNA por el método de bisulfito de sodio	34
7. PCR específica para metilación	35
VIII. Resultados	
1. Selección de casos	37
2. Construcción de los microarreglos de tejidos (MATs)	38
3. Obtención de laminillas	40
4. Detección de la proteína BRCA1 mediante inmunohistoquímica	41
5. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas anti-BRCA1	44
6. Extracción de DNA de tejidos mamarios	49
7. Modificación de DNA por el método de bisulfito de sodio	52
IX. Discusión	57
X. Conclusiones	60
XI. Bibliografía	61

Lista de abreviaturas

BRCA1	Por sus siglas en inglés Breast Cancer gene 1
HE	Hematoxilina Eosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramo
h	hora
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
kDa	Kilodalton
MATs	Microarreglo de tejidos
MS-PCR	Por sus siglas en inglés Methylation especific PCR
ml	Mililitro
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pm	Picomolar
PM	Peso molecular
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
s	segundos
V	Volts
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura de la glándula mamaria	5
Figura 2. Histopatología del cáncer de mama	10
Figura 3. Secuencia del promotor del gen <i>brca1</i>	15
Figura 4. Diagrama de la proteína BRCA1	18
Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia general	28
Figura 6. Selección de áreas con células neoplásicas teñidas con HE	38
Figura 7. Mapa 1 del microarreglo de tejido	39
Figura 8. Construcción del MAT	40
Figura 9. Inmunodetección de la proteína BRCA1 en tejido no afectado y neoplásico	42
Figura 10. Inmunodetección de la proteína BRCA1 y control de isotipo en tejido mamario tumoral en los TMA	43
Figura 11. Niveles de expresión de la proteína BRCA1 en tumores de cáncer de mama	44
Figura 12. Análisis morfométrico de microarreglos de tejidos provenientes de muestras de cáncer de mama	45
Figura 13. Expresión de la proteína BRCA1 representada en log2	48
Figura 14. DNA genómico provenientes de tejido de mama.	51
Figura 15. Reacción de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos que detectan el DNA metilado en el promotor del gen <i>brca1</i> .	54
Figura 16. Identificación de la presencia de metilación en la región promotora del gen <i>brca1</i>	55
Figura 17. Correlación de la expresión de la proteína BRCA1 y el estado de metilación del promotor <i>brca1</i>	56

LISTA DE TABLAS	Pág.
Tabla 1. Factores de riesgo.	7
Tabla 2. Clasificación TNM del cáncer de mama	12
Tabla 3. Condiciones de reacción para la PCR del promotor de brca1.	34
Tabla 4. Condiciones de reacción para la PCR del promotor de brca1	36
Tabla 5. Tipo histológico y número de muestras analizadas	38
Tabla 6. Promedio de los IOD de las muestras analizadas	47
Tabla 7. Concentración y pureza de las extracciones de DNA de los tejidos adyacentes de tejido mamario	49
Tabla 8. Concentración y pureza de las extracciones de DNA de los tejidos neoplásicos de tejido mamario	50
Tabla 9. Concentración y pureza de las conversiones con Bisulfito de Sodio de las muestras de DNA de tejidos adyacentes de tejido mamario	52
Tabla 10. Concentración y pureza de las conversiones con Bisulfito de Sodio de las muestras de DNA de tejidos neoplásicos de tejido mamario	52

Resumen

En México, a partir del 2006 el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en la población femenina y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres. Se ha estimado que aproximadamente de un 10% de todos los cánceres de mama son hereditarios, atribuibles a mutaciones en los genes *brca1* y *brca2*, y el restante 90% de neoplasias por causas esporádicas (no familiar). Aunque no se han reportado mutaciones para estos genes en cáncer esporádico, se ha visto una disminución en los niveles de la proteína BRCA1. Los mecanismos que ocasionan este fenómeno son poco claros y requieren de mayor investigación, sugiriendo que uno de los mecanismos que pudieran contribuir a esta disminución en los niveles de la proteína BRCA1 es la metilación en la región promotora del gen.

En el presente proyecto analizamos los niveles de expresión de la proteína BRCA1 en tejidos de cáncer de mama esporádico de mujeres mexicanas y correlacionamos el nivel de expresión con el estado de metilación en la región promotora del gen *brca1*. Para lograr esto se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para determinar los niveles de expresión de la proteína BRCA1 en microarreglos de tejidos y la técnica de bisulfito de sodio que nos permitió identificar el estado de metilación mediante MS-PCR (del inglés Methylation specific PCR).

Se utilizaron muestras provenientes del Hospital Juárez-SSA y el CMN La Raza, las cuales fueron analizadas por un patólogo para confirmar el diagnóstico de cáncer de mama y el porcentaje celular. Se seleccionaron 20 muestras, dentro de las cuales 16 son carcinomas ductal infiltrante, seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante con 2 casos, 1 corresponde a un carcinoma ductal *in situ*, al igual que el carcinoma mucinoso con un caso. Cada tumor con su respectivo tejido mamario adyacente. Después de realizar la detección de la proteína mediante IHQ, realizamos un análisis morfométrico y observamos una disminución en la expresión de BRCA1 en 25% de las muestras, 45% con expresión normal y en

30% detectamos que la proteína aumentó su expresión con respecto al tejido no afectado.

Con la determinación del estado de metilación del promotor mediante MS-PCR, encontramos que 10% de las muestras presentaron metilación de la región promotora del gen *brca1*. El DNA de los dos tumores que resultaron metilados en la región promotora del gen *brca1*, uno se correlaciona con el estado de sub-expresión esperado y encontramos otro tumor en el que su DNA presentó metilación en la región promotora del gen *brca1* y sin embargo presentó sobre-expresión de la proteína BRCA1.

Los resultados antes descritos correlacionaron con lo reportado por otros investigadores en diferentes poblaciones, y sugiere que en el caso de la sub-expresión, los dos alelos estén silenciados por la metilación en la región promotora del gen *brca1*. En lo que se refiere a la muestra en el que se encontró metilación en la región promotora y altos niveles de proteína BRCA1, parecería contradictorio, sin embargo se ha sugerido que esta sobre-expresión podría ser debida a una metilación aberrante en las islas CpG del promotor del gen *brca1* o por algún otro mecanismo. Los datos obtenidos en el presente proyecto muestran que la metilación del promotor del gen *brca1* es un evento poco común en los tumores de las pacientes mexicanas con cáncer de mama esporádico y que podría estar relacionado con el inicio y avance del proceso neoplásico.

I. Introducción.

1. Epidemiología del cáncer a nivel mundial.

Una de las principales enfermedades que provocan la muerte es el cáncer. En la mayoría de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares. Se prevé que a nivel mundial en el 2030 la mortalidad por cáncer aumentará un 45% (pasará de 7,9 millones a 13,1 millones de defunciones al año), debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población (OMS, 2012).

Los principales tipos de cáncer son los siguientes: pulmonar, gástrico, hepático, colorrectal, mamario y cervicouterino, con ese orden de mortalidad respectivamente; se localizan de forma diferenciada en mujeres y hombres, ya sea por factores biológicos o de riesgo, lo que influye en su prevalencia. En las mujeres los tres principales tipos de cáncer que causaron fallecimientos durante 2007 fueron: el de mama (13.8%), cuello uterino (12.1%) e hígado (7.6%); es importante señalar que si bien disminuyó el porcentaje de muertes por estos tipos de cáncer en comparación con 2006, éstos se continúan manteniendo en los primeros lugares (ACS, 2012). El cáncer de mama presentó 458,000 defunciones en el 2008 a nivel mundial (OMS, 2012).

1.1 Epidemiología del cáncer de mama en México

En México, con una población de más 112 millones de habitantes al 2010 (INEGI, 2012), el cáncer de mama también representa un problema y es hoy uno de los desafíos más importantes para la salud de la mujer adulta. Actualmente, es la segunda causa de muerte entre las mujeres mexicanas de 30 a 59 años de edad. El cáncer de mama es ahora causante de un mayor número de muertes en México, comparado con el cáncer cervicouterino, y afecta a mujeres adultas de todas las edades y niveles socioeconómicos (Rodríguez-Cuevas, 2006).

Las tasas de mortalidad por cáncer de mama en México muestran un aumento notorio en las últimas décadas. Entre 1955 y 1960, a partir de la disposición de los primeros datos confiables, la tasa era alrededor de dos a cuatro muertes por 100,000 mujeres; para la mitad de la década de 1990 y manteniéndose de manera sostenida en las mujeres adultas de todas las edades, en una cifra cercana a 9 por 100,000 mujeres (Lozano, 2008).

La falta de acceso a la detección temprana también sugiere que existe un gran cúmulo de casos no detectados. Las estimaciones publicadas sugieren que en 1990 se presentaron alrededor de 6,000 nuevos casos de cáncer de mama en México y se prevé un incremento de más de 16,500 nuevos casos por año para el 2020 (Rodríguez-Cuevas, 2000).

2. Generalidades del cáncer.

Nuestro organismo se compone de alrededor de cien billones de células, que cumplen funciones específicas, y a excepción de las células nerviosas, deben multiplicarse para reemplazar a las células que llegadas a su madurez o diferenciación deben morir, se sabe que la mayoría solo pueden completar aproximadamente cincuenta divisiones. La división celular es controlada por una serie de sistemas que tienen efectos estimulantes o inhibitorios. Se propone que las células cancerosas se pueden multiplicar indefinidamente, aún en ausencia de algunos factores estimuladores de crecimiento, necesarios para la proliferación de las células normales, y pueden ser resistentes a señales que normalmente inducen la muerte celular programada (apoptosis) (Martín de Civetta, 2011).

El cáncer es una enfermedad compleja que comprende alteraciones que pueden ser congénitas y/o adquiridas, en genes involucrados en la proliferación, apoptosis, reparación del DNA, envejecimiento celular y en genes relacionados con los procesos de angiogénesis, invasión, motilidad y adhesión, cuya expresión cuantitativa y cualitativa confiere a la célula características fenotípicas y biológicas de malignidad en grado variable según particularidades biológicas del tumor, anatómicas por su ubicación y generales del hospedero. Ya que, además de la

dependencia del cáncer respecto del huésped para su irrigación sanguínea, su crecimiento es afectado por hormonas, fármacos y competencia inmunológica del paciente (Hanahan, 2011).

En el cáncer, el organismo produce un exceso de células malignas. Los genes supresores tumorales son silenciados y los oncogenes son activados (mutaciones dominantes o sobre-expresión de genes normales) (Martín de Civetta, 2011).

En el cáncer, las células no responden a las señales que controlan el crecimiento celular y proliferan en forma excesiva. Las células neoplásicas crean su propio mecanismo de nutrición formando factores de angiogénesis. El tiempo de crecimiento de los distintos tipos de tumores es variado, cuando el tumor no sobrepasa la membrana basal de los epitelios se llama in situ, cuando llega a destruir esta membrana basal comienza la invasión de otros órganos provocando metástasis. La metástasis es la propagación a distancia, por vía fundamentalmente linfática o sanguínea, de las células originarias del cáncer, y ocasiona el crecimiento de nuevos tumores en los lugares de destino (Hanahan, 2011).

El cáncer se propone es de origen monoclonal, para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica deben ocurrir mutaciones genéticas, las cuales ocasionan la alteración de sus productos delos que en condiciones normales codificaría el gen. El cáncer puede ser hereditario (por mutaciones en uno o ambos alelos de las células germinales) o esporádico (por la acción de agentes mutágenicos ambientales). Los mecanismos que pueden conducir a alteraciones en los genes pueden ser genéticos o epigenéticos; los genéticos se presentan ante alteraciones estructurales del genoma y los epigenéticos, por alteraciones de las enzimas o de los sustratos de las mismas (Martín de Civetta, 2011).

Es por eso que las formas mutantes de los genes implicados en la regulación del ciclo celular son candidatos indiscutibles de investigación. El ciclo celular está regulado, por ejemplo, por ciclinas y cinasas, la actuación de éstas y de los genes

que ellas mismas controlan son importantes para la regulación de la división celular, desde hace años se está investigando la relación entre estos genes y el proceso de formación de tumores (Lodish, 2005). Otras moléculas examinadas son los genes supresores de tumor y los oncogenes, ya que cuando alguno de estos genes sufre daño o se altera su expresión, se pierde el control sobre la proliferación celular (Klug, 1999).

El cáncer de mama es el crecimiento descontrolado de células malignas en el tejido de las glándulas -mamarias. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal, que empieza en las células epiteliales de los conductos. El cáncer que se encuentra en los lóbulos se llama carcinoma lobulillar y se encuentra con mayor frecuencia en ambas mamas en comparación con otros tipos de cáncer mamario (Biesecker, 1993). Como ocurre con otros tumores, el desarrollo y crecimiento de la enfermedad es variable, y probablemente esté influenciado por características específicas del tumor, del huésped y de los factores ambientales. Se propone que transcurren de 10 a 15 años como tiempo medio desde que aparecen las primeras lesiones precancerosas hasta que la enfermedad se hace sistémica (Rubio, 2003).

3. La glándula mamaria.

La glándula mamaria se encuentra en la estructura anatómica denominada mama (ver figura 1). La histología de la glándula mamaria es prácticamente la misma en todas las especies: un parénquima glandular, compuesto de alveolos y ductos y un estroma de soporte. Cada célula alveolar se comporta como una unidad de secreción, produciendo leche completa, sintetizando y transportando desde el plasma sanguíneo las proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales minerales, anticuerpos y el agua, que son los principales constituyentes de la leche. Las mamas están situadas en la parte anterior del tórax y pueden extenderse en forma variable por su cara lateral (Strand, 1982).

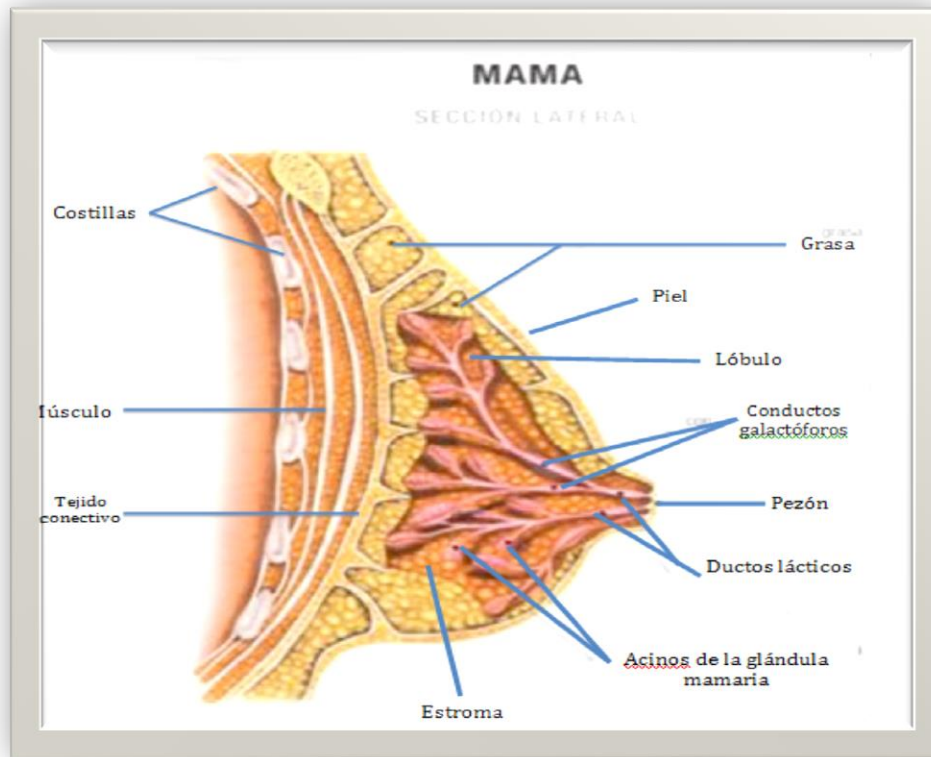


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria. El esquema representa la estructura de la glándula mamaria y el sistema de conductos lactíferos. Modificado de Simak A. y col., 2002.

Durante el desarrollo normal de las glándulas mamarias ocurre una diferenciación celular por variaciones en los niveles hormonales, induciendo cambios en la expresión de los genes que desencadenan un proceso de madurez controlado. En la pubertad, en las mujeres ocurre de manera natural un desarrollo irreversible de la mama; luego, cada vez que ocurre una gestación, se observa un proceso de cambio en las glándulas mamarias que podemos considerar reversibles (involución) terminada la crianza, en donde los conductos lácteos se desarrollan ocupando el espacio del estroma que antes almacenaba grasa.

Como consecuencia de este dinamismo, se pueden observar eventos tales como apoptosis en las células que están siendo sustituidas, proliferación y crecimiento de las células, donde participan proto-oncogenes y genes supresores de tumor,

angiogénesis para un abastecimiento de nutrientes de las células nuevas, entre otros. Estos cambios son regulados por factores de crecimiento, proteínas del ciclo celular, reguladores de invasión o interacciones célula-célula. Si durante estos eventos del desarrollo ocurre un daño celular o alguna alteración en la recombinación y fallan los sistemas de reparación, las células se salen de control y pueden ocasionar una neoplasia (Sandoval, 2010).

4. Factores de riesgo.

El riesgo de desarrollar cáncer de mama puede establecerse en términos de riesgo absoluto o relativo. El riesgo absoluto se refiere al conjunto de la población, mientras que el riesgo relativo hace referencia al riesgo de un grupo determinado de mujeres. A veces se confunde lo que es riesgo a lo largo de la vida y la incidencia anual. El riesgo o incidencia anual es el número de mujeres de una población diagnosticadas de cáncer cada año y se expresa en tanto por ciento. El riesgo a lo largo de la vida es la posibilidad de que una mujer desarrolle cáncer durante su vida. Se sabe que existe un riesgo de 4% al 6%, con algunos factores que acentúan dicho riesgo en parte de esta población (ver tabla 1), de los cuales los que realmente influyen de forma decisiva no son modificables (sexo, edad, antecedentes familiares y personales). Como el riesgo de desarrollar un cáncer de mama aumenta con la edad, a medida que la población envejece el número total de mujeres con cáncer de mama continuará aumentando (Moliner Casares, 2002).

Riesgo alto:
Mutaciones en BRCA 1, BRCA 2, síndrome de Li-Fraumeni
Edad avanzada
País occidental
Historia familiar de primer grado
Hiperplasia atípica en la mama
Radiaciones ionizantes
Historia previa de cáncer de mama
Riesgo moderado:
Menarquia precoz
Menopausia tardía
Nuliparidad o edad del primer parto avanzada (> de 30 años)
Nivel socioeconómico alto
Ingesta de alcohol
Obesidad (en mujeres posmenopáusicas)
Sarcoma de partes blandas en hijo o hija
Historia previa de cáncer de útero, ovario o colon.
Hiperplasia sin atipia en la mama.
Riesgo discutible:
Anticonceptivos orales
Toma de estrógenos o progesterona en posmenopáusicas
Interrupción del primer embarazo
Factores psicosomáticos
Dieta elevada en grasas
Fibroadenoma
Exposición a campos electromagnéticos de baja frecuencia
Disminución de riesgo:
Primer embarazo a término por debajo de los 20-24 años
Multiparidad
Ovariectomía por debajo de los 45 años
Ejercicio físico regular
Lactancia

Tabla 1.- Factores de riesgo. Describe los factores asociados con el desarrollo de cáncer de mama, tomado de Rubio, 2003.

5. Tipos histológicos de cáncer de mama

La mayoría de crecimientos anormales en la mama tienen un origen fibroquístico, por lo que no se consideran tumores, estos están relacionados en su mayoría con factores genéticos; los síntomas que producen son dolor e inflamación, pero no se diseminan al resto del organismo, ni son peligrosos.

La mayor parte de las neoplasias de la mama se originan en el epitelio de los conductos galactóforos (carcinomas ductales) y los restantes se forman en estructuras acinares de los lobulillos mamarios (carcinomas lobulillares). Ambos grupos presentan variedades infiltrantes y no infiltrantes. Los tumores pueden ser localizados o haberse extendido a través de los vasos sanguíneos o mediante los vasos linfáticos; y haber dado lugar a metástasis. De todos los casos de cáncer de mama, sólo el 7-10% en ellos presenta metástasis. Dentro de los tumores malignos existen varios tipos en función del lugar de la mama donde se produce el crecimiento anormal de las células y según su etapa. Existen varias clasificaciones anatómo-patológicas para los tumores. La más comúnmente utilizada es la presentada por la Organización Mundial de la Salud.

En base a los rasgos anatómo-patológicos, macroscópicos y microscópicos los carcinomas podemos dividirlos en:

1) **Carcinoma ductal in situ:** se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Es un cáncer muy localizado, que no se ha extendido a otras zonas y no ha producido metástasis. Por eso se puede extirpar fácilmente, este tipo de tumor se puede detectar a través de una mamografía.

2) **Carcinoma ductal infiltrante:** se inicia en el conducto mamario pero logra atravesarlo, pasa al tejido adiposo de la mama, luego puede extenderse a otras partes del organismo. El tumor crece formando pequeñas e irregulares glándulas, cordones, nidos o células sueltas, infiltrando el estroma fibroso. Es el más frecuente de los carcinomas de mama, se da en un 70% de los casos (ver figura 2-f).

3) **Carcinoma medular:** es un tipo histológico de buen pronóstico. Las células neoplásicas están embebidas en un abundante estroma linfoide. Esta variedad posee bajas posibilidades infiltrativas y constituye del 5 al 7% de todos los cánceres de mama (ver figura 2-c).

4) **Carcinoma tubular:** es una variante bien diferenciada de carcinoma constituida por túbulos de forma angulada dispuestos irregularmente en un estroma fibroblástico reactivo. Su pronóstico es mejor que el de los carcinomas ductales (ver figura 2-a).

5) **Carcinoma mucinoso:** Este tipo de tejido tiene un aspecto característico **coloidal, el cual es una variante hipocelular**. Se observan agregados de células neoplásicas inmersas en lagos de mucina. Es un tipo de carcinoma de bajo grado y de buen pronóstico. Constituye el 3% de todos los carcinomas mamarios. Es de crecimiento lento (ver figura 2-e).

6) **Carcinoma lobulillar in situ:** se produce en las glándulas mamarias (o lóbulos) y aunque no es un verdadero cáncer, aumenta el riesgo de que la mujer puede desarrollar un tumor en el futuro. Suele presentarse antes de la menopausia, pero una vez detectado es importante que la mujer se realice una mamografía de control anual, para poder vigilar un posible desarrollo de cáncer

7) **Carcinoma lobulillar infiltrante (variante clásica):** se caracteriza por la disposición en hilera ("fila india") de sus células y supone del 5-10% de los cánceres de mama (ver figura 2-d).

8) **Comedocarcinoma infiltrante:** Es un tipo de carcinoma ductal conocido como Enfermedad de Paget. Ocurre en el 1% de todos los cánceres de mama. La epidermis del pezón contiene células tumorales. La presencia de carcinoma inflamatorio de la mama, que se caracteriza clínicamente por edema de la piel de la mama, enrojecimiento, calor e induración del tejido subyacente. Su pronóstico

suele ser malo (ver figura 2-b). Es agresivo y de rápido crecimiento. La apariencia de la piel se vuelve gruesa y ahuecada, como la de una naranja y pueden aparecer arrugas y protuberancias. Estos síntomas se deben al bloqueo que producen las células cancerosas sobre los vasos linfáticos (NBCO, 2004; OMS, 2008).

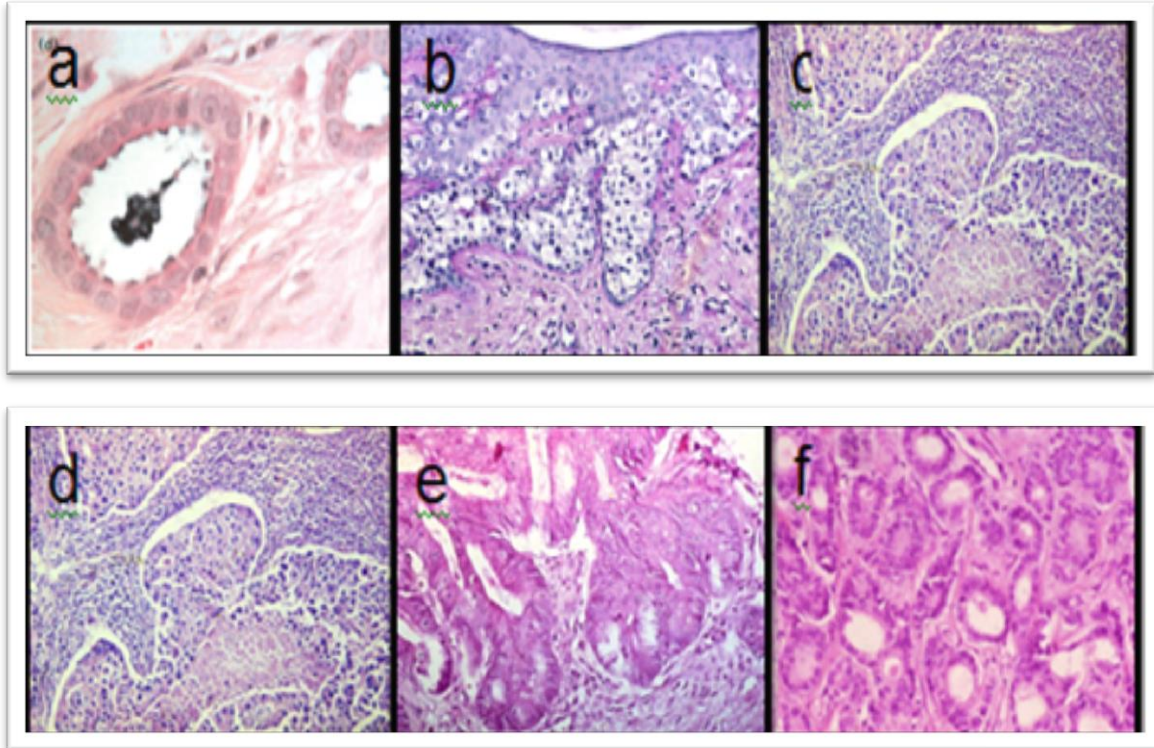


Figura 2. Histopatología del cáncer de mama. Se muestran los diferentes tipos histológicos que se presentan en cáncer de mama. a) Carcinoma tubular, b) Comedocarcinoma infiltrante, c) Carcinoma medular, d) Carcinoma lobulillar infiltrante, e) Carcinoma mucinoso, f) Carcinoma ductal infiltrante. Tomado de Sandoval, 2010.

6. Etapas del cáncer de mama

El cáncer tiene un pronóstico y tratamiento diferente en función de la etapa de desarrollo que se encuentre. En la tabla 2 se resumen las características de cada una de las etapas de cáncer de mama según el Comité Conjunto Americano del Cáncer utilizando el sistema de clasificación TNM (Kasper, 2004).

La letra T: seguida por un número que va del 0 al 4, indica el tamaño del tumor y la propagación a la piel o la pared del tórax debajo de la mama. A un número más alto le corresponde un tumor más grande y una mayor propagación a los tejidos cercanos.

La letra N: seguida por un número que va del 0 al 3, indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos a la mama y, si es así, si estos ganglios están adheridos a otras estructuras.

La letra M: seguida de un número que es 0 o un 1, expresa si el cáncer se ha extendido a otros órganos distantes.

Estadio	Tamaño	Nódulos ganglios	Metástasis
0	<i>In situ</i>	Sin afectación	Sin evidencia
I	≤ 2 cm	Sin afectación	Sin evidencia
IIA	≤ 2 cm	Afectación ganglionar axilar	Sin evidencia
	÷ 2 y 5 cm	Sin afectación	Sin evidencia
IIB	÷ 2 y 5 cm	Afectación ganglionar axilar	Sin evidencia
	> 5 cm	Sin afectación	Sin evidencia
IIIA	Sin evidencia de tumor primario	Mazacote ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
	÷ 2 y 5 cm	Mazacote ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
	> 5 cm	Afectación ganglionar axilar	Sin evidencia
	> 5 cm	Mazacote ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
IIIB	Cualquier tamaño, infiltra directamente la pared torácica, la piel, ambas o carcinoma inflamatorio	Sin afectación o afectación ganglionar axilar o mazacote ganglionar o fijación a planos profundos o afectación de la cadena mamaria	Sin evidencia
IIIC	Cualquier tamaño, afectación infraclavicular, o de la arteria mamaria interna	Afectación simultánea axilar, o supraclavicular independiente de la afectación de la arteria mamaria interna	Sin evidencia
IV	Cualquier tamaño	Cualquier afectación ganglionar	Metástasis a distancia

Tabla 2. Clasificación TNM del cáncer de mama. En la tabla se aprecian las características de cada una de las etapas TNM del cáncer de mama. *Tomado de Principios de Medicina Interna (Kasper, 2004).*

7. Biología del cáncer de mama

7.1 Cáncer de mama esporádico y hereditario

La mayor parte de los cánceres de mama son esporádicos, corresponde del 70 al 80% de los casos, es decir, no hay indicio de una susceptibilidad heredada a padecer la enfermedad. Un caso de cáncer de mama sin antecedentes familiares de carcinoma mamario en dos generaciones, incluidos hermanos, descendencia, padres, tíos, tías y abuelos tanto maternos como paternos, se considera esporádico (Sullcahumán-Allende, 2008). Los cánceres esporádicos se generan por una acumulación de eventos genéticos que provocan el crecimiento descontrolado de una clona celular. Estas alteraciones genéticas implican, sobre todo a genes relacionados con la proliferación y reparación (*brca1*, *brca2*, *p53* y *rb*), que se producen a nivel de las células somáticas, por tanto, no es hereditario. Pero existe una baja proporción, estimada en torno al 5-10%, donde aparece una predisposición hereditaria al cáncer de mama. La alteración mutacional aparece a nivel de un gen que se hereda de forma mendeliana y confiere un mayor riesgo de padecer la enfermedad. Por tanto, la mutación, a diferencia del cáncer esporádico, está presente en cada una de las células del paciente. En general una de cada 8 mujeres desarrollará cáncer de mama lo largo de su vida, pero en algunas familias el número de afectados es mayor (Sandoval, 2010).

En 1990, mediante análisis de ligamiento de familias con múltiples casos de cáncer de mama, se aisló el primer gen de susceptibilidad a esta enfermedad. Este gen conocido como *brca1* se localizó en el cromosoma 17q12- q21 y fue clonado en 1994. El gen *brca1* parecía además estar relacionado con el cáncer de ovario. Hoy en día se sabe que la contribución de estos dos genes (*brca1* y *brca2*) a este tipo de cáncer es más modesta, y que aún quedan muchos casos que no pueden ser explicados por alteraciones de estos genes. (Easton y col., 1993; Easton y col., 1997)

Se conoce que *brca1* y *brca2* actúan como genes supresores, es decir, suprimiendo un oncogén; en estos casos se necesita la supresión de dos alelos para que tenga lugar la aparición de la neoplasia.

7.2 Estructura, función y expresión del gen *brca1*

El gen *brca1* posee 24 exones, 22 de los cuales son codificantes, distribuidos a lo largo de unos 100 Kb de DNA genómico. El gen *brca1* codifica una proteína de 1863 aminoácidos con un peso molecular de 220 KDa. El exón 11 es comparativamente mucho más grande que el resto de los exones el cual codifica para un péptido de 3.5 KDa. El gen *brca1* posee 2 exones, denominados 1a y 1b que generan 2 transcritos distintos a partir de 2 promotores (ver figura 3). La mayor parte de la secuencia del gen *brca1* no tiene una homología muy fuerte con el resto de genes conocidos.

Un gen supresor tumoral como lo es *brca1*, es un gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena. Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales y normalmente inhiben la proliferación celular excesiva y las alteraciones del genoma. Una mutación o una deleción de un gen supresor tumoral, aumentará la probabilidad de que se produzca un tumor, al perder su función. Cuando se posee una alteración en el gen *brca1* o *brca2* en células de línea germinal, cada una de las células del sujeto portador posee la mutación. Un alelo sano es suficiente para mantener la funcionalidad del gen. Es necesario, por tanto, la pérdida del alelo sano para poder llegar a desarrollar una neoplasia. La pérdida del alelo puede producirse por una deleción de la zona que incluye el gen codificante, aunque también puede producirse una hipermetilación que silencia la expresión del gen (Valgerdur y col. 2006).

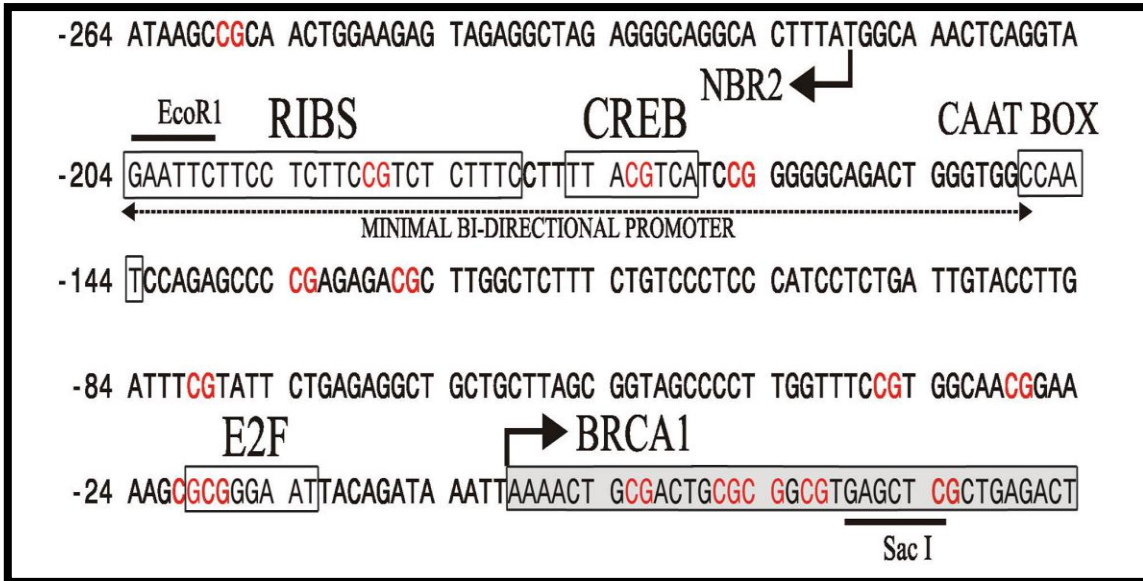


Figura 3. Secuencia del promotor del gen *brca1*. Los puntos de inicio de transcripción se indican con la flecha izquierda y el derecho de los genes respectivos. Los sitios de unión de factores de transcripción identificados como importantes para la actividad del promotor. El primer exón del gen *brca1* se indica por el cuadro sombreado y los dinucleótidos CpG que pueden ser potencialmente metilados, se muestran en rojo. *Tomado de Sandoval, 2010.*

En la proteína BRCA1 sólo una secuencia situada en la zona amino-terminal de BRCA1 (residuos: 20-68) guarda homología con proteínas previamente descritas. Esta secuencia conocida como “dominio anillo”, es característica de muchos factores de transcripción y parece estar implicada en la interacción de las proteínas con el DNA y proteína-proteína (Mediante el sistema del doble híbrido se ha localizado una proteína que interactúa con este dominio de anillo llamada BARD1 el cual está involucrado en el proceso de ubiquitinación, en este dominio de anillo se ha demostrado que interacciona con E2F, un factor de transcripción involucrado en la regulación del ciclo celular. La proteína BRCA1 también posee una secuencia en la zona carboxi-terminal de la proteína, conocida como dominio BRCT (del inglés BRCA1 C-terminus) que aunque está poco conservada, mantiene una cierta homología con otras proteínas implicadas en la reparación del

DNA y control del ciclo celular, este dominio BRCT forma un complejo con dos proteínas de unión RB (Narod y col., 2004).

La función de la proteína BRCA1 parece estar relacionada con el mantenimiento de la integridad del genoma. El hecho de que la sobreexpresión de BRCA1 produzca una inhibición del crecimiento celular además de que, en los cánceres provocados por mutaciones en este gen se observe una pérdida del alelo sano, ha demostrado que *brca1* es un gen supresor de tumor. La inestabilidad genómica que provoca una disfunción de BRCA1, la interacción con otras proteínas relacionadas directamente con la reparación del genoma tales como RAD51 y con el ciclo celular (Koonin y col., 1996; Crook y col., 1997) la presencia del dominio BRCT localizado en algunas proteínas que participan en la reparación de DNA (Saurin y col., 1996), así como la identificación de una secuencia de localización nuclear en el interior del exón 11, han permitido demostrar que la proteína BRCA1 está implicada en el mantenimiento y reparación del genoma, siendo capaz de regular el ciclo celular cuando el DNA está dañado (Narod y col., 2004). La activación de la función de la proteína BRCA1 está muy relacionada con su fosforilación. Algunos estudios muestran como la proteína BRCA1 es blanco de diferentes cinasas ATM (del inglés ataxia telangiectasia mutated), ATR (del inglés ATM and Rad3 related protein) y ChK2 (del inglés Checkpoint kinase 2) después del daño al DNA, BRCA1 es fosforilado en la región SQ (del inglés cluster of serine and threonine sequence), se ha reportado que ATM media la fosforilación en respuesta a la radiación ionizante, mientras que ATR media la fosforilación en respuesta a radiación ultravioleta y ChK2 interactúa con BRCA1 después del daño al DNA con radiación ionizante (ver figura 4) (Zhang, 2007). Recientemente se reportó, que cuando hay daño al DNA por radiación ionizante, CtIP es fosforilado por ATM causando la disociación de BRCA1 de CtIP, permitiendo la inducción de Gadd45 (del inglés Growth Arrest and DNA Damage) el cual está involucrado en la reparación del DNA y la regulación del ciclo celular (Deng, 2006). Otra de las funciones de BRCA1 está en puntos de control del ciclo celular. La proteína BRCA1 puede existir como parte del complejo genoma de vigilancia asociado

BRCA1 (BASC). Este complejo incluye tales proteínas como el síndrome de Nijmegen 1 (NBS1), el complejo RAD50-MRE11 (que tiene actividad exonucleasa en el rompimiento de doble cadena), la ataxia telangiectasia mutada (ATM; que funciona con BRCA1 en la vía de reparación de doble rompimiento de la cadena), Los complejos MLH1 y MSH2-PMS1-MSH6 y la proteína BLM que se ve afectado en el síndrome de Bloom (Narod y col., 2004).

BRCA1 es una proteína que posee además dominios capaces de activar la transcripción, concretamente, es capaz de activar la transcripción del gen *p21*, que es un potente supresor del ciclo celular en la fase G1/S (Scully y col., 1997). También la relación con desacetilasas, helicasas, así como proteínas reguladoras como la CtIP (por sus siglas en ingles C-terminal binding protein –CtBP-interacting protein) sugiere que BRCA1 tiene un papel regulador de la transcripción y reparación del DNA. Algunos trabajos muestran como *BRCA1* podría estar implicado en la degradación dependiente de ubiquitina de ella misma o de otras proteínas, este proceso de ubiquitinación se lleva a cabo entre la interacción de la proteína BRCA1 y BARD1 a través de su dominio dedo-anillo (RING-finger), estudios recientes indican que BRCA1 regula el proceso de ubiquitinación en respuesta al estrés (Zhang, 2007).

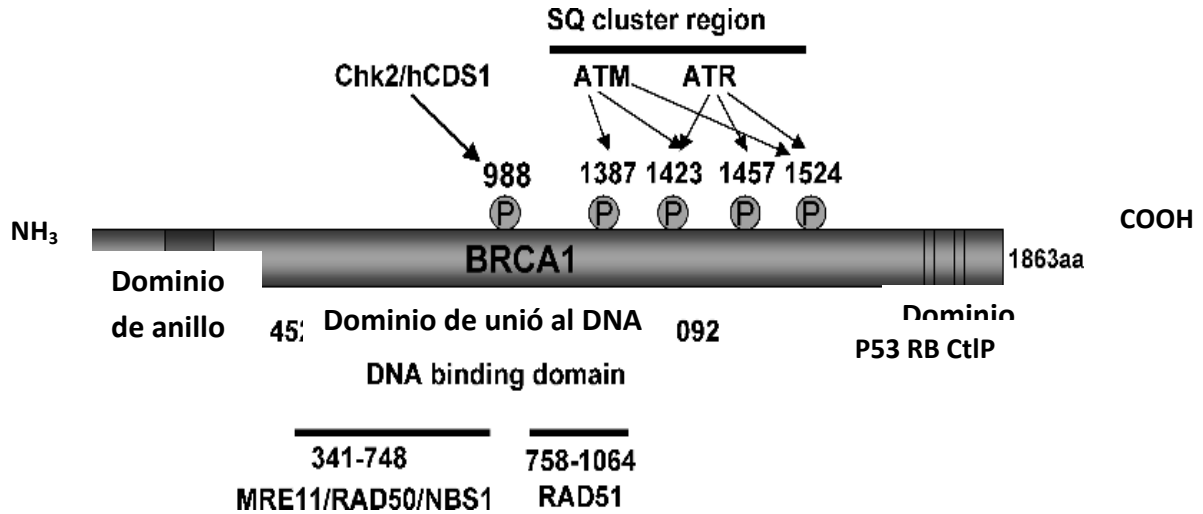


Figura 4. Diagrama de la proteína BRCA1. Se muestran los dominios funcionales de la proteína BRCA1, los sitios de fosforilación (P) y las regiones que interactúan con otras proteínas tales como P53, Rb, CtIP, BARD1, E2F, RAD51 y MRN (Tomado de Zhang y col. 2007).

8. Genética y Epigenética.

Tradicionalmente la investigación en cáncer se ha enfocado a la identificación de alteraciones y mutaciones genéticas. Hoy, nuestro conocimiento se ha incrementado al entender las alteraciones epigenéticas, éstas corresponden a los cambios en el DNA sin alterar su secuencia y los cambios en la remodelación de la cromatina que modifican la regulación transcripcional de genes supresores tumorales y protooncogenes. El remodelamiento de la cromatina es el centro de todos los eventos epigenéticos.

Así la activación/desactivación de los genes está controlada por mandos tanto genéticos como epigenéticos, existiendo diversas formas de interconexión entre la genética y la epigenética. Se considera, por tanto, que el cáncer surge de la interacción de elementos genéticos y epigenéticos, y no es posible abordar ambos aspectos de forma independiente. El campo de la epigenética intenta determinar cómo los genes son activados o desactivados a través de la metilación del DNA y cómo la modulación de la cromatina afecta la función genómica (Valdespino, 2008).

Diferentes alteraciones epigenéticas han sido encontradas como factores causales en cáncer, trastornos genéticos, trastornos neuropsiquiátricos y síndromes pediátricos. En un futuro próximo, la caracterización de los perfiles epigenéticos de los diversos tipos de cáncer, conjuntamente con el conocimiento de las mutaciones génicas, sentarán las bases para el diagnóstico molecular y el diseño del tratamiento personalizado del paciente con cáncer (Rodenhiser, 2006).

Las modificaciones epigenéticas son heredables y pueden ser transmitidas a las células hijas durante las divisiones celulares. El silenciamiento fisiológico de los genes a nivel de la cromatina es necesario para la vida de los organismos eucariontes y es clave en diferentes procesos biológicos que incluyen diferenciación, impronta génica, y silenciamiento de grandes regiones cromosómicas como sucede en el cromosoma X de las mujeres (Allis, 2007). Estas modificaciones también juegan un papel importante en las alteraciones genéticas que se desarrollan en el cáncer; ya que las desregulaciones genéticas como lo son la pérdida de los genes supresores tumorales y epigenéticas como el silenciamiento de genes supresores tumorales, cooperan para desarrollar la tumorigénesis. Aunque en general los cambios de silenciamiento epigenético en las células tumorales suceden en cualquier etapa de la transformación neoplásica, predominan en las etapas iniciales. Así, la transformación neoplásica es un proceso de multietapas que involucra la activación de oncogenes y/o el silenciamiento de genes supresores a partir de eventos genómicos y epigenómicos. Este silenciamiento de genes incluye los eventos relacionados con la metilación del DNA, con las modificaciones covalentes de las histonas y con los factores que remodelan el complejo nucleosomal; respondiendo a señales ambientales y regulando los patrones de expresión de los genes que participan en la replicación y reparación del DNA (Wang, 2007). El entendimiento del control de la expresión génica en la cromatina de las células madre, ha sido clave para empezar a comprender los cambios epigenéticos en cáncer (Valdespino, 2008).

8.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA junto con la de las histonas son importantes mecanismos epigenéticos de regulación del genoma. La metilación del DNA funciona como un regulador génico (altera el reconocimiento de los sitios de regulación transcripcional), siendo un proceso que refuerza las decisiones de la expresión génica ejercida por otros mecanismos, correlacionándose con la represión génica. También participa en el proceso de la impronta genómica en los mamíferos (mecanismo que estabiliza la represión génica), en el cual la expresión de un gen depende si es heredado de la madre o del padre.

Esta modificación consiste en la adición enzimática de un grupo metilo al residuo de citosina de la cadena del DNA. Esta reacción es mediada por las DNA-metiltransferasas (DNMTs) en la presencia del donador de metilos (S-adenosilmetionina, SAM), resultando 5-metilcitosina. En los mamíferos la metilación ocurre en los dinucleótidos CpG (citosinas que son inmediatamente seguidas de una guanina), y es proporcionalmente mayor en las regiones no codificantes. La metilación *de novo* en secuencias previamente no metiladas es catalizada por las DNMT3a y las DNMT3b, mientras que el mantenimiento de la metilación por la DNMT1. En el genoma humano existen 2.8×10^7 dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados y de ellos 70-80% normalmente se encuentran metilados. Muchos genes pueden ser inactivados en un solo tipo de cáncer a través de la metilación de los promotores (Jones, 2007).

8.2 Alteraciones en la metilación del DNA.

Las alteraciones epigenéticas en cáncer incluyen tanto la pérdida (hipometilación) como ganancia de la metilación del DNA (hipermetilación). Estos mecanismos son importantes en la iniciación o progresión tumoral, permitiendo la acumulación de cambios adicionales génicos u otros epigenéticos y conduciendo a la desactivación o sobre activación de diferentes vías de señalamiento intracelular (McGarvey, 2006 y Baylin, 2007).

Diferentes patrones alterados de ganancia o pérdida de metilación del DNA están distribuidos en el genoma de células cancerosas comparados con el genoma de células normales. La alteración epigenética más estudiada en cáncer es el anormal silenciamiento de genes asociado a la hipermetilación del DNA en las islas CpG de la región promotora de diferentes genes supresores tumorales (p.ej. hipermetilación del gen *brca1* en carcinoma mamario). La hipometilación del DNA contribuye al cáncer porque promueve la inestabilidad cromosómica, la activación de oncogenes, la activación de transposones y la pérdida de la impronta génica (Ting, 2006).

Eventualmente, los patrones de metilación del genoma pueden también emplearse como biomarcadores del tipo de tumor, para detección temprana, monitorear pronóstico y como indicadores de susceptibilidad o respuesta al tratamiento (Karpf, 2007). Por lo que para monitorear adecuadamente un tumor es necesario explorar tanto el genoma como el epigenoma de las células tumorales.

8.3 Técnicas para el estudio de metilación

Dentro del genoma humano se encuentran muy pocos dinucleótidos CpGs, pero se han caracterizado secuencias genómicas que varían de 100 pb a varias kilo bases, en donde el contenido de Citocinas y Guaninas es mayor al 60%, por lo que aumenta la posibilidad de encontrarse dinucleótidos CpGs. A estas zonas se les denominó “islas CpGs”. Estas islas se encuentran principalmente en los extremos 5´ de muchos genes coincidiendo con la región promotora y con cierta frecuencia con los primeros exones. Paradójicamente, en condiciones normales, estas islas CpGs no se encuentran metiladas, con excepción de las islas relacionadas a genes de expresión tejido específico, islas presentes a lo largo del cromosoma X inactivo y genes de expresión mono-alélica improntados (Esteller y col., 2000; Muller y col., 2002).

La hipermetilación es un proceso mediante el cual se metilan posiciones concretas de las islas CpG que existen en la región promotora del gen *brca1*. Esta modificación del promotor impide la transcripción del gen, ya sea porque proteínas

reguladoras necesarias para la transcripción ya no son capaces de unirse al promotor o porque proteínas represoras que tienen afinidad por las zonas metiladas se unen inactivando la transcripción. Debido al gran tamaño y a la gran complejidad de los genes *brca1* y *brca2*, no se descarta que nuevas funciones puedan ser atribuidas a estos genes, que actuarían a distintos niveles mediante dominios diferentes (Tavtigian y col., 1996).

El grado de metilación en las secuencias de DNA, específicas de tejido, se analiza utilizando el bisulfito de sodio (NaHSO₃). Al incubar el DNA genómico en NaHSO₃ obtenemos una conversión de las citosinas no metiladas en uracilo mediante deaminación, que luego mediante PCR se detectan como timina, mientras que las citocinas protegidas por la 5-metilcitocina no presentan ningún cambio: así se logran diferenciar las citosinas metiladas de las no metiladas, para luego amplificar por PCR cada uno de los fragmentos, basados en el diseño de cebadores (primers) específicos. Esta metodología se conoce como PCR Específica para Metilación (Herman y col., 1996).

II. Antecedentes.

Existen reportes en los que se hace el análisis epigenético para entender la relación que existe entre la metilación de la región promotora del gen *brca1* en cáncer de mama esporádico y la expresión de la proteína BRCA1. Encontrándose que la metilación en la región promotora del gen *brca1* participa en el desarrollo de cáncer de mama esporádico al ocasionar la disminución de la expresión de la proteína BRCA1.

Dobrovic y col., en 1997, estudiaron siete tumores de cáncer de mama encontrando que en dos existía hipermetilación en la región promotora del gen *brca1* con respecto al tejido normal donde no encontraron metilación. En otro estudio, Esteller y col., en el 2000 analizaron el estado de metilación del promotor del gen *brca1* en 215 tumores mamarios y en 21 líneas celulares, así como siete xenotransplantes, encontrando una hipermetilación y disminución de la expresión del RNAm en dos xenotransplantes en 13% de los tumores y además pérdida de la heterocigocidad. Sin embargo, en las líneas celulares no encontraron alteraciones en el estado de metilación. Por otra parte, Valgerdur y col. en 2006, evaluaron también el estado de metilación del promotor del gen *brca1* en 146 tumores de mama esporádico, encontrando hipermetilación en 13 tumores (9.1%). De estos, nueve mostraron una reducción en la expresión de la proteína y una delección en el gen *brca1*.

Recientemente Shames y cols. (2006) demostraron un patrón de hipermetilación común (*hypermethylation signature*) en las regiones promotoras de siete genes en cánceres mamario y pulmonar; cambios similares fueron también parcialmente compartidos (cuatro de estos genes) en otros tumores epiteliales originados en próstata, y colón. Estos patrones de hipermetilación común de algunos genes en diferentes tumores podrían representar blancos para su evaluación clínica o su intervención terapéutica.

La contribución de los cambios genéticos y epigenéticos (silenciamiento de genes) en la determinación del fenotipo tumoral celular ha sido demostrada en varios modelos de cáncer. En un estudio de la línea celular humana de cáncer de colon

HCT116, se encontraron mutaciones en un alelo de varios genes tumorales supresores y adicionalmente por lo menos otros 14 genes estuvieron silenciados epigenéticamente. Cuando fueron reactivados estos últimos mediante agentes desmetilizantes del ADN, se redujo la proliferación y se indujo senescencia o apoptosis (Herman, 1998).

En conjunto, estos resultados sugieren que la pérdida de la función del gen *brca1* por hipermetilación y la eventual pérdida de la heterocigocidad, constituyen eventos importantes en el desarrollo de cáncer de mama esporádico.

III. Planteamiento del problema

Desde hace algunos años diversos estudios han demostrado que la metilación del promotor del gen *brca1* puede alterar los niveles de expresión de la proteína BRCA1, asociándose a una posible causa de cáncer de mama en mujeres. Esto por la conocida función de dicha proteína, ya que ésta interfiere en procesos de regulación del ciclo celular y participa en la reparación de daño al DNA. Cuando hay un cambio en la región de reconocimiento de la transcripción, como en este caso la metilación del promotor, puede impedirse la expresión normal del gen siendo un problema severo ya que el gen *brca1* es un gen supresor de tumor. Debido a que en la población mexicana solo se ha realizado un estudio que correlacione la metilación del promotor del gen *brca1* sobre la expresión de la proteína BRCA1, se propone el presente estudio con la finalidad de comparar y aportar resultados, con otros ya existentes, y así aportar información para el entendimiento de dicho padecimiento.

IV. Justificación

El cáncer de mama es un problema de salud en México. A pesar de la ausencia de mutaciones en el gen *brca1* en cáncer de mama esporádico, se ha reportado que el nivel de expresión de la proteína disminuye en los tumores, y que esta disminución en la función de BRCA1 está relacionada con el fenotipo maligno. Uno de los mecanismos que pudiera reprimir la expresión del gen *brca1* es la hipermetilación aberrante en su región promotora.

En la actualidad solo existe un estudio relacionado con la regulación epigenética del gen *brca1* en cáncer de mama esporádico en población mexicana, por lo que se pretende analizar el grado de metilación de la región promotora y enriquecer los resultados del estudio previo.

Los resultados podrían ayudar a explicar la relación entre los niveles de expresión de *brca1*, el patrón de metilación de la región promotora y su importancia con el desarrollo del cáncer de mama en mujeres mexicanas. Además, el análisis del patrón de metilación del gen *brca1* podría servir como un marcador molecular para definir un subgrupo de pacientes con cáncer de mama que podrían beneficiarse del uso terapéutico con agentes desmetilantes que reviertan el estado de hipermetilación y reconstituyan los niveles normales de expresión de BRCA1 mejorando el pronóstico de los pacientes.

V. Objetivos

1. Objetivo general.

- Determinar el estado de metilación en la región promotora del gen *brca1* y la expresión de la proteína BRCA1 en tejido mamario neoplásico esporádico en mujeres mexicanas.

2. Objetivos particulares.

- Hacer un microarreglo de tejidos con las muestras.
- Determinar la expresión de la proteína BRCA1 en tumores de mama mediante inmunohistoquímica.
- Determinar el estado de metilación del promotor del gen *brca1* en tejido mamario neoplásico por medio de la reacción de Bisulfito de Sodio y PCR específica para metilación.
- Correlacionar el estado de metilación del promotor con los niveles de la proteína BRCA1.

VI. Estrategia experimental.

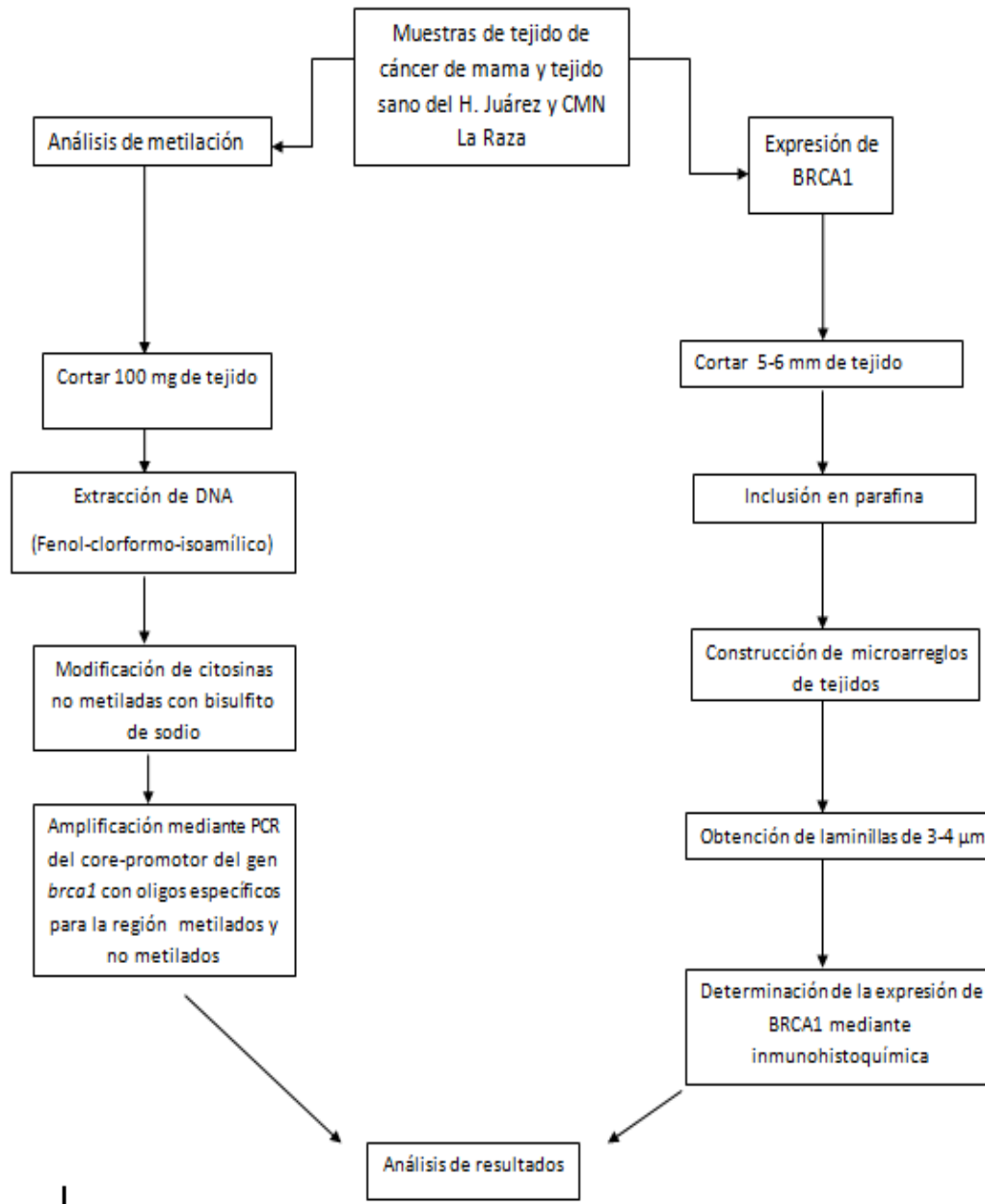


Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia general. Las biopsias de cáncer de mama se fraccionaron en dos partes: una de ellas se utilizó para determinar el estado de metilación del promotor, utilizando la técnica de bisulfito de sodio y la otra parte del tejido se utilizó para determinar el nivel de expresión de la proteína BRCA1, mediante inmunohistoquímica.

VII. Metodología

1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio descriptivo, transversal y analítico.

2. Tamaño de la muestra y muestreo.

Las muestras de tejido tumoral de cáncer de mama y tejido no afectado fueron obtenidas del Hospital Juárez-SSA y del Hospital La Raza del IMSS. Se realizó una revisión de los expedientes clínicos para seleccionar los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión. Para este estudio se incluyeron biopsias de mujeres mexicanas con diagnóstico anatomopatológico positivo de cáncer de mama invasivo. Las pacientes analizadas en este estudio no tuvieron tratamiento previo a la operación (quimioterapia, radioterapia o tratamiento hormonal) que pudieran inducir cambios en el proteoma. Las mujeres incluidas en este estudio cuentan además con una historia clínica familiar y personal que contiene los datos necesarios para el estudio. De igual manera, pacientes con fuerte historia de cáncer de mama familiar, con carcinoma ductal invasivo bilateral, y con resultados anatomopatológicos de cáncer no confirmados fueron excluidas, esto con el fin de asegurar que las pacientes solo presenten cáncer esporádico.

Se considera el análisis de 40 muestras en total, 20 tumores con su respectivo tejido adyacente.

Para obtener biopsias que sean representativas y que nos permitieron tener resultados confiables, estas pasaron por dos filtros de selección. El primero fue el diagnóstico clínico dictaminado por el médico cirujano que confirmó y determinó la etapa patológica en la que se encontró el tumor en base a la clasificación TNM. El segundo fue el análisis histológico por un patólogo experto, evaluado mediante una impronta del tejido mamario en donde se verificó la variedad histológica de la biopsia (ductal o lobulillar) así como la celularidad de la misma. Para que una biopsia sea representativa de un tumor debe contener al menos un 70% de células malignas.

Las biopsias fueron obtenidas de mujeres que llegaron voluntariamente a los centros de salud y que de acuerdo a los comités de ética e higiene de los mismos, fueron sometidas a cirugía para remover el tumor. Las operaciones fueron realizadas bajo los más altos estándares de higiene y seguridad con personal altamente calificado y especializado. Las biopsias de tejido normal fueron obtenidas de estas mismas mujeres siguiendo el acuerdo de consentimiento por escrito y firmado por las pacientes.

Una vez que las biopsias son obtenidas se colocan en un criotubo con 4ml de RNAlater QIAGEN, para su conservación y transporte. Posteriormente se retira el exceso de RNAlater y son almacenadas a -70°C hasta su uso.

3. Inclusión de los tejidos en parafina

Se cortaron 5 mm de tejido, se colocaron en 10 ml de paraformaldehído al 10% para fijar el tejido durante 24 horas. Posteriormente, se deshidrataron las muestras mediante la inmersión subsecuente en soluciones de alcoholes (70%, 80%, 90% y Absoluto). Una vez deshidratado se embebió en parafina a 56°C. Después de que se obtuvo el bloque con las muestras, se realizaron cortes finos de 3-5 μm y cada muestra se tiñó con hematoxilina y eosina (HE) para el análisis histopatológico. La tinción de tejidos con HE se realizó durante 30 s, luego se lavaron las laminillas con agua corriente y se quitó el exceso de HE pasando las laminillas por alcohol ácido (200ml de agua destilada, 100 ml de alcohol 96% y 1.0 ml de ácido clorhídrico concentrado) durante unos segundos. A continuación se lavó nuevamente con agua corriente y se incubó en agua amoniacal (300 ml de agua destilada, 1.0 ml de hidróxido de sodio) durante 2-4 s. Se volvió a lavar con agua corriente y se sumergieron las laminillas en alcohol al 50%. Para luego teñir con eosina durante 2-3 s. Se enjuagó y comenzó la deshidratación del tejido sumergiendo las laminillas en etanol al 96% durante 5 min, luego en etanol al 100% durante 5 min y en xilol durante 10 min. Finalmente se montó el cubreobjetos a la laminillas empleando reactivo de Permont.

4. Microarreglos de tejidos (MAT)

Se utilizó un microarreglador de tejidos “Manual Tissue-Arrayer II” marca Chemicon como plataforma, utilizándose una aguja de 1 mm para la construcción de los microarreglos de tejidos. La técnica consistió en tomar un pequeño cilindro de cada bloque de parafina (bloque donante) e insertarlo de forma precisa en un bloque receptor de parafina, a través de un sistema de coordenadas para saber su localización exacta. Se seleccionaron las zonas más representativas del tumor en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina. Los cilindros fueron obtenidos del centro, periferia y zonas intermedias del tumor.

Para la construcción de los microarreglos luego de la selección del material objeto de estudio en los portaobjetos de las biopsias teñidos con HE se localizó la zona en el bloque de tejido donante conservado en parafina. Se construyó un bloque de parafina en blanco que será el bloque receptor de los microarreglos tisulares. Se preparó el Tissue-Arrayer II colocando dos agujas de punción, donante y receptora, con una sección de 1 mm en la torreta. Con la aguja receptora se realizó una perforación en el bloque receptor y se extrajo el cilindro blanco de parafina sobrante de la aguja receptora. Situando la bandeja puente protectora encima del bloque receptor, se colocó encima el bloque de tejido donante conservado en parafina. Se realizó una perforación en la zona preseleccionada del bloque donante con la aguja donante del Tissue-Arrayer II, obteniendo un cilindro del interior de la aguja donante, al presionar sobre el tope de profundidad situado por encima de la aguja de punción. Se introdujo el cilindro de tejido donante en el orificio previo que se había efectuado en el bloque receptor. Se avanzó la torreta del Tissue-Arrayer II dos vueltas del orificio anterior haciendo una nueva perforación con la aguja de punción receptora y se repitieron los pasos que se describieron, y así sucesivamente, hasta completar la primera fila de orificios y oclusión con cilindros tisulares donantes en el bloque receptor (spots). Con el micrómetro se efectuó un desplazamiento lateral para separar otras 2 vueltas del último orificio realizado en la primera fila comenzando a construir el primer orificio de la segunda fila. Se repitieron los pasos descritos para la primera fila, en la segunda y sucesivas filas.

4.1 Obtención de laminillas

Una vez fabricado el bloque del microarreglo de tejido (MAT) se colocó el bloque en el micrótopo (Leica RM 2125), se alineó y rebajó el bloque hasta obtener cortes representativos de todas las muestras posicionadas en el TMA. Para obtener las laminillas se hicieron cortes de 5 μm , se utilizó el sistema de transferencia de cinta PSA. Se colocó un segmento de la cinta sobre el bloque y se procedió a obtener los cortes de 3 μm , una vez que se obtuvo el corte en la sección de cinta se colocó en una laminilla con adhesivo, se le pasó un rodillo y se expuso a la luz ultravioleta durante 2 min para fijar el tejido a la laminilla, después se sumergió en el solvente TCP para desprender la cinta adhesiva y obtener los MATs, los cuales se colocaron a 60°C, durante 24 h para desparafinar y se sumergieron en xilol durante 24 h para retirar los residuos de adhesivo.

4.2 Inmunohistoquímica por el sistema Avidina-Biotina (ABC)

Para la detección de los niveles de expresión de la proteína BRCA1, se desparafinaron las laminillas durante 30 min, a una temperatura de 60°C, se hidrataron con Xilol seguido de un tren de alcoholes (Absoluto, 90%, 70% y PBS 1X). Posteriormente, se realizó la recuperación de antígenos con amortiguador de citratos durante 20 min a 90°C, se bloqueó la peroxidasa endógena con suero normal de cerdo durante 30 min, se agregó el primer anticuerpo anti-BRCA1 durante toda la noche a una dilución de 1/100. Finalmente, se lavó con PBS 1X tres veces, se colocó el segundo anticuerpo biotinilado (Dako) y se reveló con la diaminobenzidina.

4.3 Contrateñir con Hematoxilina de Mayer y montaje

Para contrateñir las muestras, se sumergieron las laminillas en hematoxilina de Mayer unos 30 s, se lavó con agua y se incubó en agua amoniacal durante 5 min. A continuación se volvió a lavar con agua y luego se sumergió en etanol al 96% durante 5 min, posteriormente en etanol al 100% durante 5 min y en xilol durante 10 min, todo a temperatura ambiente. Finalmente, se montó el cubreobjetos a la laminillas empleando reactivo de Permount.

4.4 Digitalización de los MATs y cuantificación

Se capturaron las imágenes digitales en un microscopio óptico acoplado a una cámara digital (Carl Zeiss, Germany) en formato TIF (TaggedImage Format). Se analizó la calidad de las muestras empleando un aumento de 40 x y se clasificaron las muestras en cuatro categorías, muy buena, buena, regular y mala, dependiendo de la proporción de tejido epitelial presente. En los casos en los cuales la calidad se consideró adecuada (muestras muy buenas, buenas y regulares) se tomaron fotografías a 40x para determinar el nivel de expresión de BRCA1. La expresión de la proteína fue evaluada utilizando un sistema en el cual la intensidad de la tinción nuclear fue clasificada como nula, baja, moderada y alta. Se utilizó el programa Image Pro- Plus para capturar y analizar las imágenes.

5. Extracción de DNA

Se realizó la extracción del DNA de los tumores y tejidos adyacentes mediante el método de proteinasa K (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico). A partir de 100 mg de tejido congelado se maceró la muestra con mortero. Se le agregó el buffer de digestión (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH=8.0, 25 mM de EDTA, SDS 0.5%, 0.1 mg/ml de proteinasa K), se incubó la muestra durante 24h a 56°C. Posteriormente, se realizó la extracción volumen: volumen con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Después, se centrifugó durante 10 min a 16,000 g. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se precipitó con isopropanol, se lavó dos veces la pastilla con etanol al 70% se centrifugó nuevamente durante 3min a 800g. Finalmente, el DNA puro se resuspendió en un volumen de 25 µl de agua libre de nucleasas y se analizó la integridad y calidad del DNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las bandas fueron analizadas mediante la tinción con SYBER GOLD y visualizadas bajo un transiluminador con lámpara de luz UV.

6. Modificación del DNA por el método de bisulfito de sodio

Se utilizó el kit EpiTectBisulfite Kits de QIAGEN, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Este procedimiento se realiza tanto a tumores como tejidos adyacentes. Se utilizan 2µg de DNA por cada muestra.

En un tubo de PCR de 200µl se coloca el DNA, agua libre de RNasas, el MixBisulfite y el DNA Protect Buffer, en ese orden respectivamente, hasta alcanzar un volumen final de 140µl. Posteriormente se agitan los tubos, y debe existir un cambio de coloración de verde a azul, esto cambio de color nos da la seguridad de que la muestra se encuentra en óptimas condiciones de pH para la conversión con Bisulfito de Sodio. Los tubos se conservan a temperatura ambiente hasta que se hace la conversión en el termociclador.

Las condiciones y ciclos en el termociclador son las siguientes:

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 minutos	95°C
Incubación	25 minutos	60°C
Desnaturalización	5 minutos	95°C
Incubación	85 minutos	60°C
Desnaturalización	5 minutos	95°C
Incubación	175 minutos	60°C
Hold	Indefinido	20°C

Tabla 3. Condiciones de reacción para la conversión con Bisulfito de Sodio.

Una vez que concluye la conversión se procede a limpiar el DNA procesado. A continuación se resumen los pasos a seguir.

Se centrifugan los tubos y todo el contenido se deposita en un tubo de 1.5ml, se agregan 560µl de Buffer BL a cada muestra y se agita, se transfiere la muestra a una EpiTect spin column y se centrifuga un minuto a máxima velocidad, se tira el

líquido recolectado y se regresa la columna al tubo colector. Posteriormente se agregan 500µl de Buffer BW, se mezcla y centrifuga durante un minuto a máxima velocidad, Después se agregan 500µl de Buffer BD a cada columna y se deja incubar 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga durante un minuto. Se agregan 500µl de Buffer BW y se centrifuga durante un minuto, este paso se hace por duplicado. Se centrifuga de nuevo un minuto para retirar cualquier residuo de líquido que haya quedado. Finalmente se eluye agregando 20µl de Buffer EB justo en el centro de cada membrana y centrifugando 1 minuto a 12,000 rpm. El DNA convertido se conserva a -20°C.

7. PCR específica para metilación.

La PCR empleada es específica para metilación (MSP) (Modificada de Sandoval, 2010). Cada una de las muestras fue probada con dos pares de oligos diferentes:

- Oligos para amplificar la región metilada.
- Oligos para la región no metilada

Secuencias de los oligos usados en las reacciones de PCR:

- Oligos para región metilada

Sentido 5'-TCGTGGTAACGGAAAAGCGC-3'

Antisentido 5'-AACGAACTCACGCCGCGCAA-3'

- Oligos para la región no metilada

Sentido 5'-AACAAACTCACACCACACAA-3'

Antisentido 5'-TTGAGAGGTTGTTGTTTAGTGG-3'

Todas las muestras son probadas con ambos oligos en una reacción de PCR punto final de acuerdo a la siguiente:

Reactivo	Concentración	Cantidad	Condiciones de reacción
Buffer PCR 10X	1X	3 μ L	T ^o de activación: 95 ^o C 10 min T ^o de desnaturalización: 94 ^o C 1 min T ^o de alineación 63 ^o C 1 min T ^o de elongación 72 ^o C 4 min La reacción se lleva a cabo 40 ciclos.
dNTP's	0.2mM	0.6 μ L	
Oligos NO-MET-AS	10 pm	1 μ L	
Oligos MET-AS			
Oligos NO-MET-S	10pm	1 μ L	
Oligos MET-S			
MgCl	1.5mM	0.75 μ L	
Taq Polimerasa	1.25U	0.3 μ L	
Agua para PCR		c.b.p 25 μ L	
DNA plantilla		100ng de DNA Genómico	

Tabla 4. Condiciones de reacción para la PCR del promotor de brca1.

Finalmente los productos de PCR son evaluados en un gel de agarosa al 2%.

Se espera un producto de 100 pares de bases cuando el promotor no está metilado y de 68 pares de bases cuando esté metilado.

VIII. Resultados

1. Selección de casos

De las muestras biológicas de las pacientes se revisaron los registros y de acuerdo a los criterios de inclusión se seleccionaron 40 muestras. A partir de estas biopsias, se obtuvieron cortes de 5 mm y se embebieron en parafina como se menciona en materiales y métodos. Estas muestras fueron analizadas por un patólogo en forma independiente, el cual revisó que el tejido estuviera bien conservado y que el diagnóstico fuera concordante con el del registro y que contuviera al menos 80% de células neoplásicas. Con base en el análisis histopatológico, se determinó que, el tipo histológico más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante con un 80% de los casos, seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante con un 10%, con 5% el carcinoma ductal *in situ*, al igual que el carcinoma mucinoso con un caso. Además, se incluyeron los veinte tejidos de mama normal (tejido adyacente de cada muestra) como controles. En la tabla 4 se resumen las características de las veinte muestras que resultaron adecuadas para el presente estudio.

De las veinte muestras y controles incluidos en parafina, se realizaron cortes de 4-5 μm . Estas laminillas se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar el área de estudio, se revisaron al microscopio buscando áreas en donde se encontraron las células tumorales y evitar tomar áreas donde no estuviera presente la lesión. Una vez localizadas las áreas de interés se puntaron con un marcador indeleble al menos tres secciones representativas para la construcción del TMA (figura 6).

Tipo histológico de las biopsias	Numero de muestras	% casos
Carcinoma ductal infiltrante	16	80
Carcinoma lobulillar infiltrante	2	10
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	1	5
Carcinoma mucinoso	1	5
Total	20	100

Tabla 5. Tipo histológico y número de muestras analizadas. En el cuadro se resumen las características histopatológicas de las muestras que fueron útiles para el presente estudio de un total de 20 a las cuales se les realizó el escrutinio patológico inicial.

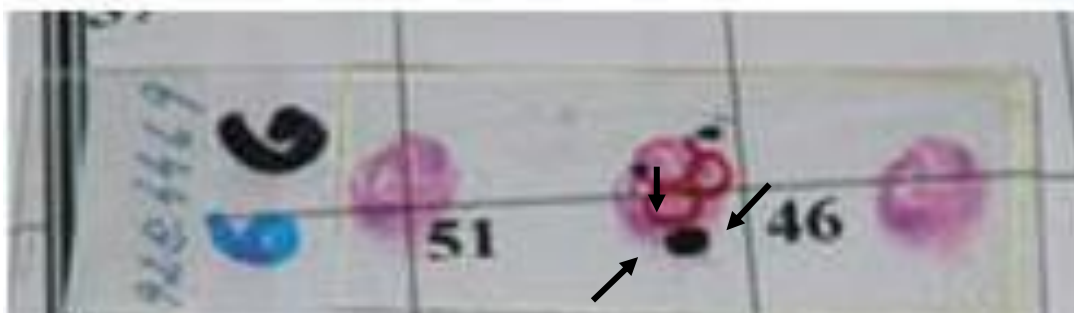


Figura 6. Selección de áreas con células neoplásicas teñidas con HE. Las flechas ejemplifican el área de las cuales se tomó una sección de tejido tumoral representativa para la construcción de los MATs.

2. Construcción de los microarreglos de tejidos (MATs)

Se elaboró un mapa que define el TMA, en el cual se organizaron 20 controles (tejido mamario no afectado, solo se depositó un cilindro por cada control) y de las 20 muestras se depositaron tres cilindros. De tal manera, que en el mapa 1 se arreglaron 60 cilindros de 20 muestras y 20 cilindros de los controles (figura 7). En la figura 7, se muestra el arreglo de los tejidos, en color gris se representan los

tejidos seleccionados previamente los cuales se arreglaron por columnas de arriba hacia abajo por triplicado. Se colocan también 4 controles positivos externos de tejido de próstata sano, ya que este tejido es positivo al anticuerpo que se va a utilizar. Los números dentro del círculo representan el número de muestra, los círculos amarillos representan los controles de tejido de mama normal y los círculos rojos representan el control positivo que expresa normalmente la proteína BRCA1.

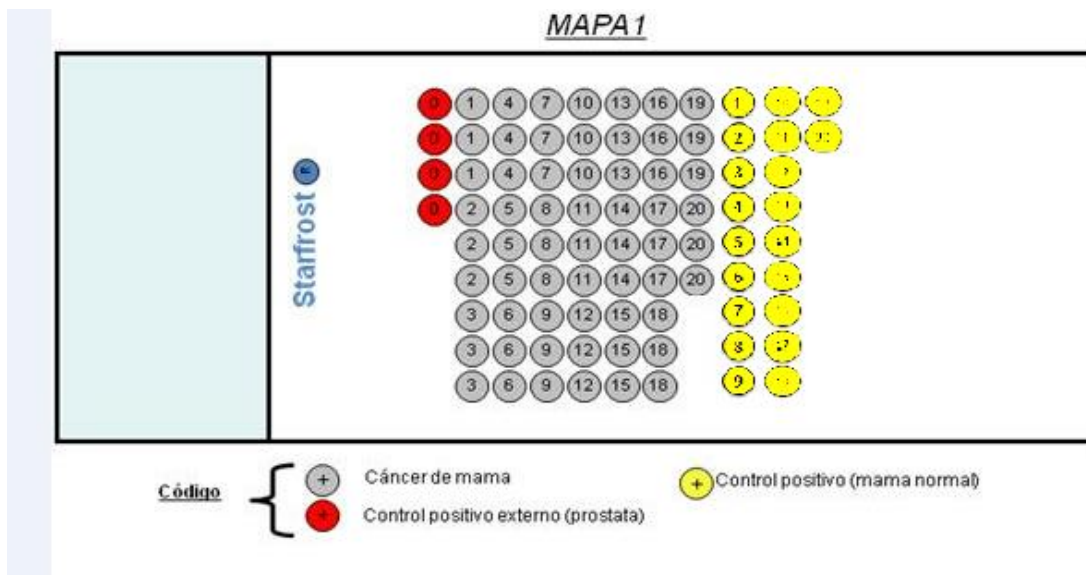


Figura 7. Mapa 1 del microarreglo de tejidos. En la figura se observa la localización de las muestras 1 a 20 en color gris, el número dentro del círculo se refiere al No. de la muestra. El color rojo representa control externo tejido de próstata sano y el amarillo representa los controles de tejido sano.

En base al mapa diseñado y una vez determinadas las áreas de interés en las laminillas, se procedió a la construcción de los TMA como se describió en material y métodos. En la figura 8, se muestra la construcción del TMA de tejido de cáncer de mama esporádico y tejido normal.

Se construyó un bloque, de las muestra 1 a la 20 (mapa 1), con los respectivos controles de tejido normal de mama y como control externo tejido prostático (figura 8). Los resultados muestran que la plataforma “Manual Tissue-Arrayer II” que se

utilizó para la construcción de los microarreglos permitió arreglar con precisión y exactitud las muestras de tejido mamario.

3. Obtención de laminillas

Una vez fabricado el bloque de los microarreglos, se procedió a hacer cortes de $3\mu\text{m}$ como se describió en material y métodos, del bloque se hicieron 5 cortes para estandarizar la inmunohistoquímica y determinar la expresión de la proteína BRCA1.

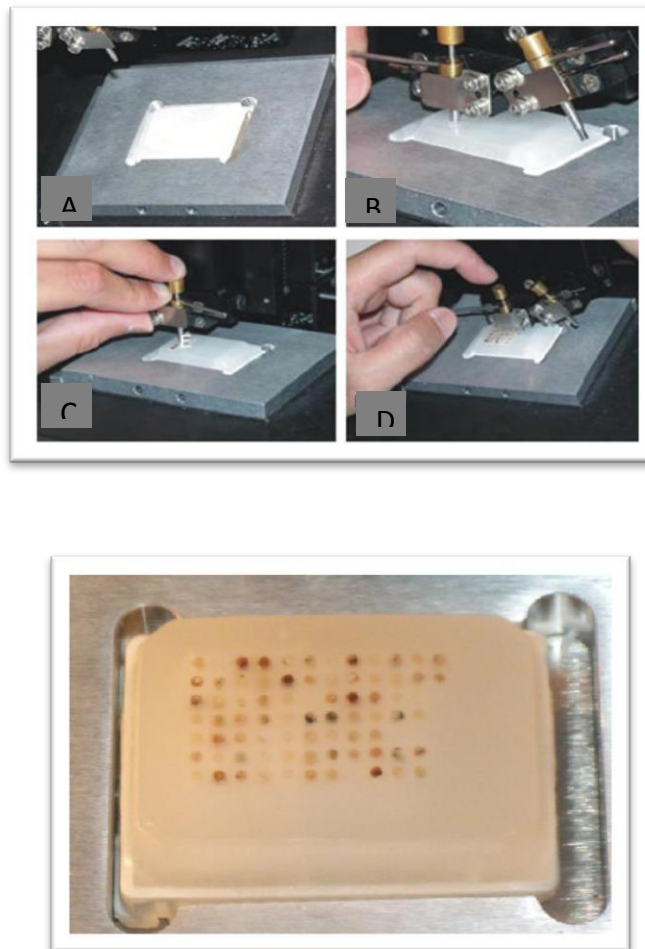


Figura 8. Construcción del MAT. (A) Se muestra el bloque receptor en el cual se insertaron las muestras. (B-C) Se muestran la formación de los orificios utilizando una aguja de 1mm y cómo se arreglaron en base a los mapas descritos previamente. En la imagen D se muestra la inserción de las muestras. En la imagen de abajo se ejemplifica un bloque de MAT terminado.

4. Detección de la proteína BRCA1 mediante inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se estandarizó en cortes de bloques completos de cáncer de mama y tejido no afectado en cortes de 4 μm , el anticuerpo que se utilizó fue Anti-BRCA1 (Calbiochem No. Cat.07-434). Se probaron las siguientes diluciones 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1000 de las cuales la mejor fue la dilución fue 1/100. Se utilizó el sistema ABC (Avidina-biotina) descrito en material y métodos. La figura 9 A-B, muestran la inmunotinción de un tejido de mama no afectado, donde se observa la expresión de la proteína BRCA1 en el núcleo (tinción de color pardo) principalmente en los ductos mamarios, mientras que las células que tienen el núcleo teñido de azul representan células que no expresan la proteína BRCA1. En la figura 9-C, se ejemplifica la inmunotinción de tejido de cáncer de mama, el cual no mostró expresión de la proteína BRCA1 en este caso todas la células mostraron tinción azul en su núcleo; en la figura 9-D se ejemplifica la expresión de la proteína BRCA1 en cáncer de mama.

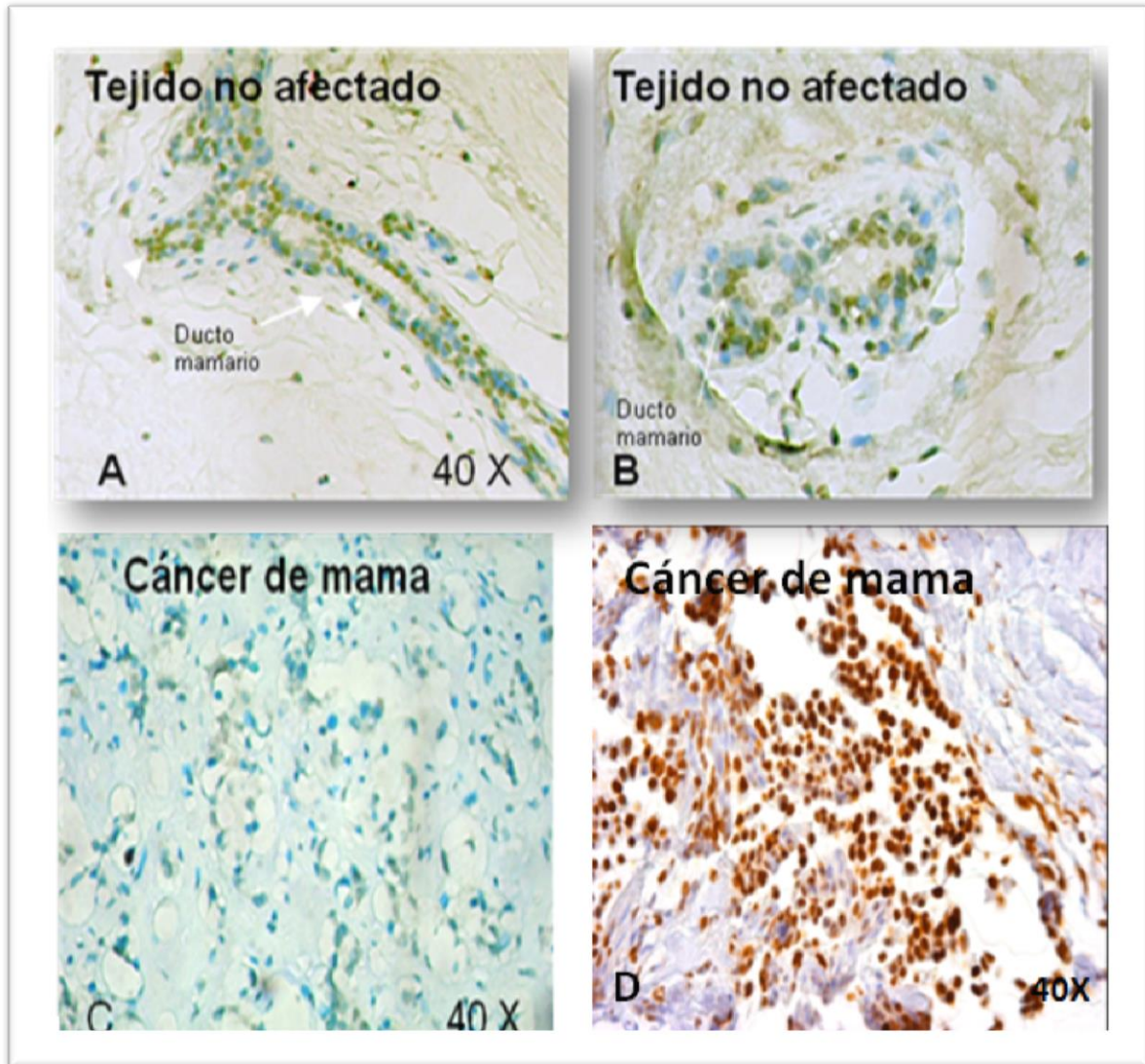


Figura 9. Inmunodetección de la proteína BRCA1 en tejido no afectado y neoplásico. En los paneles A-B se muestra la presencia de la proteína BRCA1 básicamente en los ductos mamarios. En el panel C se ejemplifica tejido neoplásico con ausencia de la proteína BRCA1 y en D se ejemplifica la expresión de la proteína en cáncer de mama.

Una vez estandarizada la inmunohistoquímica para el anticuerpo anti-BRCA1, se realizaron pruebas en las laminillas de los TMA con la dilución 1:100 y se utilizó un control de isotipo (IgG inespecífico) en la misma dilución, como se muestra en la figura 10. En la imagen del lado derecho, se ejemplifica la localización nuclear de BRCA1 en una muestra de cáncer mamario.

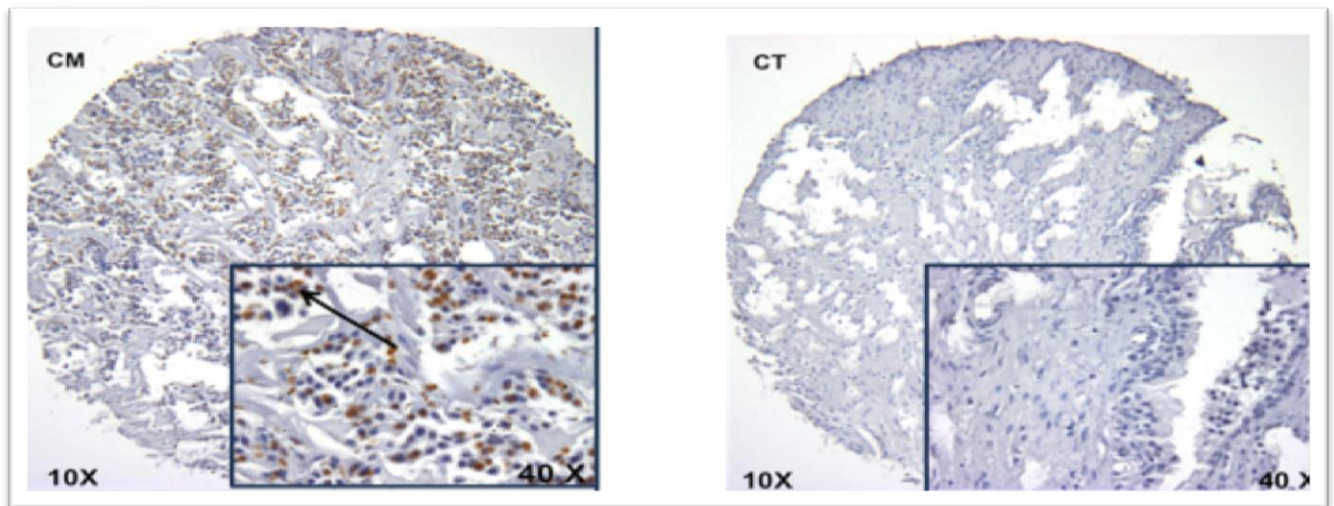
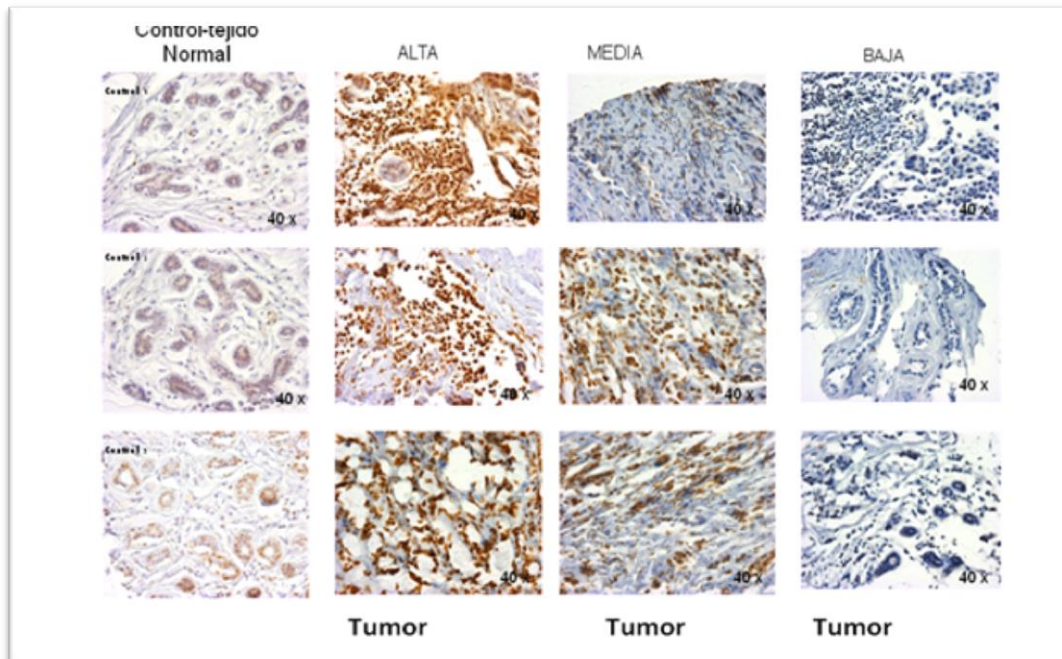


Figura 10. Inmunodetección de la proteína BRCA1 y control de isotipo en tejido mamario tumoral en los MATs. Se observa la presencia de la proteína BRCA1 en color pardo de localización nuclear (lado izquierdo, recuadro) en una biopsia de cáncer de mama y en el lado derecho el control negativo la ausencia de señal del anticuerpo anti-BRCA1 (1/100).

Posteriormente, se realizó la inmunohistoquímica en las laminillas de los MATs. En la figura 11 se ejemplifican los diferentes niveles de expresión (normal, baja, media y alta) detectados mediante la inmunohistoquímica. Se tomaron tres fotos por cilindro en un aumento de 40X de manera aleatoria. Es decir por cada muestra se digitalizaron nueve imágenes, en las cuales se realizó el análisis morfométrico de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos.



A B C D

Figura 11. Niveles de expresión de la proteína BRCA1 en tumores de cáncer de mama. Las imágenes muestran una tinción heterogénea correspondiente a la expresión de la proteína BRCA1. En A se muestra la presencia de la proteína BRCA1 en tejido normal; B se muestran tres diferentes tumores los cuales mostraron una tinción alta de la proteína BRCA1; C se muestran 3 tumores con una tinción media y D tres diferentes tumores en los cuales hay una baja tinción.

5. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas anti-BRCA1

Para el análisis morfométrico se seleccionó la imagen, la intensidad de luz, el área, la densidad integrada media, el IOD (densidad óptica integrada) y el número de objetos medidos con el objetivo óptico de 40X. Una vez establecidos los parámetros se determinó el área mediante un recuadro y se localizaron las células que expresaron la proteína BRCA1, por la detección de la unión positiva y específica de los anticuerpos. El programa detectó automáticamente todas las células que presentaron la reacción positiva (ver figura 12). Los IOD se generaron en un archivo de tipo Excel conteniendo todos los datos del análisis de la señal en las células analizadas.

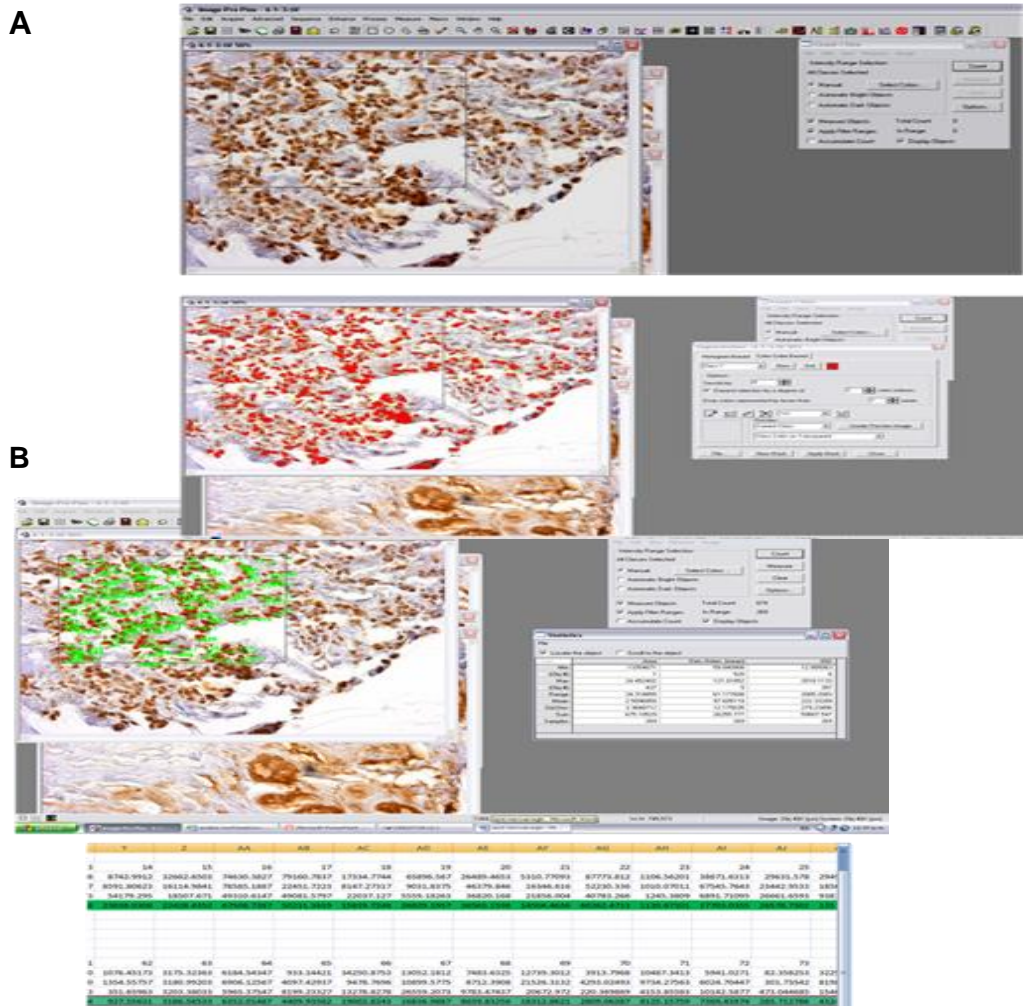


Figura 12. Análisis morfométrico de microarreglos de tejidos provenientes de muestras de cáncer de mama. (A) Se muestra en la parte superior un recuadro del área a analizar, se seleccionaron los núcleos que mostraron la tinción nuclear y en la parte inferior se muestra todas las células que mostraron la tinción en color rojo. **(B)** Se ejemplifica la generación de los datos de IOD ordenados en tabla.

Se realizó el análisis de la expresión de la proteína BRCA1 en los tumores con el IOD obtenido del análisis morfométrico de cada una de las tres imágenes capturadas, se realizó un promedio el cual se muestra en la tabla 5. Las muestras analizadas en las que se encontró una disminución en la expresión de la proteína BRCA1 se observan del lado derecho de la tabla, las cuales corresponden a carcinomas ductales infiltrantes etapa III y un carcinoma lobulillar etapa II, con un

promedio de edad de 55 años. Las muestras que presentaron una expresión normal de la proteína BRCA1 se presentan en las columnas centrales de la tabla, corresponden a carcinomas ductales infiltrantes etapa III, con un promedio de edad de 50 años y a tejidos mamaros no afectados adyacentes. Y las muestras que presentaron un sobre expresión de la proteína BRCA1, corresponden a carcinomas ductales infiltrantes etapa II y III, y un carcinoma lobulillar, descritas en las columnas del lado izquierdo de la tabla 6.

Sobre expresados		Normales		Sub expresados	
Muestra	IOD	Muestra	IOD	muestra	IOD
2	85785	3	4315	1	17237
4	36657	11	1121	9	0
5	79517	12	5959	10	33440
6	81242	13	437	15	15972
7	17627	14	7816	18	15840
8	76670	16	3051		
		17	2357		
		19	6418		
		20	2378		
		21	1316		
		22	6930		
		23	511		
		24	1647		
		25	5422		
		26	1388		
		27	196		
		28	928		
		29	3187		
		30	6352		
		31	4410		
		32	2809		
		33	8125		
		34	7369		
		35	286		
		36	6854		
		37	6675		
		38	6854		

		39	4671			
		40	751			

Tabla 6. Promedio de los IOD de las muestras analizadas. En el cuadro se presenta en tres columnas principales el nivel de expresión de la proteína BRCA1. En el lado izquierdo las sobre expresadas en una columna el número de muestra y en la subsecuente el promedio del IOD de las tres imágenes analizadas. En el centro se presentan las muestras en un rango normal y en el lado derecho las muestras que presentaron una sub expresión con referencia al promedio de los controles no afectados.

El nivel de expresión se determinó a través del cociente entre el IOD (Densidad Óptica Integrada) de las muestras, con respecto al IOD del tejido no afectado, y se transformó en \log_2 , de tal manera que los valores de sub expresión se observan negativos y superiores de 1 negativo, mientras que los sobre expresados son mayores de 1. Los tejidos con valores en un rango normal están comprendidos entre 1 negativo, pasando por cero hasta 1 en logaritmo base 2. Se graficó como se muestra en la figura 13. Tomando en cuenta para la gráfica solo los tejidos neoplásicos encontramos 20 muestras, donde podemos observar una disminución en la expresión de BRCA1 en 5 muestras (25%), sobre expresada en 6 muestras (30%) y en un rango normal en 9 tejidos (45%).

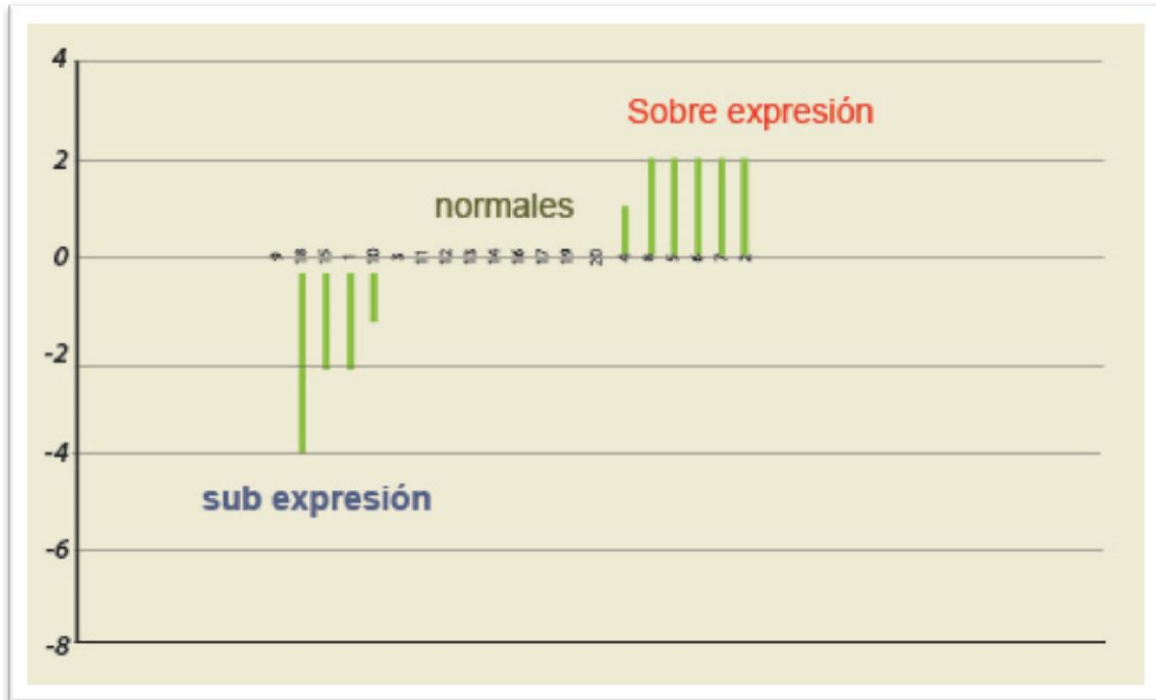


Figura 13. Expresión de la proteína BRCA1 representada en log2. Se muestran las 20 muestras analizadas, de las cuales 5 disminuyen su expresión, mientras que 9 fueron normales y en 6 aumentó la expresión de BRCA1 (barras verdes). Los números representan el número de tumor.

6. Extracción de DNA de tejidos mamarios

A partir de 100 mg de tejido se realizó la extracción de DNA de las 40 muestras, como se describió en materiales y métodos. En la figura 14 se muestra la separación electroforética en un gel de agarosa al 2%, de las muestras de DNA, las concentraciones DNA obtenidas van desde 187.6 ng/μl a 513.5 ng/μl, en un volumen final de 25 μl, con rango de pureza 1.50 a 2.29 (Tablas 7 y 8).

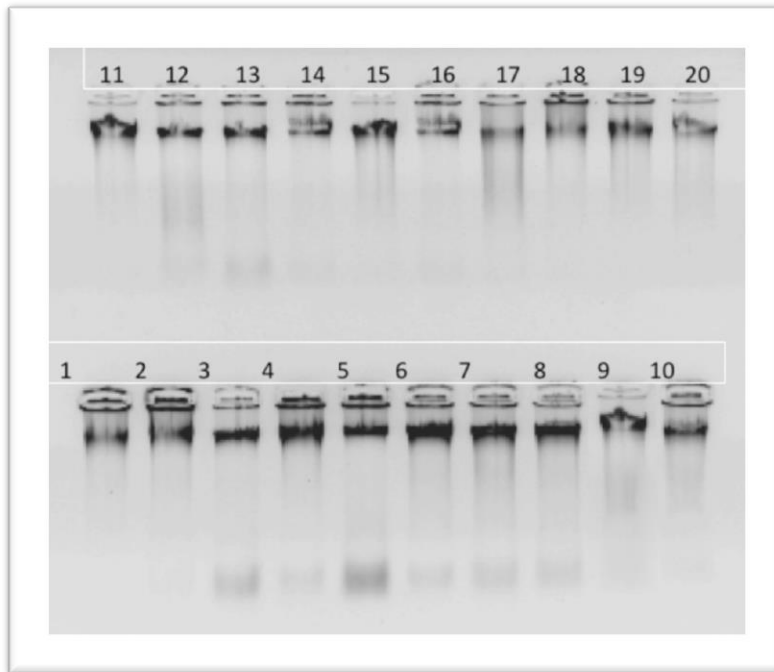
Muestra	Concentración (ng/μl)	Coficiente 260/280	Coficiente 260/230
1	451.6	1.67	2.29
2	404.9	1.64	2.31
3	332.9	1.68	2.12
4	252.2	1.65	2.24
5	296.9	1.64	2.28
6	529.2	1.68	2.26
7	258.5	1.83	1.97
8	120.2	1.79	1.71
9	227.7	1.66	2.22
10	728.9	1.82	1.99
11	532.5	1.71	2.02
12	63.3	1.75	1.79
13	102.5	1.75	1.95
14	76.5	1.86	2.27
15	71.2	1.72	1.89
16	66.2	1.78	1.80
17	35.7	1.50	1.73
18	129.7	1.69	2.18
19	101.1	1.71	2.18
20	513.5	1.81	2.23

Tabla 7. Concentración y pureza de las extracciones de DNA de los tejidos adyacentes de tejido mamario

Muestra	Concentración (ng/μl)	Coefficiente 260/280	Coefficiente 260/230
1	2710.3	1.81	2.34
2	319.6	1.91	2.04
3	382.2	1.95	2.04
4	957.6	1.88	2.16
5	187.6	1.88	2.17
6	1085.2	1.78	1.79
7	1751.1	1.82	2.31
8	2218.7	1.80	2.31
9	1531.2	1.82	2.28
10	1627.6	1.84	2.24
11	3065.7	1.76	2.25
12	3010.7	1.77	2.14
13	140.1	1.90	2.14
14	2241.3	1.80	1.96
15	1184.6	1.98	1.45
16	2059.5	1.81	2.05
17	969.5	1.94	1.77
18	2466.8	1.95	1.42
19	4673.9	1.72	1.48
20	400.5	1.75	1.60

Tabla 8. Concentración y pureza de las extracciones de DNA de los tejidos neoplásicos de tejido mamario

A)



B)

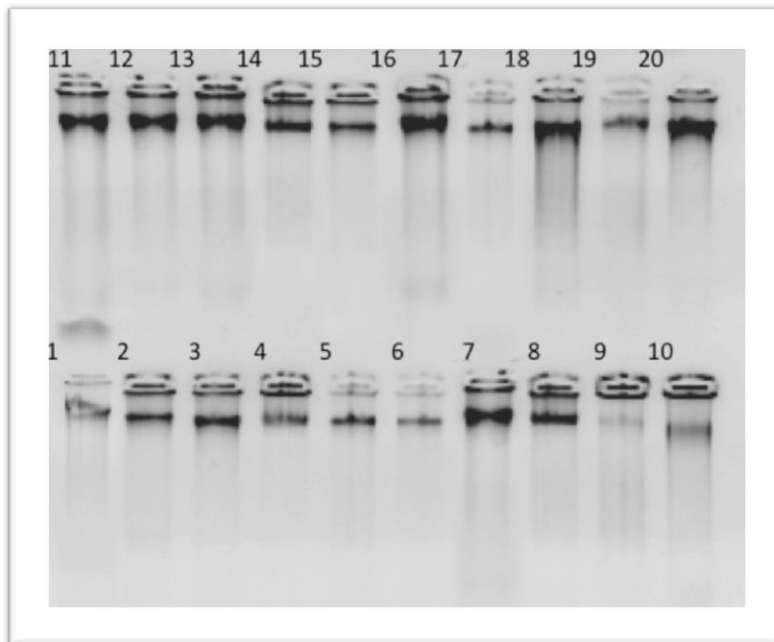


Figura 14. DNA genómico provenientes de tejido de mama. A) Se muestra el DNA obtenido de las veinte muestras de tejido neoplásico de mama. **B)** Muestra el DNA obtenido de los tejidos adyacentes de las veinte muestras.

7. Modificación de DNA por el método de bisulfito de sodio

La modificación del DNA por este método consiste de tres pasos que son: sulfonación, deaminación y desulfonación. Se realizó bajo el protocolo del EpiTectBisulfite Kit de QIAGEN. Una vez transformadas las muestras se llevó a cabo la cuantificación con Nano Drop. Teniendo un promedio de las concentraciones de DNA que van de 53.2 ng/μl a 84.5 ng/ μl. Con una pureza en promedio de 2.02 según el coeficiente 260/280 (Tablas 9 y 10).

Muestra	Concentración (ng/μl)	Coeficiente 260/280
1	81.7	2.15
2	66.3	2.14
3	50.0	2.15
4	7.1	1.64
5	54.7	1.99

Tabla 9. Concentración y pureza de las conversiones con Bisulfito de Sodio de las muestras de DNA de tejidos adyacentes de tejido mamario

Muestra	Concentración (ng/μl)	Coeficiente 260/280
1	53.2	2.20
2	69.3	2.18
3	60.6	2.12
4	59.6	2.17
5	84.5	2.12

Tabla 10. Concentración y pureza de las conversiones con Bisulfito de Sodio de las muestras de DNA de tejidos neoplásicos de tejido mamario

Como control negativo se utilizó DNA de linfocitos extraído de sangre periférica y DNA de la línea celular MCF-7, debido a que está reportado para ambos casos que no está metilada la región promotora del gen *brca1*. El DNA extraído fue también procesado con el KitEpiTectBisulfite.

Para la estandarización de la PCR se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican la región metilada del núcleo del promotor del gen *brca1*, -180 a +20 obteniendo un producto de 100pb. Los productos de amplificación por PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%. Este experimento se realizó con DNA humano metilado y convertido con bisulfito (EpiTect Control DNA, methylated de QIAGEN), que se utilizó como control positivo en las PCR donde se analizaron las muestras. En la figura 15 se observa en el carril 1 el DNA no metilado obtenido de sangre periférica y tratado con bisulfito como control negativo; en el carril 2 el DNA metilado y convertido con bisulfito de QIAGEN, donde se amplificó el producto esperado de 68 pb. En el carril 3 se observa el DNA sin tratamiento con bisulfito de sodio y el carril 4 representa una PCR sin DNA como controles negativos.

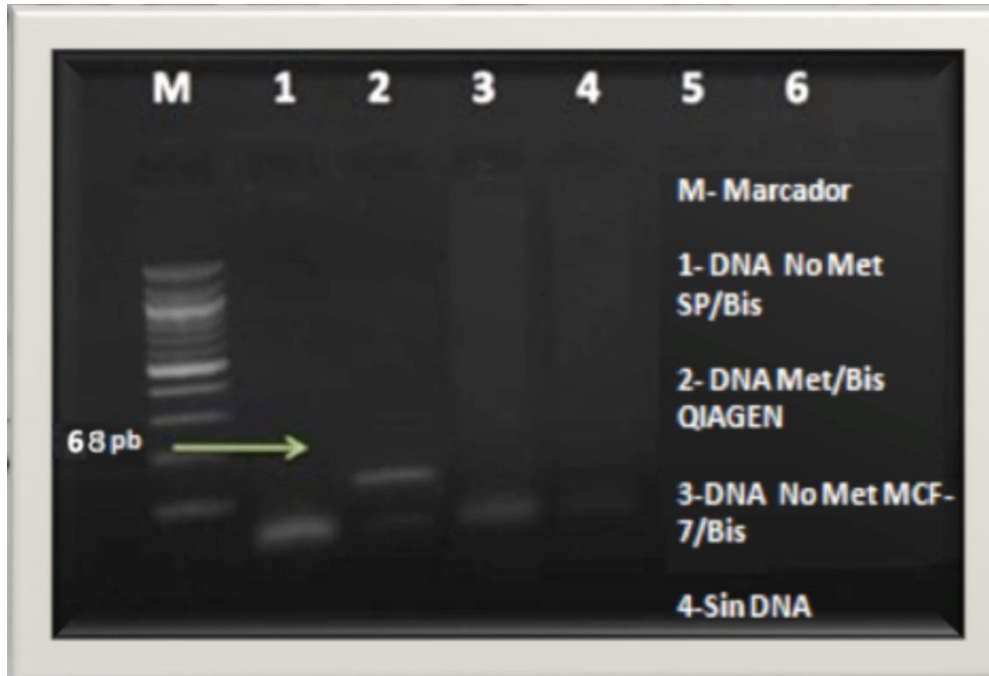


Figura 15. Reacción de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos que detectan el DNA metilado en el promotor del gen *brca1*. Se muestra la amplificación del DNA metilado y tratado con Bisulfito QIAGEN utilizando los oligonucleótidos que identifican la región metilada del promotor, en el carril 2. Marcador de peso molecular de 50 pb (M); carril 1, DNA de sangre periférica tratado (S/P) con bisulfito, carril 3, DNA de la línea celular MCF-7 con tratamiento y carril 4, control negativo sin DNA.

Una vez estandarizada la PCR con los oligonucleótidos que reconocen la región metilada del promotor *brca1*, se amplificó el DNA de las muestras previamente tratados con bisulfito de sodio, de los cuales dos tumores presentan la región del promotor metilado. Se observa la banda de 68pb en el carril 1 correspondiente al DNA metilado obtenido de la línea MCF-7 y en el carril 3 que es el control comercial. El carril 11 corresponde al tumor 9 y el carril 16 al tumor 6 (figura 16). A partir de estos resultados podemos concluir que un porcentaje bajo de nuestras muestras presentó metilación del gen *brca1*.

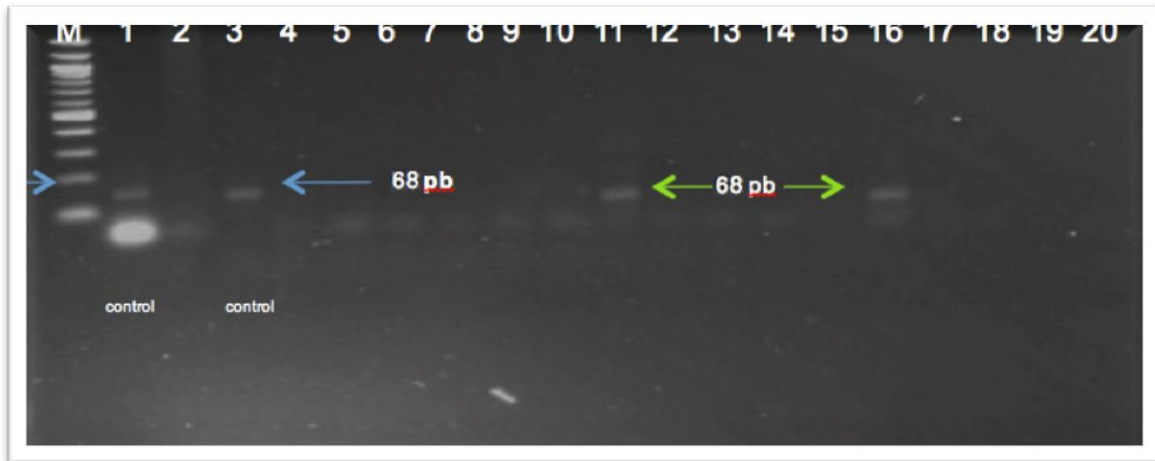


Figura 16. Identificación de la presencia de metilación en la región promotora del gen *brca1*. En el carril M se muestra marcador de peso de 50 pb, en el carril 1 y 3 control positivo de DNA metilado, carril 2 DNA sin tratamiento con bisulfito, carril 4-20 muestras de tumores. Los carriles 11 y 16 muestran los tumores donde detectamos la metilación en los cuales se observa el producto de PCR esperado de 68 pb.

En la figura 17 se muestra la correlación entre el estado de metilación y la expresión de BRCA1 en las 20 muestras analizadas. Con un punto rojo se destacan los tumores en los que se detectó el promotor del gen *brca1* metilado. La muestras que presentó sub expresión y metilación del promotor del gen *brca1* se encuentran identificadas con el número 9 que corresponde a un carcinoma ductal infiltrante etapa III. Finalmente la muestra que presento sobre expresión está identificada con el número 6, corresponde a un carcinoma ductal infiltrante etapa III.

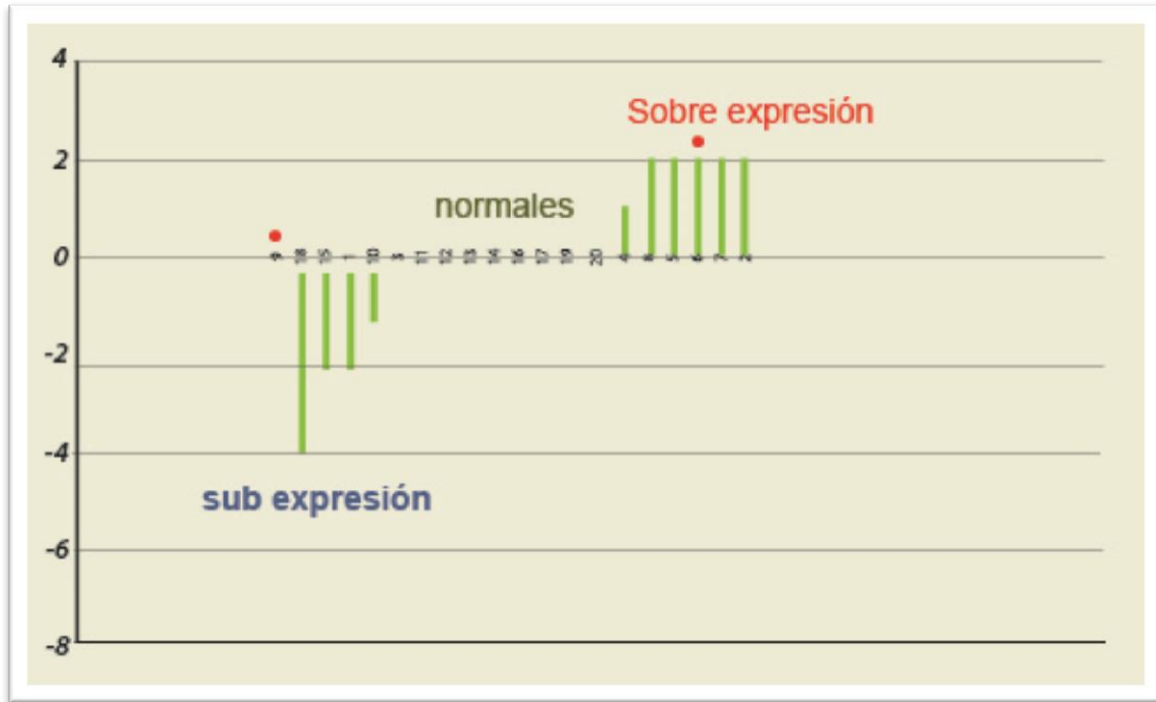


Figura 17. Correlación de la expresión de la proteína BRCA1 y el estado de metilación del promotor *brca1*. Se muestran en la gráfica las 20 muestras tumorales analizadas. (barras azules). Los números representan el número de tumor y los puntos rojos representan las muestras que se encontraron con el promotor metilado.

IX. DISCUSIÓN

De los registros que se revisaron se seleccionaron 20 muestras tumorales que cumplieron los criterios de inclusión, las cuales fueron analizadas por el patólogo y de éstas se obtuvo el DNA, se seleccionaron las áreas afectadas para construir los MATs. Nuestro MAT incluye un control positivo para la expresión de la proteína BRCA1, que fue tejido de próstata.

Una vez que se generaron las laminillas, estandarizamos las reacciones de inmunohistoquímica y determinamos que la dilución que mejor funcionó fue la de 1:100, tanto para el anticuerpo Anti-BRCA1 como para el control isotipo, encontrando que en el control de isotipo la reacción fue completamente negativa y no encontramos contaminación de fondo, cuando se utilizó el anticuerpo anti-BRCA1 encontramos que la expresión de la proteína BRCA1 fue exclusivamente nuclear tanto en los tejidos normales como en el tejido mamario neoplásico, es importante mencionar esto ya que hay reportes en los que evalúan la expresión de la proteína BRCA1 con diferentes resultados. Por ejemplo Taylor y col (1998). encontraron tinción citoplasmática y nuclear en la mayoría de los tejidos normales, Emad y col. (2008) encontraron una fuerte tinción nuclear en tejidos normales, lo cual correlaciona con lo que nosotros encontramos, cabe mencionar que en ambos se utilizó el mismo anticuerpo anti BRCA1. Todavía hay un debate en curso sobre la localización celular de la proteína BRCA1 en cáncer de mama y su importancia.

Al digitalizar y analizar las imágenes de los microarreglos de tejidos (MATs), nuestros resultados de la inmunotinción mostraron que el comportamiento de la expresión es heterogéneo a lo largo de las muestras analizadas, encontramos muestras que tuvieron una tinción alta, media o baja, una vez que obtuvimos los valores de intensidad, basados en el área y la densidad celular, a través de IOD sacamos un cociente del valor de expresión de los tumores respecto a nuestros tejidos no afectados (Tumor/no afectado) con lo que determinamos la expresión relativa a un promedio del valor de nuestros tejidos mamarios no afectados,

encontramos un 30% de muestras con sobreexpresión, un 45% de muestras en un rango de expresión normal y un 25% de las muestras con sub-expresión.

Nuestros resultados en cuanto a los niveles de expresión de la proteína BRCA1 mostraron una expresión heterogénea lo cual correlaciona con lo reportado por Miyamoto y col. ellos reportaron una sobre expresión en un 9% , una expresión disminuida de la proteína BRCA1 en un 62 % y una expresión normal de 29 % de un total de 21 muestras de tumor, Youko y col. en el 2000 encontraron que en un 32% de muestras de cáncer de mama esporádico no detectaron la proteína BRCA1 y en el 68 % de las muestras la detectaron. Estos resultados indican que la desregulación de la proteína BRCA1 juega un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama y puede servir como factor pronóstico.

El DNA que se obtuvo de los tejidos fue de calidad adecuada y en concentración suficiente para desarrollar los métodos. Pudimos corroborar que el tratamiento con bisulfito de las muestras de llevo a cabo correctamente mediante la conversión de C-T, al amplificar con los iniciadores diseñados para este fin. Ambos oligos diseñados para reconocer la región promotora del gen *brca1* dependiendo si sufrió cambios o no en la reacción de bisulfito; y así amplificar este fragmento. Si la muestra de DNA transformada con bisulfito de sodio amplifica con los oligos para la región metilada, indica que la muestra no sufre cambios en la secuencia de DNA durante la reacción de bisulfito por lo que el promotor de *brca1* se encuentra metilado, y por lo tanto la muestra no debe de amplificar con el par de oligos para la región no metilada. Si la muestra amplifica con los oligos no metilados, indica que la muestra sufre cambios en la secuencia de DNA por la reacción de bisulfito.

De tal manera que determinamos el estado de metilación en cada una de las muestras. Identificando dos tumores y nuestro control positivo de MCF-7 con metilación del núcleo del promotor del gen *brca1*.

El DNA de estos tumores que resultaron metilados uno se correlaciona con sub-expresión (tumor 9), y el DNA del tumor 6 que también está metilado sin embargo presenta sobre expresión de la proteína BRCA1. La MS-PCR mostró que de los 20 tumores solo 2 tumores mostraron metilación en la región promotora del gen *brca1*

(10%). Este porcentaje de metilación resulta más bajo de lo reportado por Dobrovic *y col.*; ellos reportan 22% de metilación. Catteau *y col.* en 1999 reportaron un 11% de metilación en la región promotora del gen *brca1* de sus muestras con sub-expresión de la proteína BRCA1. El tumor 9 que correlaciona el estado de metilación con la una sub-expresión, coincide con los resultados esperados, en donde podemos decir que posiblemente existe silenciamiento por metilación de los dos alelos en su región promotora. En lo que respecta al tumor 6 encontramos el DNA metilado, sin embargo, encontramos sobre-expresión de la proteína, lo cual es contradictorio a lo esperado, aunque coincide con lo reportado en la literatura, Minjie *y col.* (2005). Sugiere que esta sobre expresión se deba a la metilación aberrante en las islas CpG del promotor del gen *brca1*. Sin embargo nuestros resultados en los tumores analizados que mostraron una disminución de la proteína BRCA1, se podría explicar por los siguientes mecanismos: a) alteración de los mecanismos de transcripción, el que se ha reportado que la proteína p53 puede inhibir a un factor de transcripción con E2F el cual interactúa con *brca1*, b) por transferencia transcripcional, se sabe que el gen *brca1* tiene un promotor bidireccional que regula a *brca1* en dirección 5'-3' y 3'-5' al gen *nbr2*, de tal manera que se ha reportado que cuando existe sobre expresión de NBR2 este inhibe la expresión de BRCA1. Finalmente nuestros resultados muestran que la metilación del promotor del gen *brca1* es un evento poco común en los tumores de las pacientes con cáncer de mama esporádico.

X. CONCLUSIONES

1. Los datos obtenidos mediante TMA muestran que 5 tumores (25%) presentan una disminución de la expresión de la proteína BRCA1. El 30% de los tumores (6 muestras) mostraron un aumento en la expresión de BRCA1, mientras que el 45% (9 casos) presentaron una expresión normal con respecto a los controles sanos.
2. De las 20 muestras de cáncer de mama analizadas, solamente dos (10%) mostraron hipermetilación aberrante en la región promotora del gen *brca1*. De los cuales solamente uno de ellos presentó una disminución en la expresión de la proteína BRCA1.
3. Los datos obtenidos en el presente proyecto muestran que la metilación del promotor del gen *brca1* es un evento poco común en los tumores de las pacientes mexicanas con cáncer de mama esporádico.

XI. Bibliografía.

- Allis CD, Junuwein T, Rinberg D. Overview and Concepts. En: Allis CD, Junuwein T, Rinberg D, Editors. Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007;23-61.
- American Cancer Society (ACS); 2012. Cancer Facts and Figures; Atlanta, Ga; American Cancer Society. Consultado en: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>
- Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. En: Allis CD, Junuwein T, Rinberg D, Editors. Epigenetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007;457-475.
- Biesecker BB, Boehnke M, Calzone K et al. Genetic counseling for families with inherited susceptibility to breast and ovarian cancer. JAMA, 1993; 269:1970-4.
- Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E; 1999; Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. Division of Medical and Molecular Genetics, UMDS, Guy's Hospital, London, UK. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't
- Crook, T., Crossland, S., Crompton, M.R., Osin, P. & Gusterson, B.A. (1997) p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer. *Lancet*, **350**: 638-9.
- Deng X. C. (2006) BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research*. **34**:1416-1425.
- Dobrovic, A. & Simpfendorfer, D. (1997) Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* **57**: 3347-50.
- Emad A. Rakha M.D., Somaia E., El-Sheikh M.Sc., Mona A. Kandil M.D., Maysa E. El-Sayed M.D., Andrew R., Green, Ian O. Ellis FRCPath

- (2008) Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Human Pathology*. **39**:857-865
- Easton, D., Ford, D. & Peto, J. (1993) Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv*. **18**: 95-113.
 - Easton, D.F., Steele, L., Fields, P., Ormiston, W., Averill, D., Daly, P.A., McManus, R., Neuhausen, S.L., Ford, D., Wooster, R., Cannon-Albright, L.A., Stratton, M.R. & Goldgar, D.E. (1997) Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet*. **61**: 120-8
 - Esteller M., Silva J M., Dominguez G., Bonilla F., Matias G., X., Lerma E., Bussaglia E., Prat J., Harkes C., Repasky E., Gaglielson E., Schutte M., Baylin S., S., Herman J,. (2000) Promotor Hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic Breast and Ovario Tumor. [J Natl Cancer Inst](#). **92**:564-569
 - Hanahan D. Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. The Next Generation; Cell. 2011; 144:646-674.
 - Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci*. **93**: 9821-9826.
 - Instituto Nacional de Estadística Y Geografía (INEGI). 2012 Consultado en : <http://www.inegi.org.mx/default.aspx>
 - Jones P. A., Baylin S B. (2007) The epigenomics of cáncer. Cell **128**:683-692
 - Karpf AR. Epigenomic reactivation screening to identify genes silenced by DNA hypermethylation in human cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2007;9: 231-241.
 - Kasper Dennis L., Braunwald Eugene, Hauser Stephen, Longo Dan, Larry Jamenson, Fauci Anthony. Harrison's Principals of Internal Medicine 16th Edition, McGraw-Hill Professional, 2004.

- Klug W, Cummings M. (1999). Conceptos de genética. 5ª edición. Editorial Prentice Hall. Madrid España. Páginas 625-643.
- Koonin, E.V., Altschul, S.F. & Bork, P. (1996) BRCA1 protein products ... Functional motifs. *Nat Genet.***13**: 266-8.
- Lodish, H. ; Biología celular y molecular; 2005, 5ª Edición, Editorial Médica Panamericana; México. 973pp
- Lozano R, Knaul FM, Gómez-Dantés H, Arreola-Ornelas H, Méndez O. Tendencias en la mortalidad por cáncer de mama en México, 1979-2006. Observatorio de la Salud. Documento de trabajo. Competitividad y Salud, Fundación Mexicana para la Salud, 2008.
- Martín de Civetta, MT, Civetta, JD; 2011; Carcinogénesis, artículo de revisión. Salud Pública de México. Volumen 53, No.5; Septiembre-Octubre de 2011. Pp 405-414.
- McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* 2006;66: 3541-3549.
- Minjie Wei, Tatyana A. Grushko, James Dignam, Fitsum Hagos, Rita Nanda, Lise Sveen, Jinhua Xu, James Fackenthal, Maria Tretiakova, Soma Das, and Olufunmilayo I. Olopade. BRCA1 Promoter Methylation in Sporadic Breast Cancer Is Associated with Reduced BRCA1 Copy Number and Chromosome 17 Aneusomy *Cancer Res* 2005; 65: (23). December 1, 2005
- Muller C.,R.,Roskelley C.,D.,(2002)Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cáncer. *Breast Cancer Res*, **5**:45-52.
- Molinero Casares, MM. Análisis de las lesiones biopsiadas en la ronda inicial de un programa de cribado poblacional de cáncer de mama. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga, Facultad de Medicina. 2002.
- National Breast Cancer Organization (NCBO), 2004. Consultado en: <http://www.abcdbreastcancersupport.org/2012/10/abcd-mentors-former-y-me-peer-counselors-team-up/>

- Narod S, Foulkes D. (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and Beyond. *Nature Rev Cancer*. 4:665-676.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2008. ¿Aumenta o disminuye el número de casos de cáncer en el mundo? Consultado en: <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2012. Cáncer; nota descriptiva No. 297, Febrero 2012. Consultado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical application. *CMAJ* 2006;174:341-348.
- Rodríguez-Cuevas S, Macías C, Labastida S. Cáncer de mama en México: ¿enfermedad de mujeres jóvenes? *GinecolObstMéd* 2000;68(5):185-190.
- Rodríguez-Cuevas S, Capurso-García M. Epidemiología del cáncer de mama. *GinecolObstMéd* 2006;74:585-93.
- Rubio Misas, José Pilar, 2003. Tesis doctoral. Analisis del programa de detección precoz del cáncer de mama en Jaén y del carcinoma de intervalo de Andalucía. Universidad de Málaga Facultad de Medicina.
- Sandoval-Esquivel MA, 2010. Determinación del patrón de metilación del promotor del gen brca1 en cáncer de mama en población mexicana. Tesis en Maestría en Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Simak Ali & R. Charles Coombes Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews Cancer* 2, 101-112 (February 2002) | doi:10.1038/nrc721
- Strand L. F.,(1982)Fisiología humana, un enfoque hacia los mecanismos reguladores.
- Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N. & Freemont, P.S. (1996) Does this have a familiar RING?. *Trends Biochem Sci*.21:208-214.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J. & Livingston, D.M.(1997) Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*.90:425-35.

- Shames DS, Girard L, Gao B, Sto M, Lewis CM, Shivapurkar N, Jiang A *et al.* A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med* 2006;3(12):e486.
- Sullcahuamán-Allende, Arias-Velasquez. Cancer de mama y ovario hereditario. Simposio sobre genética ginecológica y obstetricia. Revista peruana de Ginecología y obstetricia. 2008; 54:194-198.
- Taylor J., Lymboura M., Pace P.E., et al (1998) An important role for BRCA1 in breast cancer progression is indicated by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. *Int J Cancer*. **79**:334-3342.
- Tavtigian, S.V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Berry, S., Bogden, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J.F., Goldgar, D.E. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet*. **12**:333-337.
- Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome—components and functional correlates. *Genes Dev* 2006;20:3215-3227.
- Valdespino, V.; Valdespino C. 2008. Mecanismos epigenéticos celulares y sus alteraciones en cáncer. GAMO, Vol. 7 No. 3:80-92.
- Valgerdur B, Stefansson O, Bodyarsdottir S, Hilmarsdottir H, Jonasson J, Eyfjord J; 2006. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research*. 8 (4):1-10
- Youko Niwa, Tetsunari Oyama, Takashi Nakajima, 2000, BRCA1 Expression Status in Relation to DNA Methylation of the BRCA1 Promoter Region in Sporadic Breast Cancers, *Cancer Science*, Volume 91, Issue 5, pages 519–526, May 2000
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007;302:1-12.