



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA DNMT- 3B Y SU ISOFORMA 3B1
EN MUESTRAS DE TEJIDO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA
POR PCR EN TIEMPO REAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A

ARIANA GARCÍA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS
M EN C. MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ

ASESORA INTERNA
BIOL. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ



CDMX

AGOSTO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de citogenética y Biología molecular del hospital Juárez de México.

NDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	4
II. Marco teórico	6
2.1 Generalidades del cáncer.....	7
3.- Cáncer de mama (CM).....	8
4.- Epidemiología e incidencia.....	9
4.1 Morbilidad y mortalidad Mundial del CM.....	9
4.2 Morbilidad y mortalidad en México	10
5.- Etiología del CM.....	13
5.1. Factores de riesgo controlable	13
5.1.2 Factores de riesgo no controlables	14
6.- Factores de supervivencia y progresión de la célula tumoral mamaria.....	15
6.1 Receptores esteroideos.....	15
6.1.1 Conceptos básicos	15
6.1.2 Estrógeno y Receptor de estrógenos	16
6.1.3 Progesterona y Receptor de progesterona.....	16
6.2 Receptores de factores de crecimiento	17
6.3 Significado de los Factores de supervivencia y progresión en los resultados de análisis	17
7.- Clasificación del cm	18
8.- Estadificación del cm	18
8.1 Sistema TNM.....	19
9.- Epigenética	19
9.1 Epigenética en CM	22

9.2 Metilación del ADN	23
9.2.1 Metilación del ADN: Su papel en la carcinogénesis	24
9.3.- Efectos de la metilación del ADN	25
10.- DNA METILTRANSFERASAS (DNMT'S)	26
10.1 DNMT1	28
10.2 DNMT2 (TRDMT1)	29
10.3 DNMT3	29
10.4 Sobreexpresión de las DNMT's en cáncer	33
10.5 DNMT's y CM	33
11.- MODELOS EXPERIMENTALES DE CM IN VITRO	33
12.- PCR en tiempo real	34
III. Antecedentes	36
IV. Planteamiento del problema	38
V. Justificación	40
VI. HIPOTESIS	42
VII. Objetivos	44
Objetivo general	45
Objetivos particulares	45
VIII. Material y métodos:	46
8.1 Población de estudio	47
8.1.2 Criterios de inclusión	47
8.1.3 Criterios de exclusión	47
8.2 Diagrama de trabajo	48
8.3 Recolección de muestras	49

8.4 Extracción de ARN	49
8.5 Cuantificación de los ácidos nucleicos (ARN) e Integridad de ARN.....	50
8.6 Conversión de ARN a ADN complementario (ADNc)	50
8.7 Cuantificación de ADNc.....	51
8.8 Verificación de primers	51
8.9 Amplificación de DNMT3B y su isoforma en línea celular MDA-MB-231 por PCR en punto final	53
8.10 Amplificación de las muestras por PCR en tiempo real con SYBR® Green..	55
8.10.1 Cuantificación relativa normalizada	55
8.10.2 Método $\Delta\Delta CT$	57
8.11 Prueba estadística.....	57
 IX. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	 58
9.1 Datos clínicos de las pacientes	59
9.1.2 Estadio clínico y tipo de cáncer	61
9.1.3 Receptores esteroideos y de factor de crecimiento.....	63
9.2 Cuantificación de ARN	64
9.3 Cuantificación de ADNc.....	65
9.4 Integridad del ARN muestras y controles	65
9.5 Verificación de Primers.....	67
9.6 PCR en punto final de GAPDH y DNMT3B en la línea celular MDA-MB-231	71
9.7 Amplificación por PCR en tiempo real.....	73
9.8 Amplificación por PCR en tiempo real de muestras y controles con el gen de referencia GAPDH.....	77
9.9 Amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 por PCR en tiempo real de muestras y controles y su cuantificación	79
9.10 Correlación de la expresión de la DNMT's 3b y 3b1 con los datos	81

X. Conclusiones	83
XI. Perspectivas	85
XII. Anexos	87
Anexo 1. Consentimiento informado gradual para la realización de estudios.	88
Anexo 2. Cuestionario de cáncer de mama	89
XIII. Bibliografía	93

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sistema TNM.....	20
Tabla 2. Clasificación por estadios del CM.....	21
TABLA 3. Secuencia y número de acceso de oligos	51
Tabla 4. Temperatura de “Melting” Primers.....	52
Tabla 5. Hidratación de primers	53
Tabla 6. Condiciones del termociclador para PCR de las DNMT's.	54
Tabla 7. Condiciones del termociclador para GAPDH.....	54
Tabla 8. Condiciones del termociclador para PCR de DNMT'S	56
Tabla 9. Condiciones del termociclador para PCR GAPDH	56
Tabla 10. Datos clínicos de las pacientes	59
Tabla 11. Estadio clínico y tipo de cáncer	62
Tabla 12. Receptores esteroideos y de factor de crecimiento.....	63
Tabla 13. Homo sapiens ADN (citocina-5-)-metiltransferasa 3 beta.....	69
Tabla 14. GAPDH (Glyceraldehido-3-Fosfato-Deshidrogenasa).....	70
Tabla 15. Características fisicoquímicas de los primers.....	71
Tabla 16. Estadio clínico y características histopatológicas de los casos	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Mortalidad por tumores malignos según el sexo y tipo de tumor en.....	8
México.....	8
Figura 2. Anatomía de la mama.....	9
Figura 3. Incidencia de cáncer de mama en hombres y mujeres del año 2007 al 2014.....	10
Figura 4. Incidencia de cáncer de mama por grupo de edad (2014).....	11
Figura 5. Distribución porcentual de defunciones por cáncer de mama (2013). ...	12
Figura 6. Metilación del ADN.....	24
Figura 7. Representación de la metilación en células tumorales y normales.....	25
Figura 8. Mecanismo de metilación por enzimas DNMT's.....	27
Figura 9. Clasificación de las DNMT's.....	28
Figura 10. Localización de la DNMT3B en el genoma.....	31
Figura 11. DNMT3B Y SUS VARIANTES	32
Figura 12. Diagrama de trabajo.....	48
Figura 13. Integridad del ARN de los 8 casos.....	66
Figura 14. Integridad del ARN de los 8 controles.....	67
Figura 15. Tamaño de amplificación de GAPDH, DNMT3B y su isoforma DNMT3B1.....	72
Figura 16. Normalización DNMT3B y su isoforma.....	74
Figura 17. Normalización gen de referencia GAPDH	75

Figura 18. Amplificación de GAPDH en 8 controles por PCR en tiempo real.....	77
Figura 19. Amplificación de GAPDH en muestras con cáncer de mama por PCR en tiempo real.....	78
Figura 20. Amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 en controles por PCR en tiempo real.	79
Figura 21. Amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 en 8 muestras CM por PCR en tiempo real.	80

ABREVIATURAS

CM	Cáncer de mama
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DNMT'S	Metiltransferasas del ADN
DNMT1	ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1
DNMT3B	ADN (citosina-5)-metiltransferasa 3beta
WHO	Organización Mundial de la Salud
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
RE	Receptor de estrógenos
ER α	Receptor de estrógenos alfa
Er β	Receptor de estrógenos beta
IGF	Factor de crecimiento insulínico
TGF- β	factor de crecimiento transformante β
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
HER-2	Factor de crecimiento epidérmico tipo 2
TNM	Tumor (T), ganglios linfáticos (N) y metástasis a distancia (M)
TRDMT1	ARNt metiltransferasa del ácido aspártico
PBS	Buffer Fosfato Salino
RPM	Revoluciones por minuto
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
DNTP'S	Desoxirribonucleótidos trifosfato
Ct	Ciclo umbral
EC	Estadio clínico

RESUMEN

Introducción: El cáncer de mama (CM) en México es la primera causa de mortalidad por tumores malignos en mujeres mayores de 35 años, su etiología aún es desconocida, pero se sabe que los mecanismos genéticos y epigenéticos están involucrados en la transformación de las células a neoplásicas, los diferentes mecanismos epigenéticos provocan que se modifique la expresión de varios genes involucrados en procesos como; el ciclo celular, apoptosis y diferenciación, etc. Este mecanismo puede ser reversible, por lo que se convierte en un blanco potencial para la intervención terapéutica y para el desarrollo de estrategias de prevención tumoral. El ADN se metila con la ayuda de las metiltransferasas del ADN (DNMT'S), un miembro de esta familia es DNMT3B, el cual se reportó que incrementa su expresión en varios tejidos y líneas celulares con cáncer, silenciando varios genes. Objetivo principal: analizar la expresión de la DNMT3B y su isoforma 3B1 en muestras de tejido mamario por PCR en tiempo real. Material y Métodos: Se utilizó la línea celular MDA-MB-231 para verificar la especificidad de los primers, además de realizar un análisis bioinformático para verificar el tamaño del producto de PCR. La PCR en tiempo real se realizó utilizando como marcador fluorescente (SYBR® Green) y al gen GAPDH como gen de referencia. Resultados: El análisis del PCR *in silico* mostró que los primers eran específicos y se podrían analizar las dos isoformas simultáneamente (DNMT3B y 3B1), también se demostró que DNMT3B y su isoforma se expresan en la línea celular MDA-MB-231. Posteriormente se realizó el RT-PCR en tiempo real de 16 muestras; 8 con CM y 8 controles, para llevar a cabo la cuantificación se realizó la normalización de muestras, se obtuvo una eficiencia de amplificación de más del 90% para DNMT3B y GAPDH, respectivamente. Todas las muestras presentaron amplificación para GAPDH, en los casos entre los ciclos 23 y 29 y en los controles entre el 15 y 20, cuando el gen de referencia está presente, se realizó la amplificación de la DNMT3B y su isoforma en las 16 muestras, obteniéndose que en los controles no se mostró amplificación y en los casos con CM amplificaron solo 4/8 muestras todas antes del ciclo 40, los cuales se muestra que estaban subexpresados, además no se pudo establecer la correlación entre la expresión de las DNMT-3b y su isoforma con los receptores de estrógeno, progesterona y

Her2/Neu. Conclusiones: Se observó diferencias significativas en la expresión de la DNTM-3B y 3B1 en pacientes con cáncer de mama con respecto el grupo control, sin embargo no se logres establecer correlación con características clínicas, debido al número reducido de pacientes.

I. INTRODUCCIÒN

En la actualidad el cáncer es una de las principales prioridades en salud pública, debido a su frecuencia y mortalidad. El cáncer de mama (CM) es el más frecuente en mujeres mayores de 30 años (WHO, 2012) y es el segundo más común en el mundo, el cual se ubica como la quinta causa de muerte en general a nivel mundial (522.000 muertes, Globocan, 2012). De acuerdo a la secretaria de salud (2013) en México el CM, es la primera causa de mortalidad por tumores malignos en las mujeres y constituye la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años (Knaul FM y Col, 2009).

La etiología de esta enfermedad todavía es desconocida, pero ya se han identificado algunos factores de riesgo, entre los cuales se encuentran factores genéticos y factores epigenéticos (Breast Cáncer Organization, 2013). Estos últimos son heredables y reversibles, producidos por el entorno y provocan que los genes modifiquen su expresión, sin que se modifique su secuencia de ADN (Martínez F, 2011). El cambio epigenético más frecuente e importante es la metilación del ADN ya que juega un papel crucial en el mantenimiento de la expresión de genes de las células (Veeck J y Esteller M, 2010). Las enzimas responsables de la metilación del ADN son denominadas metiltransferasas del ADN (DNMT'S) las cuales se clasifican en DNMT's de *novo* (DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L) y DNMT's de mantenimiento (DNMT1). Se sabe que la metilación aberrante del ADN ha sido identificada como un factor importante en la carcinogénesis (Lim SP y Col, 2011). En cuanto a los cambios epigenéticos asociados con el fenotipo celular tumoral, estos son: graduales, progresivos y eventualmente reversibles; corresponden a alteraciones en la expresión de los genes relacionados con la transformación celular, principalmente al silenciamiento de la expresión de los genes supresores tumorales por lo que dichas características hacen que las alteraciones epigenéticas sean un blanco potencial, para la intervención terapéutica y para el desarrollo de estrategias de prevención tumoral, al activar o reprimir la transcripción de genes específicos (Valdespino M y Valdespino E, 2012).

II. MARCO TEÒRICO

2.1 Generalidades del cáncer

El término cáncer o neoplasia maligna, es un término genérico utilizado para diferenciar un grupo de más de cien enfermedades que comparten ciertas características (Gabriel J, 2007). Este conjunto de enfermedades tienen en común un proceso por el cual una o más células se independizan de los mecanismos que regulan la proliferación normal de una célula, adquiriendo cambios que la separan de la autorregulación intrínseca normal y las interacciones con su entorno (Abeloff y Col, 2005), presentan crecimientos desregulados y una potencial diseminación a otras partes del cuerpo (Córner J y Bailey C, 2008). Cuando una célula anormal no prolifera, no produce daño alguno en el organismo, sin embargo cuando su proliferación se encuentra fuera de control se dice que produce un tumor o neoplasma. Un tumor es un conjunto de células que crecen sin control alguno y se pueden clasificar en dos grupos: benigno, si el neoplasma permanece agrupado en una sola masa celular y maligno, si las células que conforman el neoplasma tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes (un tumor se considera canceroso solo si es maligno) (Alberts y Col, 1993). A su vez, los tumores malignos se dividen en dos grupos: Sarcomas (los de origen mesenquimal) y carcinomas (los de origen epitelial) (Phillip R, 2002).

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial. Se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012. Los principales tipos de cáncer son: pulmonar (1,59 millones de defunciones), hepático (745 000 defunciones), gástrico (723 000 defunciones), colorrectal (694 000 defunciones) y mamario (521 000 defunciones) (WHO, 2012). En México es la tercera causa de muerte. En las mujeres la causa principal de mortalidad por cáncer es el de mama, seguido por el cervico uterino y en el caso de los hombres la principal causa es el de próstata seguido por el de pulmón, Figura 1 (INEGI, 2013)

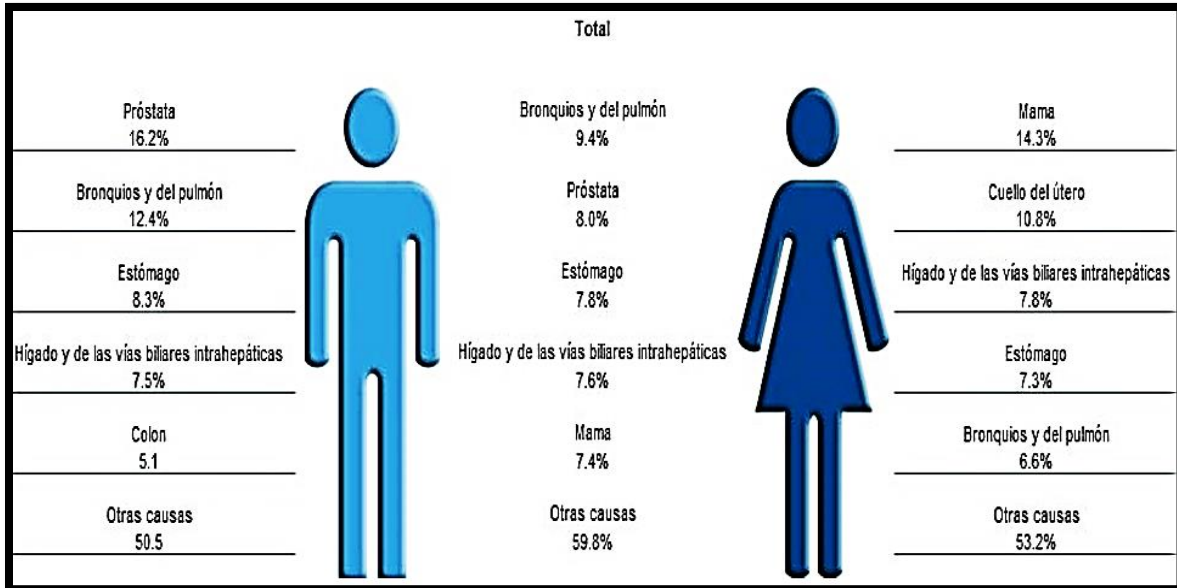


Figura 1 . Mortalidad por tumores malignos según el sexo y tipo de tumor en México.

Tomado y modificado de:

<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/muertos0.pdf>

3.- CÁNCER DE MAMA (CM)

El CM es un tumor maligno que se origina en las células de la mama. Esta enfermedad ocurre casi exclusivamente en las mujeres, pero los hombres también la pueden presentar aunque la frecuencia es más baja (Breast Cancer Organization, 2013).

Para abordar el tema de CM, es necesario conocer algunas partes básicas de la estructura normal de la mama. La mama es un órgano que se ubica en la parte anterior del tórax sobre el músculo pectoral mayor y a cada lado del esternón (Hultborn KA y Col, 1955), consiste principalmente de lobulillos (glándulas productoras de leche), conductos (tubos diminutos que llevan la leche desde los lobulillos al pezón) y estroma (el tejido adiposo y el tejido conectivo que rodean los

conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. (Breast Cancer Organization) (Figura 2).

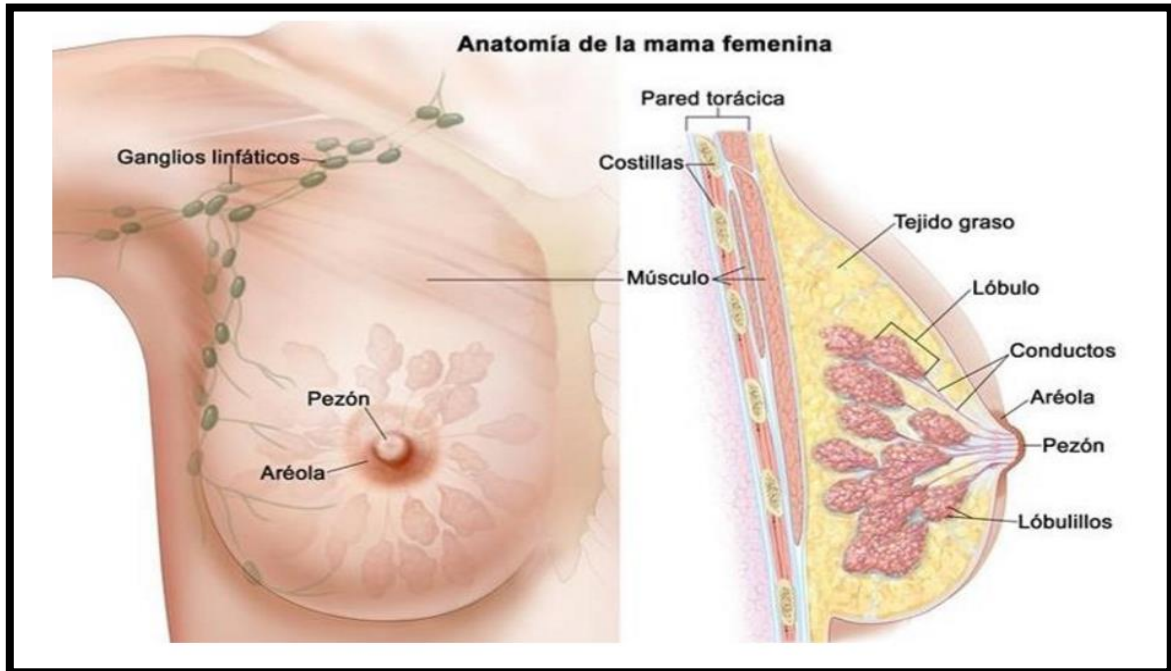


Figura 2. Anatomía de la mama.

Tomado y modificado de: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>

4.- EPIDEMIOLOGÍA E INCIDENCIA

4.1 Morbilidad y mortalidad Mundial del CM

De acuerdo a las últimas estimaciones estadísticas de la International Agency of Research on Cancer: GLOBOCAN 2012, el CM es el segundo cáncer más común en el mundo y el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2012 (25% de todos los cánceres), además de que se ubica como la quinta causa de muerte por cáncer en general (522.000 muertes) (Globocan 2012).

4.2 Morbilidad y mortalidad en México

De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología (2014), en México el CM ocupa el primer lugar en incidencias de las neoplasias malignas en las mujeres, lo que representa el 11.34% de todos los casos de cáncer. Del año 2007 al 2014, la incidencia de CM (número de casos nuevos por cada 100 mil personas de cada sexo), aumentó, siendo el año 2014 en el que se presenta la incidencia más alta, con 28.75 casos nuevos por cada 100 mil mujeres de 20 años y más. Caso contrario en los hombres ya que la incidencia se mantiene muy baja fluctuando entre 0.39 y 0.64 casos nuevos por año. Así, para ese año, por cada caso nuevo en los varones se detectan 29 en las mujeres (Figura 3), (INEGI, 2014).}

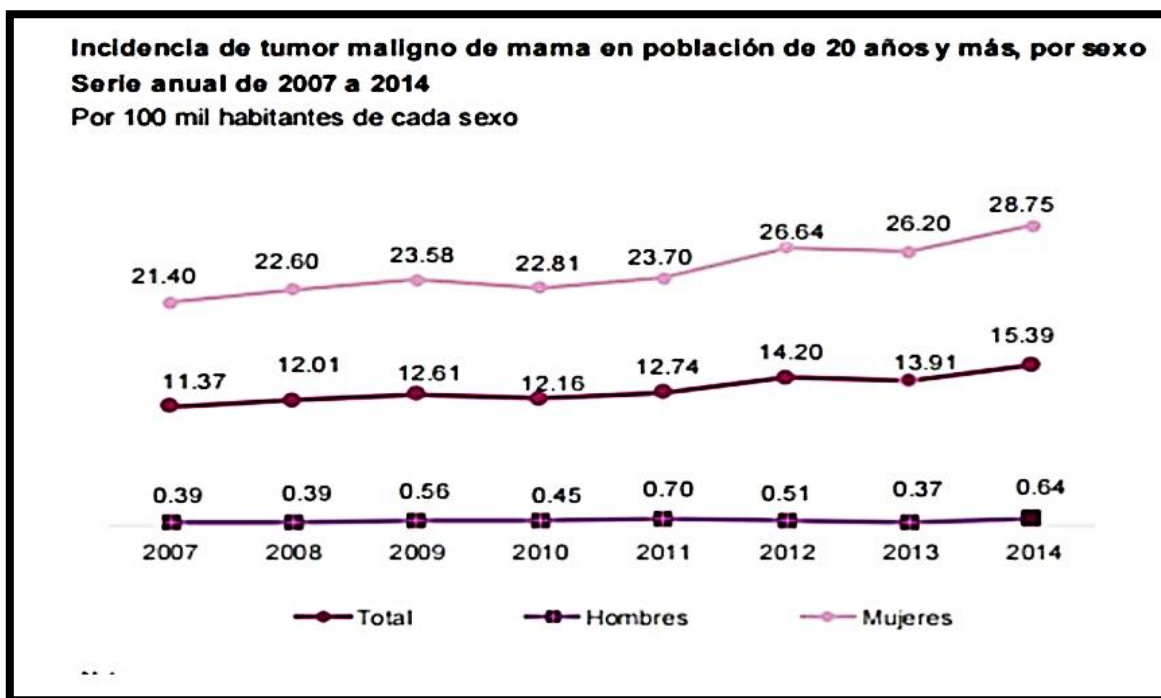


Figura 3. Incidencia de cáncer de mama en hombres y mujeres del año 2007 al 2014.

Tomado y modificado de:

<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>

De acuerdo a datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) al analizar la incidencia por grupos de edad para el año 2014, se observa que hay un aumento de casos conforme se incrementa la edad de la mujer, siendo en el grupo de 60 a 64 años donde se concentra el mayor número de casos nuevos (68 por cada 100 mil mujeres de ese grupo de edad), también se destaca un incremento que se da a partir de los 45 años, ya que la incidencia pasa de 14.30 (por cada 100 mil mujeres de 25 a 44 años) a 51.98 (en las del grupo de 45 a 49 años) (Figura 4) (INEGI, 2014)

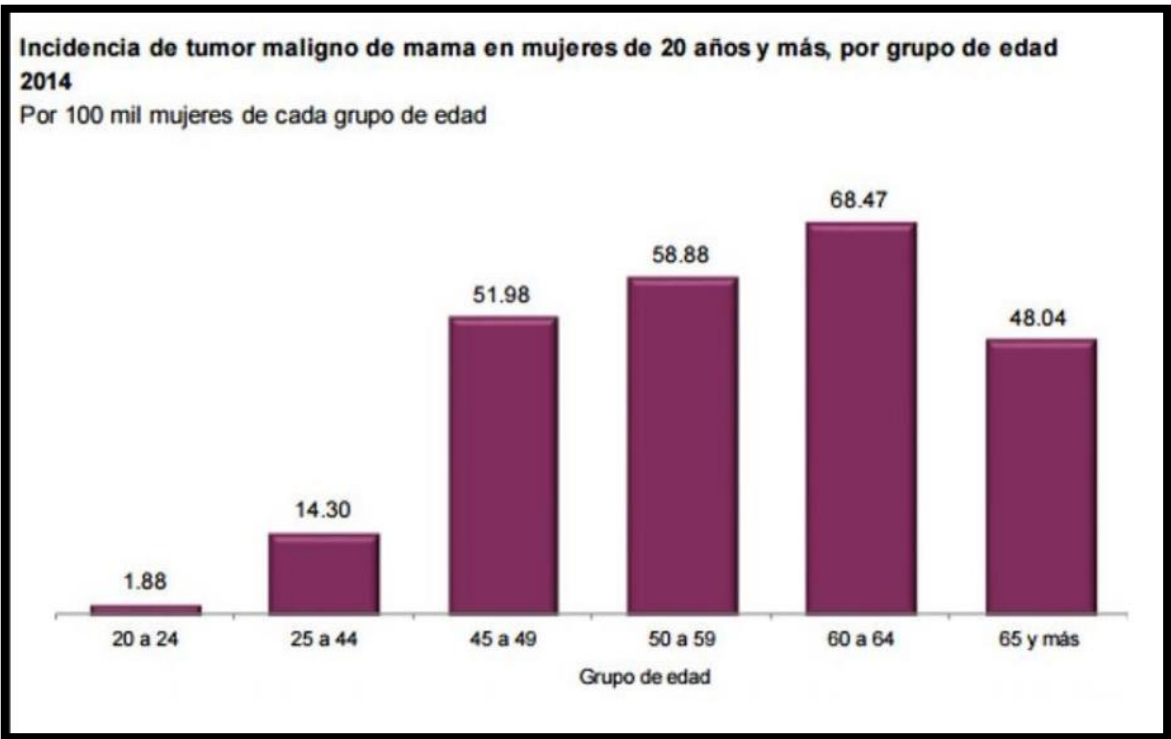


Figura 4. Incidencia de cáncer de mama por grupo de edad (2014).

Tomado y modificado de:

<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>

Cabe señalar que el CM cobra más vidas en países de bajos ingresos, ya que generalmente el diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad,

debido a la falta de acceso a servicios de salud y a la poca sensibilización para la detección en etapas iniciales. En México, en 2013, el CM ocupa la cuarta causa de mortalidad por tumores malignos (7.7%), en la población mexicana de 20 años y más (Figura 5) (INEGI, 2013).

Distribución porcentual de defunciones en población de 20 años y más, por tumores malignos según sexo			
2013			
Tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Total	100.0	100.0	100.0
Órganos digestivos	32.8	33.4	32.2
Órganos genitales femeninos/masculinos	15.4	17.5	13.4
Órganos respiratorios e intratorácicos	10.7	14.5	7.1
Mama	7.7	0.1	14.8
Órganos hematopoyéticos	5.7	6.2	5.3
Otros tumores malignos ^a	27.7	28.3	27.2

Figura 5. Distribución porcentual de defunciones por cáncer de mama (2013).

Tomado y modificado de:

<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2015/mama0.pdf>

En cuanto al sexo tenemos que el CM es la primera causa de mortalidad en las mujeres de 20 años y más (14.8%), mientras que para los hombres del mismo grupo de edad apenas representa 0.1% de las muertes por neoplasias (INEGI, 2013)

5.- ETIOLOGÍA DEL CM

La causa o causas que producen el CM todavía son desconocidas, sin embargo sabemos que es multifactorial ya que se han identificado numerosos factores de riesgo asociados al CM (Fernández M, 2006).

5.1. Factores de riesgo controlable

- **Peso.** El sobrepeso tiene un riesgo elevado de provocar CM, en especial para mujeres postmenopáusicas ya que el tejido graso es la principal fuente de estrógeno que posee el cuerpo, tras la menopausia, cuando los ovarios dejan de producir la hormona hay una mayor cantidad de tejido graso, lo que implica un mayor nivel de estrógeno y por lo tanto puede aumentar el riesgo de CM (Breast Cancer,2013)
- **Consumo de alcohol.** Algunos estudios revelaron que el riesgo de CM aumenta en relación con la cantidad de alcohol que consume una mujer. El alcohol puede afectar la función renal de control sobre los niveles de estrógeno en sangre, lo cual puede aumentar el riesgo (Longnecker MP, 1994)
- **Tabaquismo.** Fumar suele implicar un leve aumento en el riesgo de CM (Breast Cancer, 2013)
- **Exposición al estrógeno.** El estrógeno en mujeres estimula el crecimiento de las células mamarias, la exposición a esta hormona durante períodos prolongados ininterrumpidos puede aumentar el riesgo de que se forme cáncer (Breast Cancer, 2013)
- **Uso reciente de anticonceptivos orales.** El uso de pastillas anticonceptivas parece aumentar levemente el riesgo de desarrollar CM, pero solo durante un período limitado. Las mujeres que han dejado de utilizar anticonceptivos orales por más de 10 años no parecen presentar un riesgo mayor de desarrollar CM (Breast Cancer, 2013)

5.1.2 Factores de riesgo no controlables

- **Factores hormonales.** Los estudios epidemiológicos a gran escala sugieren que a mayor tiempo de exposición a estrógenos, mayor riesgo de CM. Una menarquía temprana, una menopausia tardía, la nuliparidad y una edad tardía al primer embarazo se relacionan con un aumento en la incidencia (Gail MH y Col, 1989).
- **Edad.** La incidencia de CM se incrementa con la edad. Dicho incremento persiste tras la menopausia, esto sugiere la importancia de la función ovárica (en cuanto a síntesis de estrógenos) en el riesgo de CM (Winer E y Col, 2001).
- **Agregación familiar.** Globalmente, existe un riesgo 1.5-3 veces superior al de la población normal para aquellas pacientes cuyo familiar de primer grado (hermana o madre) hayan padecido un CM (Ottman R y Col, 1983)
- **Enfermedades benignas de la mama.** Las enfermedades benignas de la mama se dividen en no proliferativas y proliferativas (hiperplasia ductal, adenosis esclerosante, atipia ductal con hiperplasia y carcinoma lobulillar *in situ*). Las primeras no están asociadas a un incremento de incidencia de CM, mientras que las segundas si, se consideran lesiones pre malignas, ya que aumentan cinco veces el riesgo de padecer un CM (Dupont W y Col, 1994)
- **Factores ambientales.** La exposición a radiaciones ionizantes incrementa el riesgo de CM, con un período de latencia de hasta 40 años. Al respecto es muy ilustrativo el estudio de Gervais-Fagnou y Col. en el que en una cohorte de 427 mujeres que habían recibido irradiación supradiafragmática como tratamiento de enfermedad de Hodgkin en el pasado mostraban un riesgo relativo de 10.6 para CM respecto al esperado para mujeres de su edad sin irradiación previa.
- **Factores genéticos.** Es muy importante el factor genético, como el antecedente familiar de carcinoma de mama, sobre todo en etapas anteriores a la menopausia. Se presenta un mayor riesgo cuando una mujer

padece CM a edades tempranas (por debajo de 45 años) y tiene historia familiar positiva para CM y/o ovario (fundamentalmente), o cuando hay un gran número de familiares afectados (Struewing J y Col, 1997), si hay mutaciones del BRCA1 (transmitido de forma autosómica dominante) éstas se asocian a un riesgo de hasta 85% de desarrollo de CM a lo largo de la vida, sobre todo a edades tempranas. (Ford D y Col, 1994) y las mutaciones en el gen BRCA2 (transmisión autosómica dominante) presenta un riesgo similar de padecer CM (Easton D y Col, 1997), también implica un riesgo si la paciente tiene un familiar de primero o segundo grado con este tipo de cáncer ya que el riesgo de desarrollarlo aumenta de 1.5 a 3 veces, aunque no se haya asociado a ninguna mutación conocida (Quintela M, 2005).

6.- FACTORES DE SUPERVIVENCIA Y PROGRESIÓN DE LA CÉLULA TUMORAL MAMARIA

Es esencial revisar la importancia de los factores de crecimiento y las hormonas esteroideas relacionadas con la progresión y crecimiento del CM ya que constituyen los factores pronósticos más importantes.

6.1 Receptores esteroideos

6.1.1 Conceptos básicos

Los estrógenos y progestágenos son hormonas esteroideas implicadas en múltiples aspectos de la patología de la glándula mamaria. En conjunto ambos tipos de hormonas intervienen en el crecimiento, diferenciación y supervivencia del epitelio mamario (Dickson RB y Stancel GM, 2000), son importantes en el desarrollo de las neoplasias mamarias durante los años reproductivos (desde la menarquía a la menopausia) y se cree que el aumento de la expresión de receptores esteroideos es un evento clave e inicial en la tumorigénesis mamaria (Peyrat P, y Bonnetterre J, 1992).

6.1.2 Estrógeno y Receptor de estrógenos

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroides las cuales ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diferentes tejidos. La acción reguladora primaria de los estrógenos se restringe principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen BS y Col, 2000).

El mecanismo de acción de este esteroide se lleva a cabo a través de su unión a un factor de transcripción específico que se localiza en el citoplasma y núcleo celular denominado receptor de estrógenos (RE), el cual regula la actividad de genes blanco para esta hormona (Couse J y Korach S, 1999). Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como ER α y ER β , el primero es expresado predominantemente en órganos reproductivos (útero, mama y ovario), así como en el hígado y en el sistema nervioso central, y el segundo es expresada mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Nilsson S y Col, 2000).

El receptor de estrógeno alfa actúa como un factor de transcripción que regula tanto el crecimiento como la diferenciación de las células epiteliales mamarias normales (Harris JR, 2010). Entre un 50% a un 80% de los cánceres de mama expresan receptores de estrógenos. La frecuencia con la cual los tumores expresan receptores y la concentración de éstos incrementa al aumentar la edad y alcanzan su mayor nivel en las pacientes postmenopáusicas (Poblete S y María Teresa, 2001).

6.1.3 Progesterona y Receptor de progesterona

La progesterona es necesaria para el correcto desarrollo mamario durante la pubertad y la preparación para la lactancia. Así como el estrógeno, su acción es mediada por sus receptores, localizados en diversos tejidos, como en el cerebro, donde controlan la conducta reproductiva o en los órganos mamarios y reproductivos. El receptor de progesterona (RP) se expresa en las células como

consecuencia de la influencia transcripcional del ER α (Clarke RB, 2003), es activado por la hormona progesterona para ayudar a regular varias funciones celulares normales, incluyendo la proliferación celular y cabe mencionar que dicho receptor se expresa entre un 60% y 70% en carcinomas de mama (Haslam SZ y Col, 1993).

6.2 Receptores de factores de crecimiento

Existen investigaciones respecto a la importancia pronostica de factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico (IGF) o el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), pero el único con importancia comprobada es HER-2 (el factor de crecimiento epidérmico tipo 2) (Gullick WJ y Srinivasan R, 1998). Este receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 de membrana con actividad tirosina quinasa codificado por el oncogén ERBB2, relaciona su función biológica con diversas vías regulatorias del crecimiento celular como proliferación, anti-apoptosis, movilidad e invasión. El oncogén ERBB2 se encuentra amplificado en hasta el 30% de los cánceres de mama invasores y se correlaciona esta amplificación con la sobre-expresión de la proteína HER2/Neu. (Gullick WJ y Srinivasan R, 1998).

6.3 Significado de los Factores de supervivencia y progresión en los resultados de análisis

La mayoría de los casos de CM resultan positivos a receptores de hormonas, (Breast Cancer, 2013)

RE+: Aproximadamente el 80% de los casos de CM

RE+/RP+: Alrededor del 65% de los casos de CM

RE+/RP-: Aproximadamente el 13% de los casos de CM

RE-/RP+: Alrededor del 2% de los casos de CM

RE-/RP-: Aproximadamente el 25% de los casos de CM

7.- CLASIFICACIÓN DEL CM

La clasificación de los tipos de CM se basa en el lugar donde se originó, el grado de invasividad y en la apariencia de las células cancerosas bajo el microscopio. Existen dos tipos principales de CM: el carcinoma ductal, que comienza en los conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón y el carcinoma lobulillar que comienza en partes de las mamas llamadas lobulillos que producen leche. (Carlson y Allred, 2009). Aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares (Brandan y Col, 2006).

En función de su comportamiento de crecimiento, los tumores de mama se clasifican en: *in situ*: localizado en la estructura ducto-lobulillar sin sobrepasarla e infiltrante: cuando se encuentra invadiendo las estructuras vecinas (Piñero M. y Col, 2006).

8.- ESTADIFICACIÓN DEL CM

La estadificación o etapificación es el proceso utilizado para determinar si el cáncer se diseminó solamente dentro de la mama o si salió a otras partes del cuerpo (Acevedo J.C Y Rojas G .2012).

El sistema TNM fue creado por la Agencia Internacional para las Investigaciones en Cáncer (Sobin y Wittekind, 1997) y se ha modificado con el tiempo hasta alcanzar la 7^a edición en el año 2010 (Sobin y Col, 2010). Dicho sistema se basa en el tamaño del tumor (T), la afectación o no de los ganglios linfáticos (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M) (Pérez J.M y Col, 2013). Para el carcinoma de mama, la clasificación de estadio evolutivo basada en el sistema TNM es la más utilizada y es esencial en la clasificación de pacientes con CM y en la evaluación y predicción de sus resultados (Fleming I y Col, 1996).

8.1 Sistema TNM

Los detalles del sistema TNM para el CM se muestran a continuación; para el caso del Tumor (T): Se utiliza la “T” más una letra o un número (de 0 a 4) para describir el tamaño y la ubicación del tumor. En el caso de los Ganglios (N): La “N” en el sistema TNM corresponde a la abreviatura de ganglios linfáticos y para el caso de la Metástasis (M): La “M” de la abreviatura del sistema de TNM indica si el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo (Tabla 1).

El cáncer también puede ser agrupado por estadios. La clasificación por estadios es la base sobre la que se asienta el pronóstico en el CM (Tabla 2).

9.- EPIGENÉTICA

El término “Epigenética” fue acuñado por Conrad Waddington (1905-1975) quien lo definió como “la rama de la biología que estudia la interacción causal entre los genes y sus productos, de los cuales emerge el fenotipo final” (Kaminker, 2007). Por lo tanto la epigenética hace referencia al conjunto de factores no genéticos que influyen en el fenotipo de los individuos, como consecuencia la epigenética se ocupa del estudio de todos aquellos mecanismos bioquímicos que modulan la expresión genética sin alterar la secuencia de pares de bases del ADN. La información epigenética actúa como un interruptor cuya función consiste en el apagado o encendido de determinados genes (García R, 2007). Los cambios epigenéticos pueden ser igual de importantes que los genéticos, ya que ambos pueden ocasionar una mala expresión genética (Li y Col, 2012).

Tabla 1. Sistema TNM.

Tomado de PIMS Prevención en Salud, 2014

Tumor primario (T)	
Tx	Tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1	Tumor ≤ 20 mm
T2	Tumor ≥ 20 mm pero ≤ 50 mm en su diámetro mayor
T3	Tumor ≥ 50 mm en su diámetro mayor
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o dermis.
Ganglios (N)	
Nx	Los ganglios regionales no pueden ser evaluados
N1	Metástasis móviles en ganglios ipsilaterales
N2	Metástasis en ganglios de axila.
N3	Metástasis en ganglios infraclaviculares (nivel III) ipsilaterales.
Metástasis (M)	
M0	No hay evidencia de metástasis a distancia
Mx	No hay evidencia de metástasis a distancia, pero existen depósitos moleculares o microscópicos detectados por células tumorales circulantes en sangre, medula ósea.
M1	Metástasis a distancia detectables

ESTADIO	T	N	M
0	Tix	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 2. Clasificación por estadios del CM

Tomada de Arce y Col, 2011

9.1 Epigenética en CM

Durante décadas se ha cuestionado si la iniciación y progresión del cáncer, se debía solo a eventos genéticos y actualmente se considera que el proceso de carcinogénesis es el resultado no solo de cambios en la secuencia de nucleótidos de la cadena de ADN sino que también procesos epigenéticos van a intervenir a través de modificaciones de la función de un gen, en la proliferación celular a la aparición de alteraciones moleculares responsables del desarrollo de enfermedades neoplásicas (Harris C.C, 1992).

La información genética contenida en los genes puede sufrir alguna alteración como ocurre cuando se produce una mutación, lo que provoca un cambio permanente en la secuencia de ADN y consecuentemente la síntesis proteica anormal. Este hecho ocasiona dependiendo de qué proteína está alterada y cuál es la función que realizaba en condiciones fisiológicas, una alteración en la replicación, supervivencia celular etc., que puede propiciar la puesta en marcha de la cascada de la carcinogénesis. En la información epigenética residen las instrucciones de cómo, dónde y que información genética debe ser utilizada en cada momento, es decir aunque el genoma contiene toda la información necesaria para poner en marcha la transcripción del código genético, la expresión de esta información está regulada por la información epigenética (Deroo BJ y Korach KS, 2006)

Como en muchos tipos de cáncer, en el CM la cantidad de genes desregulados que existen afectan el correcto funcionamiento del ciclo celular, de la apoptosis, de la reparación del ADN, procesos de detoxificación, desinflamación, adhesión celular y migración. Durante mucho tiempo se han adjudicado estos defectos a mutaciones en genes claves del crecimiento celular (Jones y Baylin 2007). Actualmente, se han logrado identificar más de veinte mecanismos epigenéticos, los cuales juegan un rol importante en la regulación de la transcripción y, por lo tanto, en la expresión génica (Hernández M, 2011).

Las modificaciones epigenéticas están mediadas por mecanismos moleculares que comprenden varias modificaciones tales como la metilación del ADN,

acetilación/des acetilación y metilación de las histonas (Van y Col, 2007), cabe mencionar que en los humanos, dentro de los mecanismos epigenéticos el principal es la metilación del ADN (Herman y Baylin, 2003).

9.2 Metilación del ADN

Dentro de los mecanismos epigenéticos, la metilación del ADN es la principal modificación que predomina en los mamíferos, este mecanismo consiste en la adición de grupos metilo al ADN y se le ha asociado con la regulación en la expresión de algunos genes (Novik y Col, 2002). Dicha metilación no va a modificar la función del producto del gen, sino que va a determinar dónde y cuándo se expresa dicho gen. Este proceso es estable en el genoma en estadios tempranos del desarrollo y se mantiene durante el proceso de diferenciación; sin embargo, el patrón de metilación aberrante genera el silenciamiento de genes o la des metilación aberrante produce la expresión de genes que no deberían expresarse (Susan Clark y Col, 2006).

En el ADN las cuatro bases de nucleótidos: citosina (C), adenina (A), guanina (G) y timina (T) forman un total de 16 posibles pares de dinucleótidos. En uno de estos casos, una citosina que va seguida de una guanina en dirección 5' y son denominados dinucleótidos CpG. Éste dinucleótido se encuentra a lo largo del ADN que se conocen como islas CpG. Es curioso destacar que dichas islas CpG se encuentran usualmente concentrados cerca de los sitios de inicio de la transcripción génica, las regiones promotoras, donde la transcripción de ADN a ARN comienza (Herman JG y Baylin SB, 2003). También cabe mencionar que son las principales dianas de metilación y que presentan una distribución característica en el genoma que comprende el 1-2% del genoma total, Se sabe que aproximadamente el 60% de los genes humanos están asociados a una isla CpG (Antequera, 1993). En el genoma de una célula normal, aproximadamente el 70-80% de los dinucleótidos CpG que no están asociados a una isla se encuentran metilados, incluyendo a los que se encuentran en el interior de los genes, las regiones intergénicas y los elementos repetitivos (Ehrlich, 1982).

Como ya se había mencionado anteriormente la metilación del ADN hace referencia a la adición de un grupo metilo en la posición 5 del anillo de la citosina que precede a una guanina (denominados dinucleótidos CpG) para formar 5-metilcitosina (Figura 6) y esta serie de procesos enzimáticos va a estar mediada por la familia de las ADN Metiltransferasas o también llamadas metilasas (Gehring y Col. 2009).

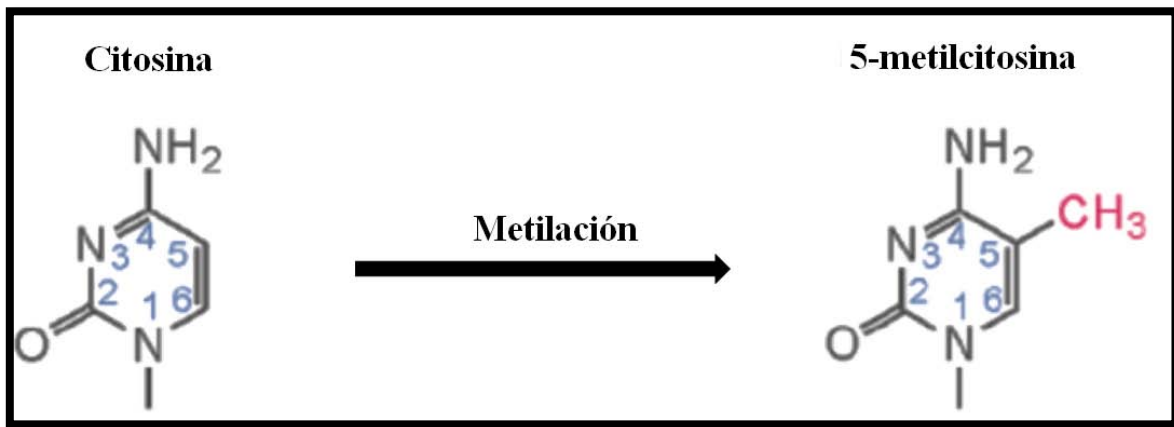


Figura 6. Metilación del ADN.

Tomado y modificado de Muller-Esterl y Col 2008

9.2.1 Metilación del ADN: Su papel en la carcinogénesis

Uno de los procesos patológicos en los que se está estudiando la participación de la metilación del ADN es en el cáncer debido a que la metilación es un mecanismo que participa en la programación de la expresión génica y que puede promover el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluyendo el CM (Pouliot MC y Col, 2015).

Existen 2 alteraciones principales que afectan a los patrones normales de metilación, y que se encuentran estrechamente relacionadas con la actividad de la familia de las metiltransferasas (DNMT's) (Figura 7): La hipometilación y la hipermetilación. Por un lado se produce la hipometilación global del ADN que

afecta a secuencias repetitivas en dominios de heterocromatina, y transposones y por otro la hipermetilación de genes supresores tumorales (Esteller M, 2008)

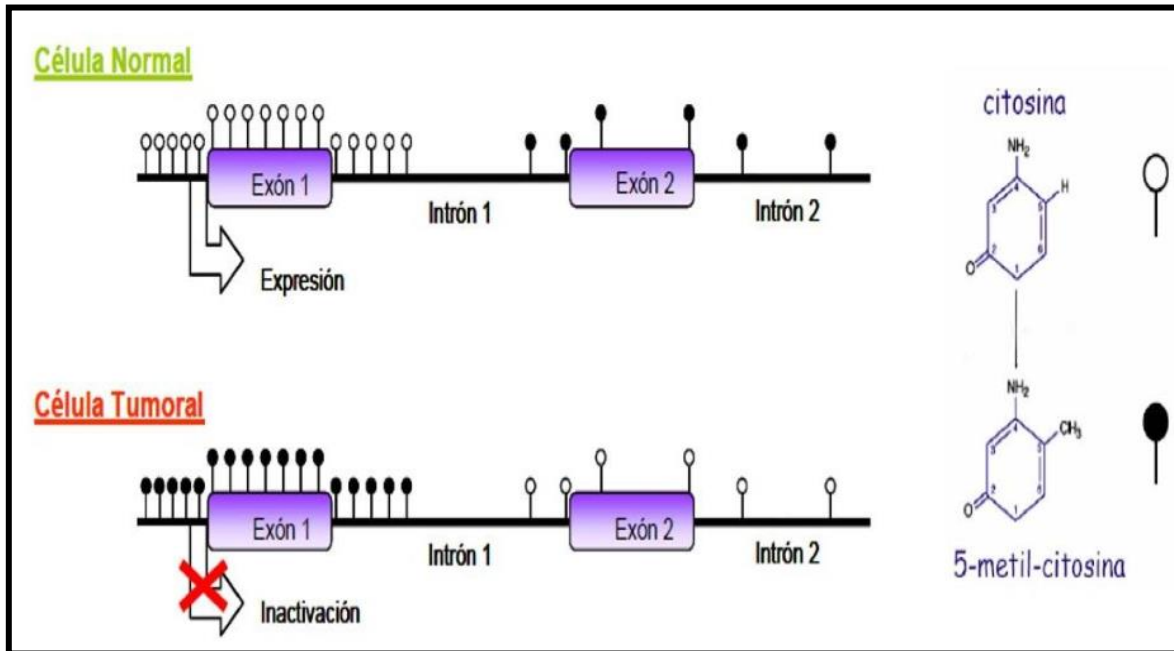


Figura 7. Representación de la metilación en células tumorales y normales.

Las células normales tienen sus CpGs metiladas en los promotores y en el cuerpo del gen en cambio las células tumorales ganan metilación en las regiones promotoras y la pierden en el cuerpo de los genes. Tomado y modificado de Osorio E. 2010

9.3.- Efectos de la metilación del ADN

El patrón de metilación no se mantiene constante a lo largo de toda la vida de un individuo, sino que sufre sucesivas modificaciones. En mamíferos los cambios en el patrón de metilación más importante se producen durante el desarrollo embrionario. Después de la fecundación, se eliminan los patrones de metilación previamente establecidos (excepto en algunas zonas con loci con impronta génica) y se establece un nuevo patrón de metilación necesario para la expresión específica de tejidos de algunos genes, para la inactivación del cromosoma X en

hembras, y para la impronta genómica. Una vez establecidos los nuevos patrones de metilación deben ser heredados por las células hijas. La herencia anormal de dichos patrones lleva a la formación de tumores y a procesos de envejecimiento (Pouliot MC y Col, 2015)

Los cambios en el patrón de metilación, tanto normalmente como en caso de enfermedad, se producen a través de tres mecanismos básicos (Toth y Col, 1990):

Metilación de *Novo*: Es la metilación de secuencias no metiladas, estableciendo así un nuevo patrón de metilación. La mayor parte de esta metilación se produce durante el desarrollo embrionario (Toth y Col, 1990)

Metilación de mantenimiento: es el proceso mediante el cual se mantiene el patrón de metilación después de la replicación. En cada replicación genera una cadena de ADN de nueva síntesis no metilada, frente a la cadena complementaria molde, que si ésta metilada. Esta reacción de metilación se lleva a cabo gracias a las DNMT's que prefieren un substrato hemimetilado. La enzima clave para el mantenimiento de la metilación es la DNMT1 (Goll y Bestor, 2005)

Desmetilación: es el proceso que permite eliminar los patrones de metilación previos. Ocurre principalmente durante el desarrollo preimplantacional, y en general, durante todo el desarrollo (Liu y Col 2003).

10.- DNA METILTRANSFERASAS (DNMT'S)

Las DNMT's dependientes de S-adenosil-L-methionina (SAM), son enzimas que regulan la expresión genética mediante la metilación. Esta función se basa en la transferencia de un grupo metilo del cofactor SAM hasta la posición 5 del anillo pirimidínico de la citosina (Peter, J. y Akbarian S., 2012) (Figura 8). Estas enzimas presentan dos dominios: el amino terminal regulador y el carboxi terminal catalítico. La región amino terminal varía según las subfamilias de DNMT's (NLS) (Siedlecki, P y Zielenkiewicz, P, 2006)

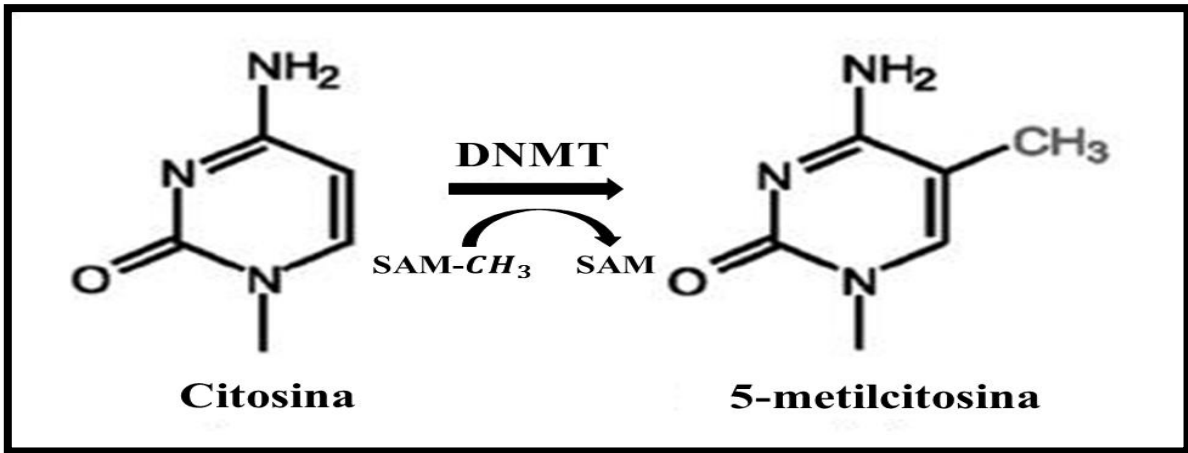


Figura 8. Mecanismo de metilación por enzimas DNMT's.

Tomado y modificado de Aapola y Col 2002.

En los mamíferos, se han reportado cinco miembros de la familia de las DNMT's: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3B y DNMT3L (DNMT3-like). Estas enzimas, son las responsables de la adquisición del patrón de metilación durante la gametogénesis, la embriogénesis y el desarrollo de tejido somático, siendo la DNMT1 el grupo más estudiado (Subramaniam y Col, 2014). Cabe señalar que de estos cinco miembros solo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b tienen actividad ADN metiltransferasa (Aapola y Col, 2002).

Los miembros de esta familia se clasifican en DNMT's de *novo* (DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L) y DNMT's de mantenimiento (DNMT1) (Figura 9)

La familia DNMT3 establece el patrón inicial de metilación de *novo*, mientras que la DNMT1 mantienen este patrón durante la replicación y las reparaciones, presentando una preferencia de 30 a 40 veces por sitios hemimetilados (Kullmann K, 2013.)

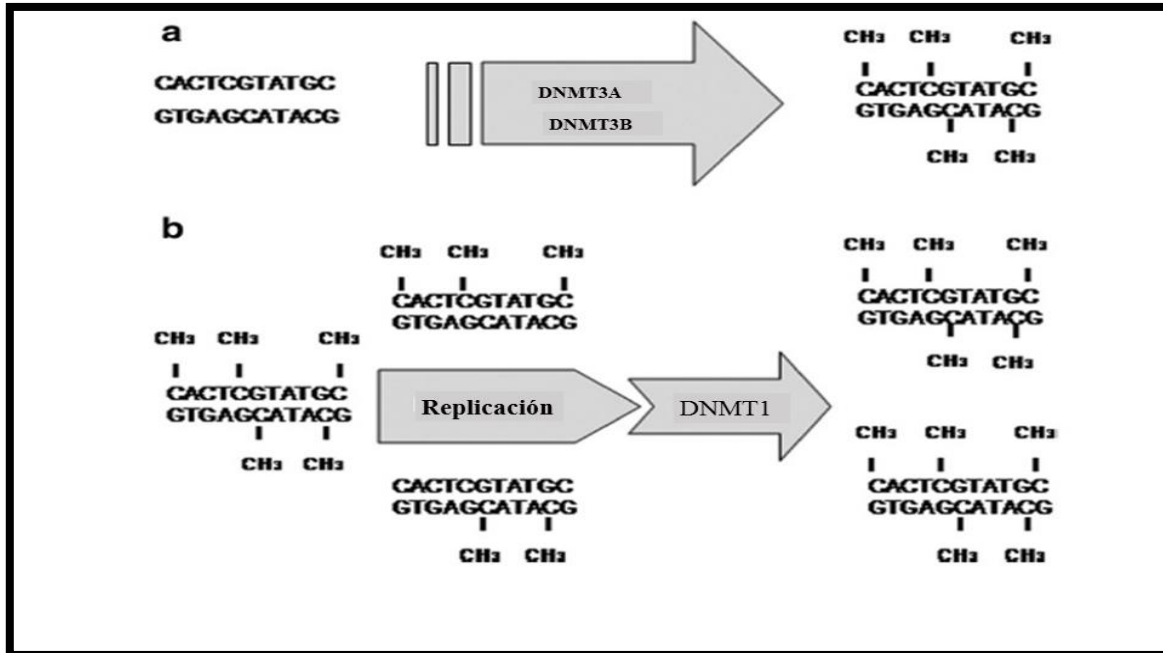


Figura 9. Clasificación de las DNMT's.

a) De Novo (DNMT3A y DNMT3B). b) De mantenimiento (DNMT1). Tomado y modificado de Kullmann K 2013.

10.1 DNMT1

Esta enzima fue Clonada hace 15 años (Bestor y Col, 1988) y es la más abundante en células somáticas. Contiene 1620 aminoácidos, presenta entre 10 y 40 veces más afinidad por ADN hemimetilado que por ADN sin metilar, se localiza preferentemente en focos de replicación durante la fase S del ciclo celular, su expresión está bajo el control del ciclo, siendo alta en condiciones de proliferación y baja en células postmitóticas (Robertson y Col, 2000). Por todo esto se le considera la metiltransferasa de mantenimiento responsable del patrón de metilación del ADN después de la replicación (Hermann, A y Col, 2004). Su actividad, por lo tanto, conduce al re-establecimiento del mismo patrón de metilación del ADN como lo era antes de la replicación (Goyal, R. 2006).

Esta enzima está constituida por dos dominios principales: el extremo carboxi-terminal, que constituye el dominio catalítico de la enzima y está conservado en el resto de las metiltransferasas, y el extremo amino-terminal. Este último, de unos 1000 aminoácidos, contiene una señal de localización nuclear, una secuencia que lo dirige hacia focos de replicación, y un dominio de unión a Zinc rico en cisteínas (CXXC) (Fuks y Col, 2000; Rountree y Col, 2000)

Se cree que DNMT1 no interviene solamente en el mantenimiento del patrón de metilación, sino que también juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura de la heterocromatina (Goll y Bestor 2005)

10.2 DNMT2 (TRDMT1)

Son las más altamente conservadas a lo largo de la evolución y ampliamente distribuidas entre las diferentes especies, actualmente son conocidas como TRDMT1 y tienen una gran similitud de secuencia y estructura con las demás DNMT's, sin embargo, se compone únicamente del dominio C-terminal, y no posee la región N-terminal reguladora (Ravdin P y Cols.2007). A partir de su estructura, en 2006, se demostró que participa en el reconocimiento del daño del ADN, la recombinación de este, y la reparación de mutación, pero ésta metil ácido aspártico en la posición 38 del ARN de transferencia, por lo que su nombre fue cambiado a TRDMT1 (ARNt metiltransferasa del ácido aspártico), siendo la primera enzima metiltransferasa de ARN en ser identificada en humanos (Goll, 2006).

10.3 DNMT3

Son las metiltransferasas consideradas de *novo*. En los mamíferos esta familia está compuesta por tres miembros: DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L (DNMT-Like), siendo esta última la única que se expresa en células germinales y que no posee actividad metiltransferasa sin embargo es esencial para el establecimiento del

imprinting materno en el oocito y la proespermatogonia (Buryanov y Shevchuk, 2005).

DNMT3A y DNMT3B contienen una región variable en el extremo N-terminal, seguido de un dominio, que se ha denominado PWWP, que puede estar implicado con la unión no específica al ADN, un dominio rico en cisteína (Cys) y un dominio catalítico C-terminal. Durante la embriogénesis temprana, la metilación de *novó* del ADN es mediada por DNMT3A y DNMT3B, las cuales están estrechamente asociados con los nucleosomas que contienen ADN metilado. Los niveles de DNMT's, especialmente los de DNMT3A y DNMT3B, a menudo aumentan en varios tejidos y líneas celulares de cáncer, esto puede explicar parcialmente la hipermetilación de regiones ricas en CpG de los promotores de genes supresores de tumores en una variedad de tumores malignos (Montgomery K. y col. 2004)

En este trabajo se hace referencia a DNMT3B por lo que se hablará de ella más a fondo. La metiltransferasa 3B (DNMT3B) es una de las tres metiltransferasas de ADN conocidas con actividad catalítica. Esta enzima como ya se había mencionado es responsable de la metilación de *novó* del ADN, en particular durante la embriogénesis (Okano y Col, 1999). Esta enzima añade grupos metilo a dinucleótidos CpG no metilados de ADN para el establecimiento del nuevo patrón de metilación en el ADN genómico. El nivel de DNMT3B se incrementa en varias líneas de células tumorales y en numerosos tipos de cánceres humanos, lo que indica que desempeña un papel importante en la tumorigénesis (Turek-Plewa y Jagodzinski, 2005).

El gen humano DNMT3B está localizado en el brazo largo del cromosoma 20 en la posición 11.2 (Figura 10), presenta 23 exones extendidos en 47 kb y 22 intrones. Seis de los exones están sujetos a corte y empalme alternativo. Este gen codifica para una proteína de 853 aminoácidos, se expresa abundantemente en las células madre embrionarias, pero su expresión se reduce a su diferenciación y sigue siendo baja en los tejidos somáticos adultos (Passarge, E. 2009)

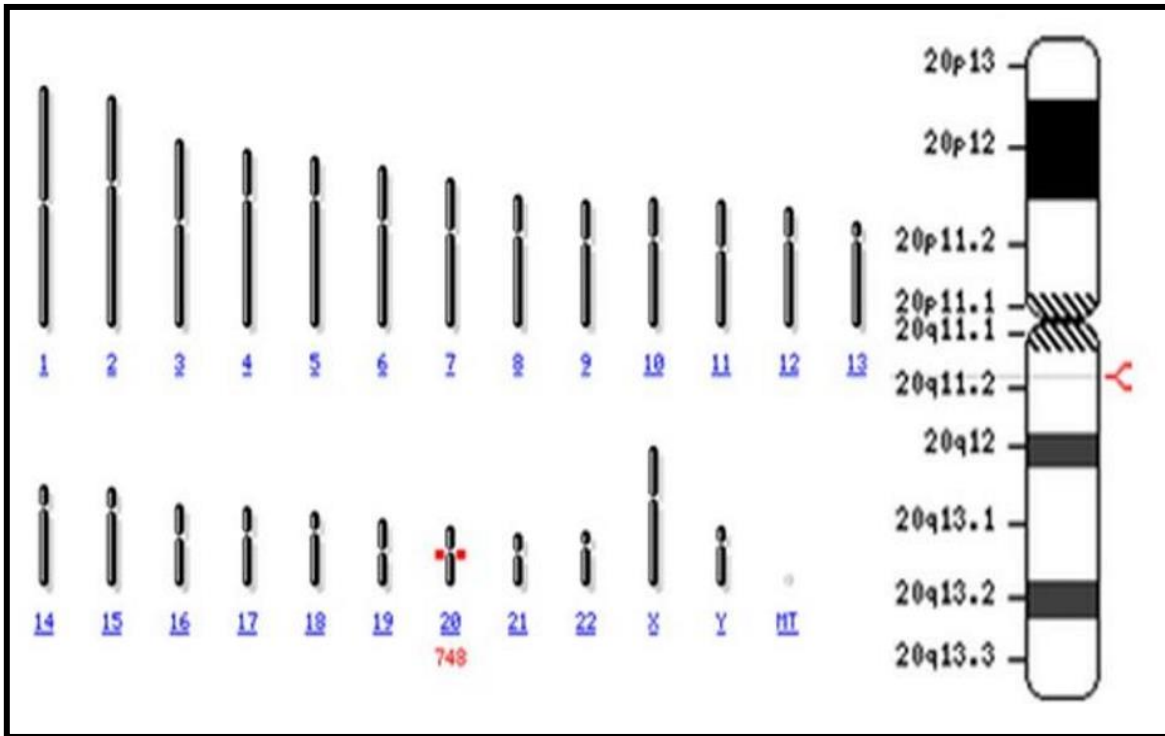


Figura 10. Localización de la DNMT3B en el genoma.

Tomado y modificado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps>

La estructura general de la proteína DNMT3B consiste en un dominio N-terminal que contiene un dominio de células en proliferación nuclear de unión al antígeno, una señal de localización nuclear, un tetrapéptido PWWP, esencial para la unión de la DNMT a la cromatina, un dedo de Zinc de unión a ADN con dominio rico en cisteína ATRX y un dominio homólogo polibromo (PHD) con orientación de la DNMT3B a los focos de replicación (Figura 11 A). El dominio catalítico C-terminal de DNMT3B se caracteriza por la presencia de 6 dominios de aminoácidos conservados I, IV, VI, VIII, IX y X (Figura 17 B) (Turek-Pleway .Jagodzinski, 2005) Los resultados de splicing (corte y empalme alternativo de los exones han reportado varias transcripciones diferentes de DNMT3B. Estas isoformas son: DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4 y DNMT3B5 (Figura 11 B). DNMT3B1 y DNMT3B2, contienen todos los dominios altamente conservados

I, IV, VI, IX y X y son enzimáticamente activas en ensayos de DNMT's. (Xie et al., 1999; Okano et al, 1999).

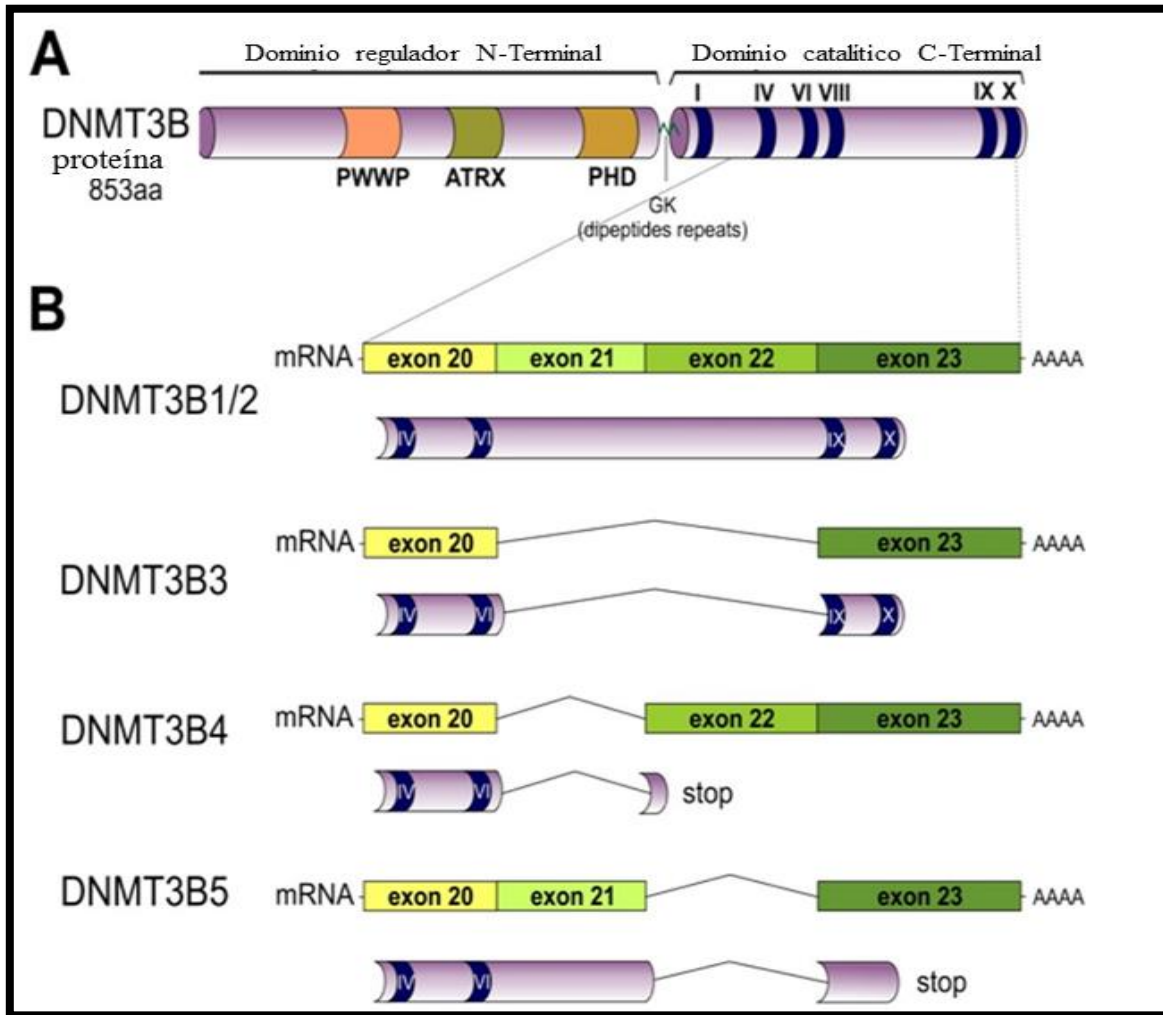


Figura 11. DNMT3B Y SUS VARIANTES

A) Estructura general de la proteína DNMT3B, B) Isoformas de DNMT3B resultado de splicing alternativo: DNMT3B1, DNMT3B2, DNMT3B3, DNMT3B4, DNMT3B5. Tomado y modificado de <http://atlasgeneticssoncology.org>

Las isoformas que presenta Dnmt3b son el resultado del splicing alternativo de los exones 11, 22 y/o 23 en varias combinaciones y de estas isoformas solamente DNMT3B1 (isoforma de longitud completa) y DNMT3B2 (isoforma más corta ya que le faltan los aminoácidos codificados por el exón 11) son capaces de la metilación del ADN (La Salle y Trasler, 2006).

10.4 Sobreexpresión de las DNMT's en cáncer

Las DNMT's 1, 3A y 3B, coordinan la expresión de ARNm en tejidos normales y la sobreexpresión en los tumores. Los niveles de expresión de estas enzimas han sido reportados como elevadas en algunos cánceres, entre los cuales se encuentran el CM, colon, próstata, de hígado y en leucemia. El papel de la expresión alterada de DNMT's en la hipometilación del ADN y la hipermetilación en el cáncer es incierto y puede implicar cambios en la expresión de ARNm o en la proteína (Dworkin A. y col. 2009).

De las familias de DNMT's, la DNMT3A y DNMT3B presentan una expresión elevada en líneas celulares tumorales (Xie y Col, 1999).

10.5 DNMT's y CM

En el cáncer, las DNMT's se sobre expresan en varios tipos de tumores, incluyendo CM ya que aproximadamente el 30% de los pacientes reveló sobreexpresión de DNMT3b en el tejido tumoral en comparación con el tejido mamario normal. Curiosamente, DNMT1 y DNMT3a se sobre expresa en sólo el 5 y 3% de los carcinomas de mama (Subramaniam y Col, 2014).

11.- MODELOS EXPERIMENTALES DE CM IN VITRO

Los estudios *in vitro* en cultivos celulares son herramientas valiosas para la detección de agentes quimiopreventivos debido a que proporcionan datos preliminares para estudios *in vivo*. Este tipo de estudio tiene un gran interés científico, debido a que se pueden realizar investigaciones sobre el ciclo celular y

el control del crecimiento de células tumorales (Morgan y Col, 2005). El cultivo de células tiene el objetivo de mantenerlas, fuera de su organismo de origen, para estudiar su comportamiento sin el control normal ejercido por el organismo vivo y poder estudiarlas bajo un ambiente experimental controlable (Freshney e Ian, 2000).

La línea celular MDA-MB-231 es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del CM, es un prototipo utilizado para el estudio de células hormono-independientes. Son células adherentes, con morfología epitelial (Atcc.org, 2016) que fueron aisladas por Cailleau y sus colaboradores en 1973, a partir de una muestra de derrame pleural de una paciente con CM, estas células fueron comercializadas desde hace muchos años por la ATCC y hasta el día de hoy, pueden considerarse sin duda unas de las más investigadas en CM (Martínez-Carpio y Navarro Moreno, 2003)

12.- PCR EN TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar (Tamay de Dios y Col, 2013). Esta técnica se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADN complementario (ADNc) específicas y así acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión genética de las células en estudio (Heid y Col, 1996).

La tecnología del RT-PCR está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. Dentro de los marcadores fluorescentes más utilizados se encuentra el SYBR® Green (Lee y Col, 2004), la cual es una molécula cargada

positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al surco menor del ADN incrementa hasta 1,000 veces su fluorescencia (Tamay de Dios y Col, 2013).

El tipo de cuantificación por PCR en tiempo real puede ser absoluta o relativa. Si es absoluta tiene como objetivo determinar el número exacto de moléculas de ADN o ARN presentes en una muestra, este tipo de cuantificaciones se emplean para la detección y cuantificación de cargas virales, agentes patógenas o en la terapia génica. Si la cuantificación es relativa permite determinar cuántas veces (más o menos) de ácido nucleico se tiene de un templado o una muestra biológica determinada con respecto a un tejido o muestra de referencia, la aplicación más utilizada de este método es la comparación de los niveles de expresión génica (ARNm) entre diferentes tejidos o en el tiempo, o la respuesta de un tejido a diferentes tratamientos pero para ello primeramente debemos realizar una normalización de la cantidad relativa de cada muestra respecto a un gen normalizador, preferentemente de expresión constitutiva en la célula (control endógeno) (Rodríguez M y Rodríguez W, 2006).

III. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

De acuerdo a Girault y Col, 2003 mencionan que durante la tumorigénesis en el CM, hay una expresión desregulada de las DNMT's, las cuales son de importancia en la regulación de la expresión génica especialmente en la de los genes supresores de tumores. Ellos analizaron la expresión de las DNMT's en 130 carcinomas no metastásicos y encontraron una correlación positiva entre cada uno de ellos, es decir se expresan al mismo tiempo la DNMT1, 3A y 3B, encontrando que los niveles de mRNA de la DNMT3B se sobreexpresa en el 30% de los pacientes; en contraste, con DNMT1 y DNMT3A con sólo el 5.4 y el 3.1% respectivamente. Por otro lado Montgomery y col, 2004 mencionan que la metilación del ADN juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de diversos cánceres, ellos observaron el aumento de la actividad de DNMT-1 y DNMT-3B en varios tumores, lo que indica que estos dos genes pueden contribuir a la tumorigénesis. Roll y Col, 2008 demostraron que las DNMT1, 3A, y 3B humanas coordinan la expresión del ARNm en tejidos normales (Subramaniam y Col, 2014), además de que se encuentran sobreexpresadas en tumores de mama, siendo la DNMT3b la que desempeña el papel predominante sobre DNMT3a y DNMT1 en tumorigénesis. Actualmente Mirza y Col, 2013 observaron que los cambios epigenéticos y las mutaciones genéticas coexisten a menudo fundamentalmente y pueden detener diversas vías bioquímicas en células cancerosas, por ejemplo, la detención del ciclo celular y la apoptosis, además en el caso de DNMT1 cuando ésta sobreexpresada hace más susceptible la degradación proteosomal y la ubiquitinación.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IPLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el CM ocupa el primer lugar de mortalidad en México en mujeres mayores de 35 años, y se ha observado que se presenta cada vez más tempranamente, se considera una de las prioridades para la Secretaria de Salud en nuestro país. Existe la hipótesis de que la epigenética es el primer mecanismo que ocurre en la carcinogénesis, es decir influye para la transformación de las células normales a neoplásicas, siendo la metilación un mecanismo que suprime la expresión de genes, y las enzimas que llevan a cabo este proceso son las DNMT's. Está bien documentado que se incrementa la expresión en el CM, aunque no existe evidencia en México acerca de cuál de éstas esta sobre expresada.

V. JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

En México el CM ocupa el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres, representando el 11.34% de todos los casos de cáncer. Actualmente, aun cuando la incidencia de CM continua aumentando, es importante señalar que en muchos países, la mortalidad ha disminuido; cambio que se ha explicado por los avances logrados en el diagnóstico y el tratamiento dirigido a las alteraciones epigenéticas, por lo que la epigenética se ha vuelto un área de creciente investigación debido a la comprensión de las vías involucradas. El CM es una enfermedad relacionada con la acumulación de mutaciones y cambios en la expresión genética de los genes. La metilación es un evento que puede ser reversible administrando azacitidina, está documentado su uso en pacientes con síndromes mielodisplasicos, por ello es importante saber si las DNMT's se encuentran sobreexpresadas para ser utilizado como un biomarcador de progresión.

VI. HIPOTESIS

HIPOTESIS

Las DNMT's son enzimas encargadas de la metilación las cuales se relacionan con la progresión del cáncer, cuando se sobreexpresan pueden inhibir la transcripción de genes que controlan el ciclo celular y la diferenciación, por lo tanto se espera que a mayor estadio clínico del CM se sobreexpresen las DNMT's, presentando un cambio en la expresión de genes involucrados en el proceso.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión de la DNMT 3B y la isoforma 3B1 en muestras de tejido mamario por PCR en tiempo real y su correlación con el estadio clínico y expresión de receptores (RE, RP).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Verificación de oligos y realización de PCR *in silico* con herramientas de bioinformática.
- Identificar la presencia de la DNMT-3B y su isoforma 3B1 en línea celular de CM MDA-MB-231, por PCR punto final.
- Analizar la expresión de la DNMT-3B y la isoforma 3B1 en muestras de tejido mamario con CM por PCR en tiempo real.
- Correlacionar la expresión de las DNMT con el estadio clínico del CM y la expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y Her 2/Neu.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS:

8.1 Población de estudio

Biopsias de 16 pacientes que acudieron al servicio de oncología del hospital Juárez de México (8 con CM de *novo* y 8 controles).

8.1.2 Criterios de inclusión

Pacientes mexicanas con diagnóstico de CM de *novo*

Pacientes de edad indistinta

Aceptar participar en el estudio

8.1.3 Criterios de exclusión

Pacientes con tratamiento previo (quimioterapia y/o radioterapia)

Que no firmen la carta de consentimiento informado

8.2 Diagrama de trabajo

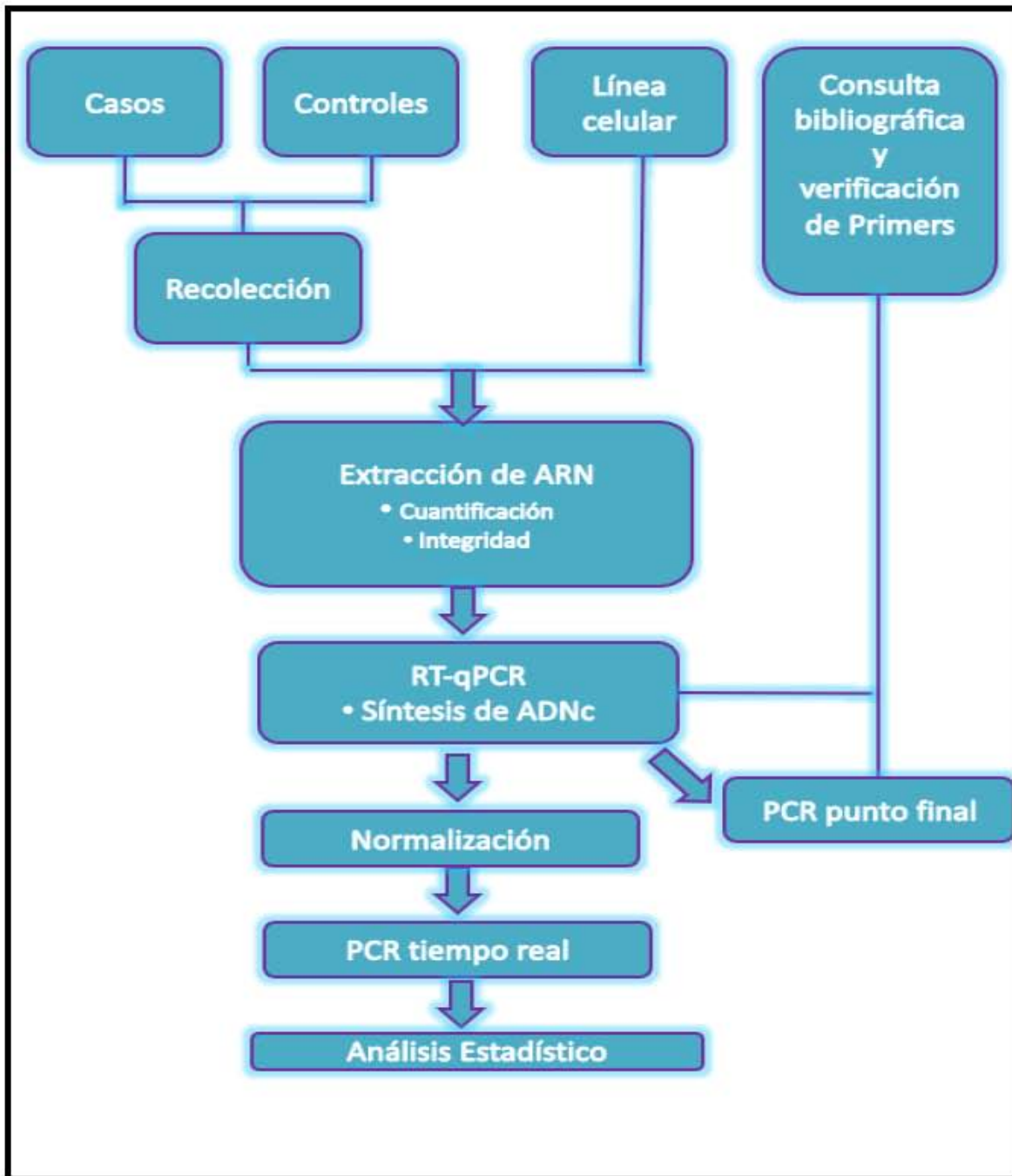


Figura 12. Diagrama de trabajo

8.3 Recolección de muestras

Para la toma de muestras se realizó la revisión de los expedientes de las pacientes en el servicio de Oncología del Hospital para corroborar que las pacientes fueran candidatas para entrar al protocolo de acuerdo a los criterios de inclusión y de exclusión antes mencionados. Brevemente se les explicó a cada una de las pacientes el proyecto, posteriormente se le invitó a participar y después se les aplicó un cuestionario (anexo 2) en el cual se pidió la información necesaria para completar los datos no obtenidos del expediente clínico, y de esta manera obtener la aprobación del consentimiento informado (anexo 1)

Las biopsias obtenidas, se depositaron en tubos Eppendorf con 1000 µl de solución *RNAlater*® (Qiagen, USA) y posteriormente se guardaron a -70°C hasta el momento de su uso.

8.4 Extracción de ARN

Para realizar la extracción del ARN de los casos y controles primero se descongelaron las muestras de tejido mamario y se maceraron con ayuda de un Tissue grinder (NG010 de Genetics®) en un tubo eppendorf en el cual previamente se adicionaron 500µl de Trizol® (Invitrogen) y posteriormente se completó a un volumen de 800 µl de Trizol. Para la línea celular lo primero que se hizo fue retirar el medio de cultivo posteriormente se lavó con 2 ml de buffer fosfato salino (PBS) (dos veces) y se agregaron 800 µl de Trizol.

Posteriormente tanto para los casos, los controles y la línea celular se homogenizaron y se le añadieron 200µl de cloroformo frío, se incubaron durante 10 min en frío y posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 10min a 4°C. Una vez realizado está se tomó la fase acuosa y se pasó a un tubo eppendorf estéril al cual se le agregaron 500µl de isopropanol frío, se incubó durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C y posteriormente se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se lavó el botón celular con 1

ml de etanol frío al 70 %. Por último se hidrató el botón celular con 30 μ l de agua libre de RNAsas y se almacenó la muestra de RNA obtenida a una temperatura de -70°C hasta su uso.

8.5 Cuantificación de los ácidos nucleicos (ARN) e Integridad de ARN

La cuantificación del ARN, obtenidos a partir de los tejidos de casos y controles, así como de la línea celular se realizó utilizando un espectrofotómetro (*Epoch*TM Biotek), midiendo la absorbancia a 260 nm ya que el ARN al igual que el ADN tiene su absorbancia máxima en 260 nm para lo cual se colocaron en la celda 1.5 μ l de cada ARN. Posteriormente se verificó la integridad de este ARN por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con 1.5 μ l de Bromuro de etidio. Se usaron 5 μ l de ARN con 1 μ l de buffer de corrida para cargar el gel. La electroforesis se realizó a 90V durante 1hr. Pasado este tiempo las muestras se visualizaron en el transiluminador de luz UV (Gel Doc TM EZ Imagen de Biorad®.)

8.6 Conversión de ARN a ADN complementario (ADNc)

Para la conversión de ARN a ADNc de las muestras, controles y línea celular se empleó la técnica de transcripción reversa utilizando el kit comercial RT-qPCR (Promega). Lo primero que se llevó a cabo fue la preparación de una mezcla maestra con todos los reactivos necesarios para la conversión a ADNc en un tubo Eppendorf estéril, utilizando las siguientes cantidades por muestra: Buffer rx1m Prom II 4μ l, MgCl_2 3 μ l, DNTP`s mix 1 μ l, Inhibidor de ribonucleasas 0.5 μ l, Enzima RT 1 μ l, OligoDT 1 μ l, RNA 2 μ l y de Agua 7.5. Por último se agregaron 10.5 de la master mix en diferentes tubos de PCR y a estos tubos se le agregaron 2 μ L de ARN y se completó con agua hasta tener un volumen de 20 μ L. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *SEE AMPtm* (SEEGENE)

8.7 Cuantificación de ADNc

La cuantificación del ADNc se llevó a cabo con ayuda del espectrofotómetro (*Epoch™* Biotek) colocando en la celda 1.5µl de cada muestra.

8.8 Verificación de primers

Para poder realizar la amplificación de DNMT3B y de su isoforma DNMT3B1 primero se determinó la secuencia que se iba a analizar, para lo cual lo primero que se hizo fue una revisión bibliográfica, en la que se buscaron primers específicos que amplificaran los genes codificantes para DNMT3B y para su isoforma DNMT3B1. Como un control endógeno se usó el gen GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Posteriormente a la revisión bibliográfica se realizó la obtención de la secuencia genómica de DNMT`S en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés). En la tabla 3 se enlista el número de acceso de la página web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para cada secuencia consultada y la secuencia obtenida a partir de la revisión bibliográfica.

TABLA 3. Secuencia y número de acceso de oligos			
Oligo	Sentido	Secuencia	Número de acceso al GenBank
DNMT3B y DNMT3B1	Fw	5'-TTCTCGGCTCTGATCTTCATC-3'	NM_175848
	Rv	5'-AAACCCAACAACAACACGCAAC-3'	
GAPDH	Fw	5'-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT-3'	NC_000012.12
	Rv	5'-CCATGGTGTCTGAGCGATGT-3'	

FW= Forward, Rv= Reverse

Una vez que se había determinado la región que se iba a analizar, se procedió a verificar el diseño de los primers los cuales fueron empleados para amplificar DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 y a GAPDH tomando en cuenta algunas características como su especificidad, la temperatura de “melting” y su % de GC. En el diseño de oligonucleótidos existen una serie de parámetros que se deben tomar en cuenta para asegurar que nuestros oligonucleótidos serán capaces de amplificar sin mayor complicación la secuencia a estudiar:

Especificidad: se verificó con ayuda de una herramienta bioinformática, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Temperatura de “melting”: se calculó con la aplicación de las fórmulas a continuación mencionadas en la tabla 4

Tabla 4. Temperatura de “Melting” Primers	
TEMPERATURA DE MELTING	FORMULA
Primers ≤20pb	De Wallace $Tm = [(2(A+T)) + (4(G+C))]$
Primers >20-100pb	$Tm = 67.5 + 0.34(\%(C+G)) - 395/\text{longitud}$

Tm= Temperatura de “melting” o de fusión.

Para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de Guanina-Citosina se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%GC = ((G+C) / (A+T+G+C)) \times 100$$

Posteriormente se mandaron a sintetizar los primers a la empresa T4Oligo® e IDT® y una vez que fueron entregados, al estar liofilizados, se les añadió agua MQ en el caso de GAPDH, en la Tabla 5 se muestran las cantidades, y para DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 se procedió a agregar 500 µl de Buffer IDTE (10Mm Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8). Una vez hidratados los primers, se cuantificaron y se prepararon alícuotas de 50µl de cada uno de ellos.

Tabla 5. Hidratación de primers		
Primer	Sentido	H ₂ O MQ (µl)
GAPDH	Fw	1284.6 µl
	Rv	1089.6 µl

FW= Forward, Rv= Reverse

8.9 Amplificación de DNMT3B y su isoforma en línea celular MDA-MB-231 por PCR en punto final

La línea celular fue obsequiada por el Dr. Eduardo Pérez, del Departamento de Biología Celular del laboratorio número 42, del CINVESTAV, la cual es una de las más utilizadas para el estudio experimental *in vitro* del CM

Se realizó la PCR en punto final utilizando los primers de la tabla 3 para verificar su especificidad. Esta PCR se llevó a cabo en la línea celular MDA-MB-231 mediante el uso del kit Roche®, para lo cual se preparó la mezcla maestra utilizando las siguientes cantidades para DNMT3B y su isoforma 3.5 µl de Buffer, 1 µl de DNTPs, 0.5 µl de primer forward, 0.5 µl de primer reverse, 10.3 µl de Taqpol. 9.2 µl de agua miliQ y 5 µl de ADNc y para GAPDH 3.5 µl de Buffer, 1 µl de DNTPs, 0.5 µl de primer forward, 0.5 µl de primer reverse, 10.3 µl de Taqpol. 9.2 µl de agua miliQ y 5 µl de ADNc. Las reacciones se llevaron a cabo en un

termociclador (NYX-TECHNIK) y las condiciones se muestran en la tabla 6 para DNMT3B y su isoforma y en la tabla 7 para GAPDH

Tabla 6. Condiciones del termociclador para PCR de las DNMT's.			
Paso	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	5min
2	Desnaturalización	95	30seg
3	Alineamiento	60	30seg
4	Elongación	72	1min
5	40ciclos del paso 2 al 4		
6	Extensión final	72	10min

Tabla 7. Condiciones del termociclador para GAPDH			
Paso	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	5min
2	Desnaturalización	95	30seg
3	Alineamiento	60	30seg
4	Elongación	72	1min

Una vez realizada la PCR se preparó un gel de agarosa al 1 %, para poder comprobar la presencia de los productos de PCR.

8.10 Amplificación de las muestras por PCR en tiempo real con SYBR® Green

Con la finalidad de cuantificar los niveles de expresión de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 se realizó una cuantificación relativa la cual midió los cambios en el estado basal del gen (DNMT3B y DNMT3B1) versus el gen de expresión constante que actuaría (GAPDH). Por lo cual fue necesario normalizar los datos entre el valor que se obtiene para el gen blanco y el gen de referencia.

8.10.1 Cuantificación relativa normalizada

Se realizó una serie de diluciones (1:10) para llevar a cabo las reacciones de amplificación, las cuales se realizaron por triplicado para cada muestra (DNMT3B y su isoforma y GAPDH). En cada análisis de expresión, se preparó una mezcla de reacción suficiente para todas las reacciones, evitando así que existiera variación técnica en los resultados por efecto de la variación en concentración de los componentes.

La PCR en tiempo real de las DNMT's y de GAPDH para la normalización se realizó con la línea celular MDA-MB-231 mediante el kit Integrated DNA Technologies SYBR® GreenER™ qPCRSuperMix Universal, la master mix se preparó en un tubo eppendorf estéril de 0.6 en un volumen final de 20 µl, adicionando 1.25 µl de primer, agua 3.75 µL, 10 µl de Sybr Green y posteriormente se adicionaron 5 µl de ADNc, esto para DNMT3B y su isoforma. En el caso de GAPDH la master mix se preparó en un tubo eppendorf estéril de 0.6

en un volumen final de 20 μ l, adicionando 0.4 μ l de primer forward, 0.4 μ l de primer reverse, 4.2 μ L agua, 10 μ l de Sybr Green y posteriormente 5 μ L de ADNc. Las muestras se realizaron por triplicado. Las condiciones utilizadas se muestran en la tabla 8 para DNMT3B y su isoforma y en la tabla 9 para GAPDH.

Tabla 8. Condiciones del termociclador para PCR de DNMT'S			
Paso	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	90	10 min
2	Alineamiento	95	15 seg
3	Elongación	60	1min
4	40ciclos del paso 2 al 4		

Tabla 9. Condiciones del termociclador para PCR GAPDH			
Paso	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización	90	10 min
2	Alineamiento	95	15 seg
3	Elongación	64	1min
4	40ciclos del paso 2 al 4		

Una vez realizada la normalización se realizó la amplificación de las muestras y los controles para obtener los valores del ciclo umbral (ct) registrado en el software CFX de BIO-RAD, para ello se llevó a cabo la amplificación de GAPDH y de DNMT3B y su isoforma en las 16 muestras, la preparación del mix y las condiciones fueron las mismas que las mencionadas anteriormente.

8.10.2 Método $\Delta\Delta CT$

Este método usa fórmulas aritméticas para lograr un resultado para la cuantificación relativa y tiene algunas modificaciones de acuerdo al tipo de datos de PCR que se obtengan, en este caso cuando se presentan los datos para los estudios de perfiles de expresión génica y dado que se querrá para normalizar los datos a un control interno es apropiado utilizar $2^{-\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008)

Dónde: $\Delta C_T = CT \text{ gen interés} - CT \text{ control interno}$

Una vez que se obtuvieron los resultados de expresión de las muestras problema, se tomó el valor de Ct para DNMT3B y su isoforma y para GAPDH. Con estos valores posteriormente se sustituyeron en la formula previamente mencionada.

8.11 Prueba estadística

Como prueba estadística se utilizara χ^2

IX. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE **RESULTADOS**

9.1 Datos clínicos de las pacientes

En la tabla 10 se muestran algunos de los datos obtenidos en el cuestionario aplicado a las pacientes como son la edad, el estado pre o pos menopáusico y antecedentes familiares a cáncer.

Tabla 10. Datos clínicos de las pacientes				
Numero	Edad	Pre-menopáusica	Pos-menopáusica	Antecedentes Familiares de cáncer
Muestras				
1	71		•	Si
2	59		•	Si
3	53		•	No
4	46	•		Si
5	47		•	No
6	64		•	Si
7	74		•	Si
8	82		•	Si
Promedio 8/16	62			
Controles				
9	40	•		Si
10	38	•		Si
11	50	•		No

12	27	•		Si
13	74		•	No
14	37	•		Si
15	27	•		No
16	22	•		Si
Promedio (8/16)	39			
Promedio Total (16/16/)	51			

Una vez obtenidos los datos se analizaron a través de estadística descriptiva calculando la media, obteniéndose lo siguiente:

La media de edad para todas las pacientes incluidas en el estudio (16/16) fue de 51 años, para los casos fue de 62 años, en donde la paciente más joven tenía 46 años y la más longeva 82 años y para los controles la media de edad fue de 39 años, en donde la paciente más joven tenía 22 años y los más longevos 74 años, lo que se relaciona a lo mencionado por American Cancer Society que el riesgo de padecer CM incrementa conforme aumenta la edad ya que aproximadamente uno de ocho cánceres de mama se detecta en mujeres menores de 45 años de edad, mientras que aproximadamente dos de tres cánceres invasivos del seno se encuentran en mujeres de 55 años o más (Cancer.org, 2016).

Con respecto al estado de menopausia de las pacientes se obtuvo que para los casos 7/8 eran pos-menopáusicas y 1/8 pre-menopáusica. Caso contrario en los controles ya que 7/8 eran pre-menopáusicas y 1/8 pos-menopáusicas, lo cual se relaciona con el estrógeno que es la hormona que se libera durante el ciclo menstrual de las mujeres ,y dado que la menopausia es la etapa en la cual la mujer deja de producir estrógenos en los ovarios, conlleva a que el cáncer tenga su mayor incidencia en esta etapa de vida, uno de los factores de riesgo del CM

es entrar en la menopausia después de los 55 años, una mujer con una menopausia natural a los 45 años tiene la mitad de riesgo de padecer CM que la mujer que tiene la menopausia a los 55 años. (Breast Cancer, 2016)

En cuanto a los antecedentes familiares se encontró para los casos que 6/8 tenían antecedentes de algún tipo de cáncer, y en los controles se encontró que 5/16 tenían antecedentes de algún tipo de cáncer.

9.1.2 Estadío clínico y tipo de cáncer

El estadio clínico y el tipo de cáncer que presenta cada paciente son proporcionados a través de los estudios histopatológicos previamente realizados en la biopsia. Existen dos tipos principales de CM ductal y lobulillar, de acuerdo al lugar de origen, el grado de invasividad y apariencia de las células bajo el microscopio (Carlson y Allred, 2009) y en función de su comportamiento de crecimiento, se clasifican en: *in situ* e infiltrante, además de que también son clasificados en estadios según la extensión de la enfermedad, es decir, si está limitado a una zona de la mama o si se ha propagado hacia tejidos sanos dentro de la mama o hacia otras partes del cuerpo.

De acuerdo a los resultados histopatológicos revisados en el expediente de cada paciente en la tabla 11 se muestra el estadio clínico, la TNM y el tipo de cáncer que padecían.

En relación al estadio clínico del 100 % de las paciente (8/8), se encontró que 4/8 (50%) presentó EC IIA, 3/8 presentó EC IIB y 1/8 presentó EC 0

En cuanto al tipo de cáncer que presentaron tenemos que 7/8 presentaron cáncer de tipo ductal y 1/8 lobulillar, lo que coincide con lo revisado en la literatura en la cual se menciona que aproximadamente el 80% de los carcinomas son ductales, y el resto, lobulillares (Brandan y Col, 2006). De acuerdo a la clasificación del CM en función de su comportamiento de crecimiento, tenemos que 2/8 fueron *in situ* y 6/8 de tipo infiltrante.

De acuerdo al sistema TNM 3/8 presentaron la clasificación T2N1M0, 2/8 T2N2M0, 1/8 T0N0M0, 1/8 T1N0Mx y el ultimo 1/8 T2N1Mx.

En la tabla se muestran marcadas con un asterisco (*) las muestras que presentaron amplificación del gen problema, lo cual se retoma para su análisis en el apartado 9.9

Tabla 11. Estadio clínico y tipo de cáncer			
	Estadio clínico	TNM	Tipo de cáncer
1*	EC IIB	T2N1M0	Carcinoma de conductos mamarios infiltrante sin patrón específico
2	EC 0	T0N0M0	Carcinoma ductal in situ
3	EC IIB	T2N1M0	Carcinoma de conductos mamarios infiltrante sin patrón específico
4*	EC II A	T2 N1 Mx	Carcinoma ductal in situ
5	EC IIB	T2N1M0	Carcinoma lobulillar infiltrante
6*	EC II A	T1 N0 Mx	Carcinoma de conductos infiltrante
7	EC II A	T2N2M0	Carcinoma de conductos mamarios infiltrante sin patrón específico
8*	EC III A	T3N2M0	Carcinoma de conductos mamarios infiltrante

EC= Estadio clínico, TNM= Tumor (T), Ganglios (N), Metástasis (M). Se muestra el EC de cada una de las muestras con CM, su clasificación TNM y el tipo de cáncer que presentó cada muestra, además que se marca con * las muestras que presentaron amplificación para DNMT3B y su isoforma DNMT3B1

9.1.3 Receptores esteroideos y de factor de crecimiento

A continuación se muestra en la tabla 12 la positividad a RE, RP y HER2/neu de las 8 pacientes con CM, se puede observar para cada una de ellas un signo (+) y un porcentaje que se encuentra en un rango de 5-100 % esto en el caso de RE y RP. En cuanto a HER2/neu se muestra si es positiva o negativa para cada una de las muestras con cáncer.

Tabla 12. Receptores esteroideos y de factor de crecimiento			
	Receptor de estrógenos (RE)	Receptor de progesterona (RP)	Receptor Her2/Neu
1*	(+)100%	(+)80%	1(-)
2	(+)30%	(+)10%	2(+)
3	(+)80%	(+)5%	1(-)
4*	(+)70%	(+)90%	2(+)
5	(-)	(-)	3(+)
6*	(-)	(-)	3(+)
7	(-)	(-)	2 (+)
8*	(-)	(-)	2(+)

Características histopatológicas de las 8 muestras con CM, se indica la positividad que presentan las muestras con CM y su porcentaje además que se marca con * las muestras que presentaron amplificación de DNMT3B y su isoforma.

En cuanto a los datos obtenidos como podemos observar 4/8 presentan positividad tanto para RE como para RP. En el caso de Her2/Neu podemos observar que se presenta 6/8 de positividad. De las 8 muestras como se observa en la tabla 4 de ellas aparecen marcadas con un asterisco (*) para señalar la amplificación del gen problema, lo cual se detalla más adelante en el apartado 9.9

9.2 Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN se realizó por medio de espectrofotometría, con ésta lo que se hace es medir la absorción de luz ultravioleta en un espectrofotómetro (Roca, Oliver y Rodríguez, 2003). Obteniendo valores que se encontraron en un rango de 254.6 - 554.1 ng/ µl para los casos, 503.1-895.12 ng/ µl para los controles y de 585 ng/ µl para la línea celular. Esta cuantificación fue de utilidad para determinar la cantidad necesaria que se utilizó al realizar la síntesis de ADNc por medio del kit comercial promega, el cual nos menciona que es necesario adicionar 1 µg de ARN para llevar a cabo la síntesis (Bio-rad, 2016).

La contaminación de las muestras con impurezas orgánicas e inorgánicas (p.ej. fenol, cloroformo), y proteínas afecta de forma significativa la sensibilidad y especificidad del resultado, por lo que es necesario determinar el grado de pureza del ARN obtenido. Para poder comprobar esta posible contaminación se determina el grado de pureza del ARN para lo cual se lee también la absorbancia a una relación de A260/280, si esta relación es próxima a 1.8, es probable que la absorción se deba mayoritariamente a la presencia de ácidos nucleicos; si la relación es inferior a 1.6 es probable que exista una importante cantidad de otros compuestos que actúen como contaminantes, como proteínas, fenol residual u

otros compuestos orgánicos; y si la relación es superior a 2.0 indica una probable degradación de los ácidos nucleicos purificados (Roca, Oliver y Rodríguez, 2003). Los valores de pureza obtenidos en todas las extracciones de ARN tanto para los casos, los controles y línea celular, es idónea de acuerdo a lo anteriormente mencionado, ya que se obtuvieron rangos entre 1.81 y 1.99, por lo que se puede afirmar que no hay contaminación ya que ninguna se encuentra por debajo de 1.8 o en 2.

9.3 Cuantificación de ADNc

Una vez realizada la síntesis de ARN se cuantificó el ADNc por medio de espectrofotometría. El objetivo de realizar la cuantificación del ADNc fue determinar la cantidad que se utilizó para realizar la PCR.

Los valores obtenidos en la cuantificación para los casos se encuentran en un rango de 1296.9- 2219.5 ng/ μ l, 1330.1- 2050.16 ng/ μ l para los controles y 1508.56 ng/ μ l para la línea celular. Con respecto a la pureza obtenida, esta fue idónea, de acuerdo a lo anteriormente mencionado encontrándose los valores entre 1.8 y 1.9 tanto para los casos, los controles y la línea celular.

9.4 Integridad del ARN muestras y controles

El estudio de integridad del ARN por electroforesis es el complemento al análisis integral de cantidad y calidad del ARN, necesario para llevar a cabo la transcripción inversa y las posteriores PCRs de manera exitosa (Díaz y Col., 2013). La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar los ácidos nucleicos, los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma (Padilla y Col., 2016).

Para observar la integridad del ARN de las muestras y los controles antes de realizar la técnica de RT-PCR se realizó la electroforesis del ARN con un gel de

agarosa al 1% con esto podemos observar la integridad del ARN por la presencia de las dos bandas superiores que marcan dos subunidades, la subunidad 28s y la subunidad 18s. y la subunidad 4-5S. Las bandas las podemos observar en la figura 13 y 14 las cuales corresponden a la integridad del ARN extraído a partir de los casos y controles respectivamente, cabe señalar que en el caso de los controles se observan solo la subunidad 28s y la subunidad 18s, lo que nos indica que el ARN en ambos casos (muestras y controles) está en buenas condiciones y no se presenta degradado.

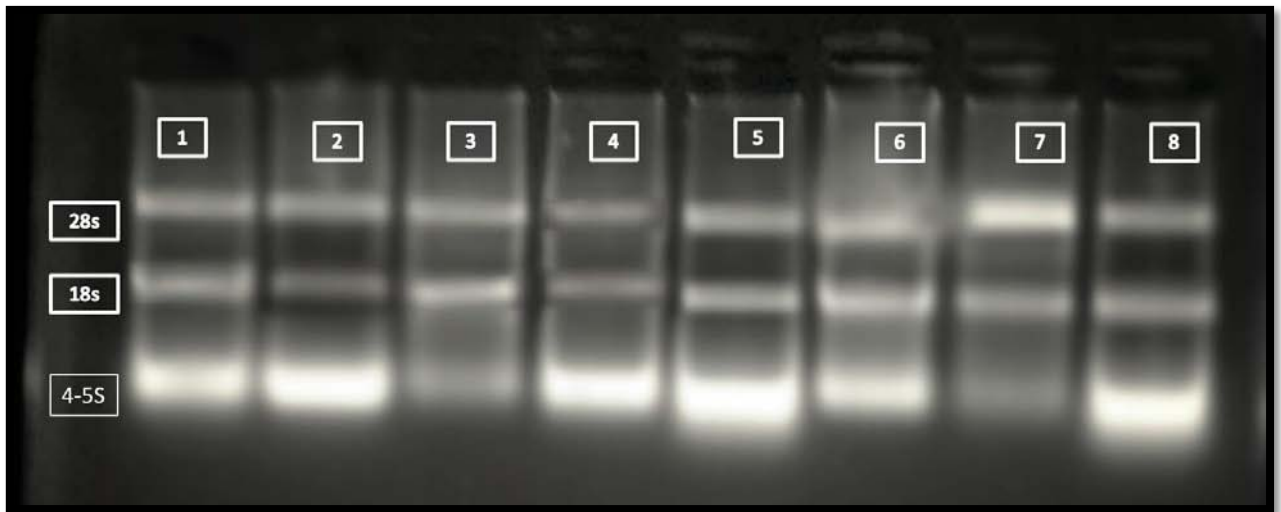


Figura 13. Integridad del ARN de los 8 casos.

Carriles del 1-8 muestras de pacientes con cáncer de mama en las que se observan las 3 bandas correspondientes a las fracciones ribosomales 28s, 18s y 4-5s

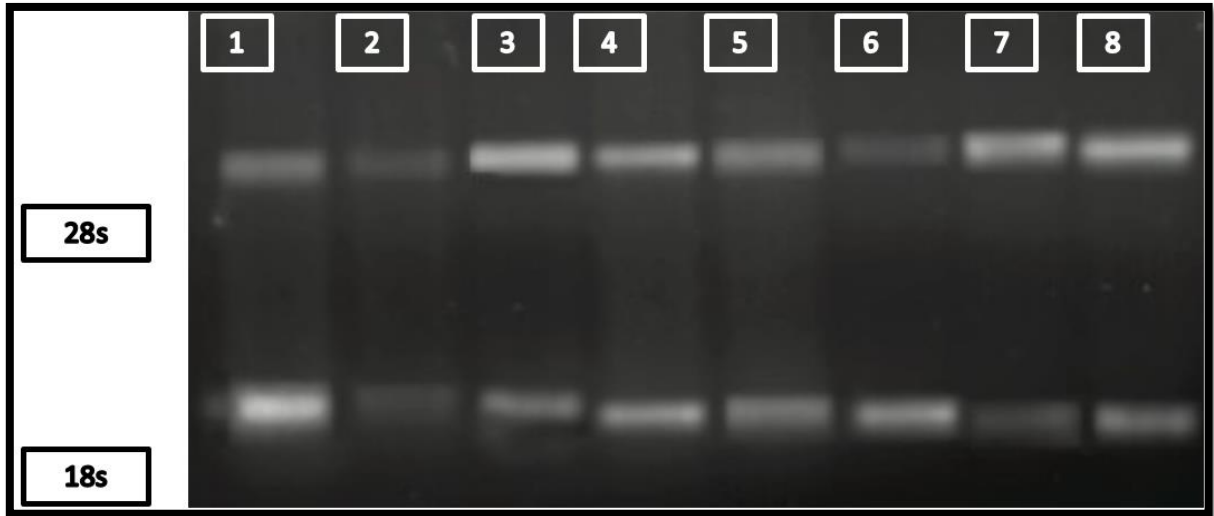


Figura 14. Integridad del ARN de los 8 controles.

Carriles del 1-8 muestras controles en las que se observan 2 bandas correspondientes a las fracciones ribosomales 28s y 18s

9.5 Verificación de Primers

Para amplificar los genes por PCR a partir de las secuencias de GAPDH, DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 depositadas en la base de datos NCBI, lo primero que se hizo fue verificar su especificidad y a través de la herramienta bioinformática BLAST para conocer el producto de amplificación que se esperaba. A continuación se muestra en la tabla 13 y 14 las secuencias de amplificación y el producto de PCR para DNMT3B y GAPDH respectivamente.

Diseñar cuidadosamente los primers es un aspecto importante en la PCR ya que el mal diseño de éstos puede amplificar otros fragmentos distintos a los buscados (amplificación inespecífica) por lo cual es recomendable tomar en consideración algunas características como su longitud, la temperatura de “melting” o de fusión y su % de GC. Estas características mencionadas anteriormente se muestran a continuación en la tabla 15.

Características fisicoquímicas de los primers obtenidas a partir de la aplicación de las formulas mencionadas en el apartado 8.8.

Una vez aplicadas las formulas mencionadas en el método, se compararon los valores obtenidos. Teniendo lo siguiente:

- La longitud de los primers se encuentra entre los 19 y 21 pb, por lo que se encuentran dentro del rango recomendado que es entre 18-30 pb (IDT,2016)
- La temperatura de “melting” (T_m) se encuentra en un rango de 62 a 65 el cual está dentro del recomendado que es de 60-65 (IDT,2016)
- Con respecto al %G-C el que se recomienda está en un rango de 35-65 % además que las secuencias del primer no deben contener regiones de 4 o más residuos G consecutivos (IDT, 2016). Aunado a lo anterior como se puede observar se cumple con ambas características ya que él % G-C está entre 47-60 %

Tabla 13. Homo sapiens ADN (citocina-5-)-metiltransferasa 3 beta	
	DNMT3B y DNMT3B1
Forward	5'-AAACCCAACAACACGCAAC-3'
Reverse	5'-TTCTCGGCTCTGATCTTCATC-3'
Reverse	3'-GATGAAGATCAGAGCCGAGAA-5'
Secuencia Amplificada	AAACCCAACAACACGCAAC CAGAGAACAAGACTCGAAGA CGCACAGCTGACGACTCAGCCACCTCTGACTACTGCCC CGCACCCAAGCGCCTCAAGACAAATTGCTATAACAACGG CAAAGACCGAGGG GATGAAGATCAGAGCCGAGAA
Tamaño producto PCR	150 pb

Tabla 14. GAPDH (Glyceraldehido-3-Fosfato-Deshidrogenasa)	
	GAPDH
Forward	5' - CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT - 3'
Reverse	5' - CCATGGTGTCTGAGCGATGT -3'
Reverse	3' - ACATCGCTCAGACACCATGG -5'
Secuencia Amplificada	CGCTCTCTGCTCCTCCTGTT CGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTT GCGTCGCCAGCCGAGCC ACATCGCTCAGACACCATGG
Tamaño producto PCR	321 pb

Tabla 15. Características fisicoquímicas de los primers					
Primer	Sentido	Longitud (pb)	Tm(°C)	%GC	Cuantificación (pmol/μl)
DNMT3B	Fw	19	62.7	47.4	105
	Rv	21	64.7	47.6	105
GAPDH	Fw	20	64	60	103
	Rv	20	62	55	103

9.6 PCR en punto final de GAPDH y DNMT3B en la línea celular MDA-MB-231

Una vez finalizada la reacción de PCR de la línea celular MDA-MB-231 se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio los productos de PCR, para corroborar la especificidad de los primers en la línea celular y comprobar su tamaño de amplificación. Como se muestra en la figura 15, se puede observar de izquierda a derecha la presencia de las bandas correspondientes a la amplificación de GAPDH y DNMT3B respectivamente.

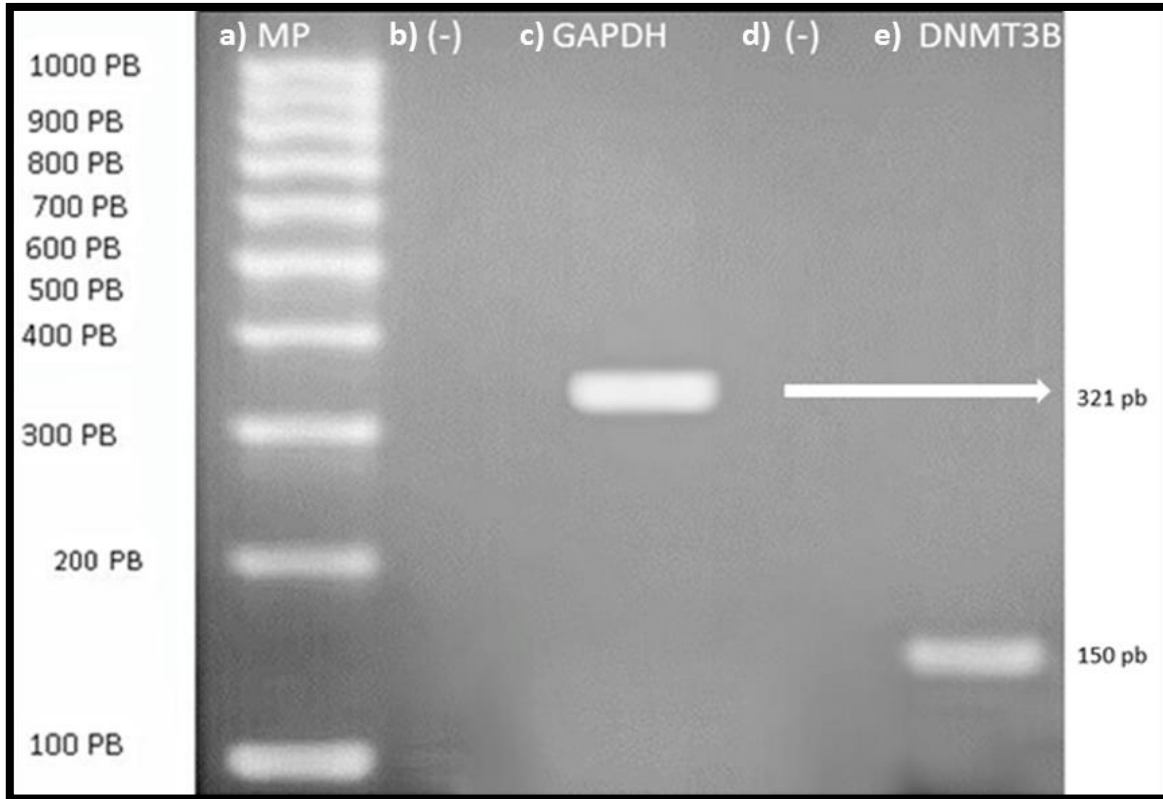


Figura 15. Tamaño de amplificación de GAPDH, DNMT3B y su isoforma DNMT3B1.

a) MP: Marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb. b) (-) control negativo para el gen de referencia GAPDH. c) GAPDH con un producto de 321 pb, d) (-) control negativo para DNMT3B y su isoforma DNMT3B1. e) DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 con un producto de amplificación de 150 pb.

- GAPDH: Como se observa en la figura 14 se muestra la presencia de la banda correspondiente a GAPDH, para el cual el producto de PCR es de 321 pb, lo que indica que es específico y se está amplificando de manera correcta ya que se tiene el producto esperado como se puede ver la banda por encima de las 300pb y en el caso del negativo ninguna amplificación.
- DNMT3B y su isoforma: En el caso del primer utilizado para amplificar a DNMT3B y que también es capaz de amplificar su isoforma DNMT3B1,

como podemos ver en la figura 14 se muestra la presencia de la banda correspondiente al producto de PCR esperado que es de 150 pb, lo que indica que está amplificando de manera correcta en la línea celular MDA-MB-231.

Con esto se puede asegurar que los primers tanto del gen de referencia GAPDH, como de DNMT3B y de su isoforma DNMT3B1 son específicos, es decir que amplifican solamente los fragmentos de interés y con esto se garantiza los resultados obtenidos en las posteriores PCRs

9.7 Amplificación por PCR en tiempo real.

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en el desarrollo de la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para saber la expresión de DNMT3B en las muestras de tejido mamario.

La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, por lo que se llevó a cabo la normalización, para la cual lo primero que se realizó fue una curva estándar de DNMT3B con el control endógeno que se seleccionó (GAPDH). En la figura 16 se muestra la curva estándar para DNMT3B. Para la curva se realizaron una serie de 3 diluciones por triplicado con un factor de dilución 1:10 (400, 40,4 ng de ADNc). En el caso del gen de referencia GAPDH que se muestra en la figura 17 la curva se realizó a 5 puntos para lo cual se llevaron a cabo 5 diluciones con un factor de dilución 1:10 (400, 40, 4,0.4, 0.04 ng de ADNc)

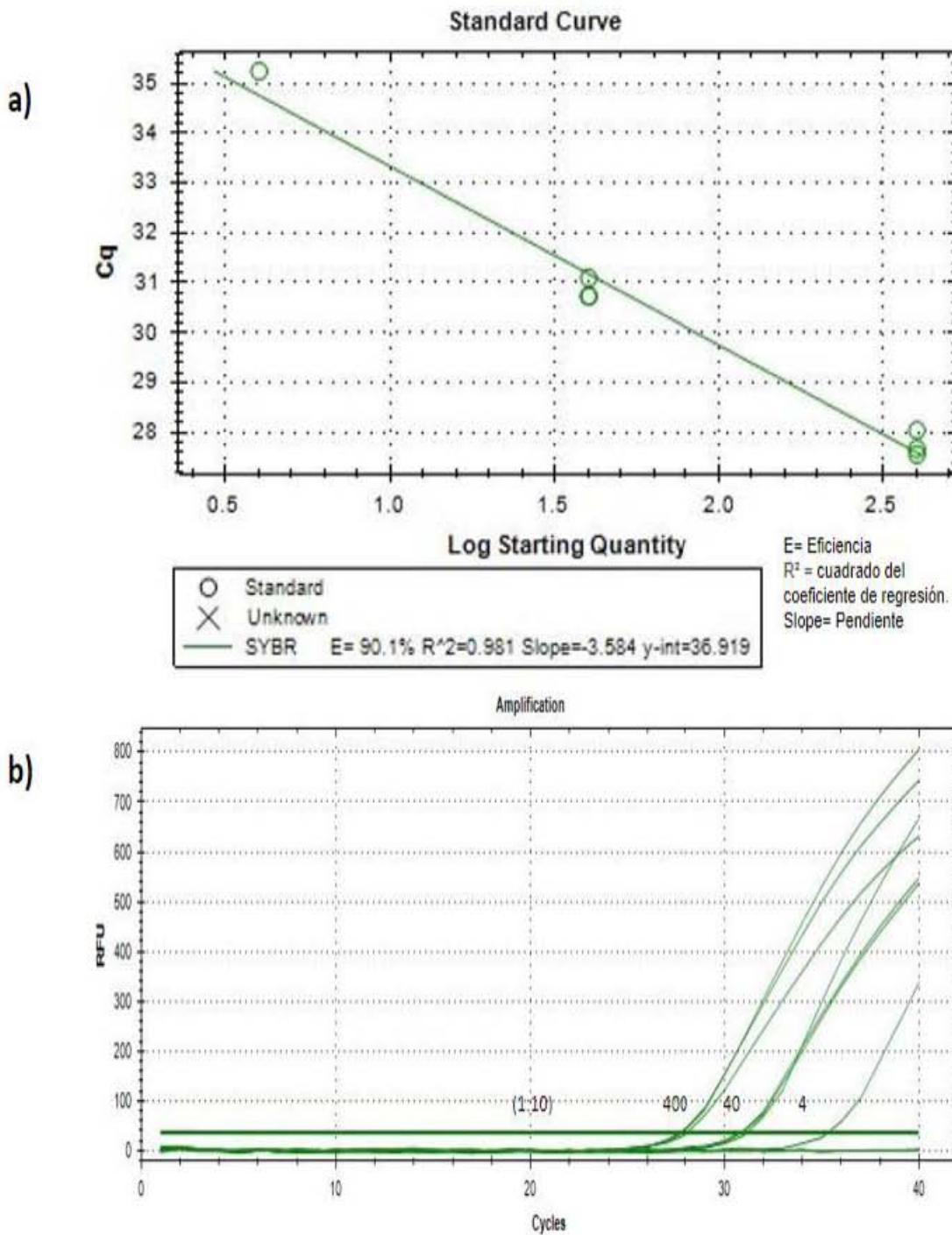


Figura 16. Normalización DNMT3B y su isoforma.

a) Regresión lineal de las diluciones (1:10) de DNMT3B. b) Se observa en la gráfica el inicio de la amplificación de las diluciones (1:10) de DNMT3B.

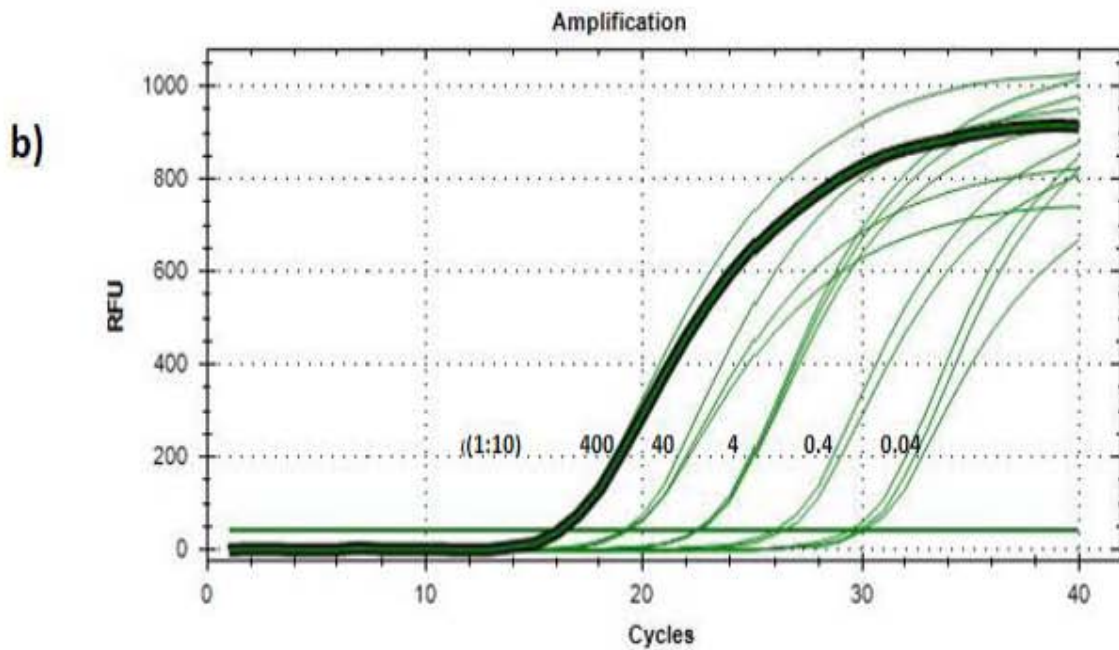
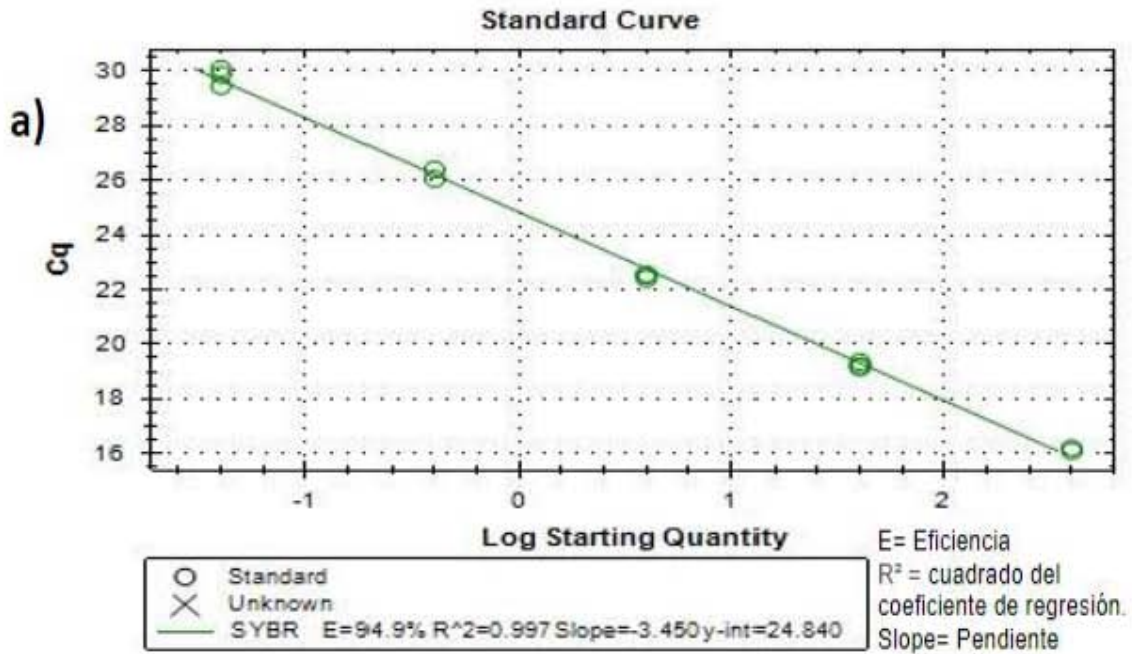


Figura 17. Normalización gen de referencia GAPDH.

a) Regresión lineal de las diluciones (1:10) de GAPDH. b) Se observa en la gráfica el inicio de la amplificación de las diluciones (1:10) de GAPDH.

En base a lo que se observa en las figuras 16 y 17 en ambas se muestran las eficiencias de amplificación, la cual es de 90.1% para DNMT3 y de 94.9% para GAPDH. Si bien no se obtuvieron eficiencias de 100% ya que la pendiente fue mayor a -3.3 y la eficiencia (100 %) se define por una pendiente de -3,32 ambas se encuentran en el rango de eficiencias aceptables para ensayos de RT-PCR (-2,92 y -3,92 con una Eficiencia = 100 ± 20 %) (Yun, 2006).

Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004), es importante mencionar que la eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o ADNc en cada ciclo (Bustin & Nolan, 2004). Una pendiente de -3.32 indica una eficiencia de reacción del 100%, valores más negativos (ej.-3.6) representan reacciones menos eficientes y pendientes más positivas que -3.3 (ej. -2.8) pueden indicar baja calidad de la muestra (Yuan, y Col, 2006). En ambos casos los valores de las pendientes son de -3.5 y -3.4 para DNMT3B y GAPDH respectivamente lo que indica que su eficiencia es menor del 100 % pero no se ve afectada la calidad de las muestras.

En cuanto al Valor de r^2 este es el cuadrado del coeficiente de regresión el cual nos indica cómo se ajustan nuestros datos en la línea. El análisis de regresión lineal de la curva estándar debe mostrar una alta correlación (un coeficiente > 0.98), y cómo podemos observar el valor obtenido es el adecuado (Burns y Col, 2005)

9.8 Amplificación por PCR en tiempo real de muestras y controles con el gen de referencia GAPDH

Se realizó la amplificación de las 16 muestras (8 muestras con CM y 8 controles) con el gen de referencia GAPDH. En la figura 19 se observa la amplificación de las 8 muestras con CM y en la figura 18 se puede observar la amplificación de las 8 muestras control.

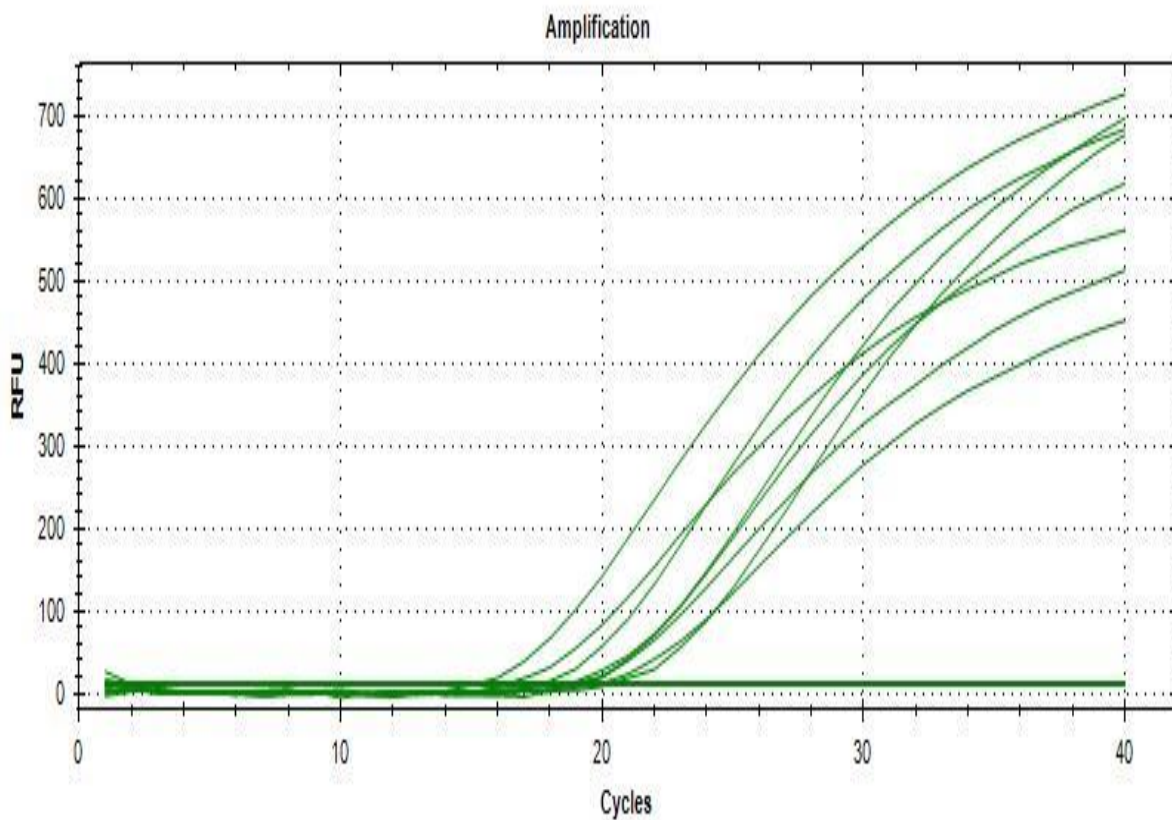


Figura 18. Amplificación de GAPDH en 8 controles por PCR en tiempo real.

Se observa que el inicio de la amplificación se encuentra entre el ciclo 16 y el ciclo 20

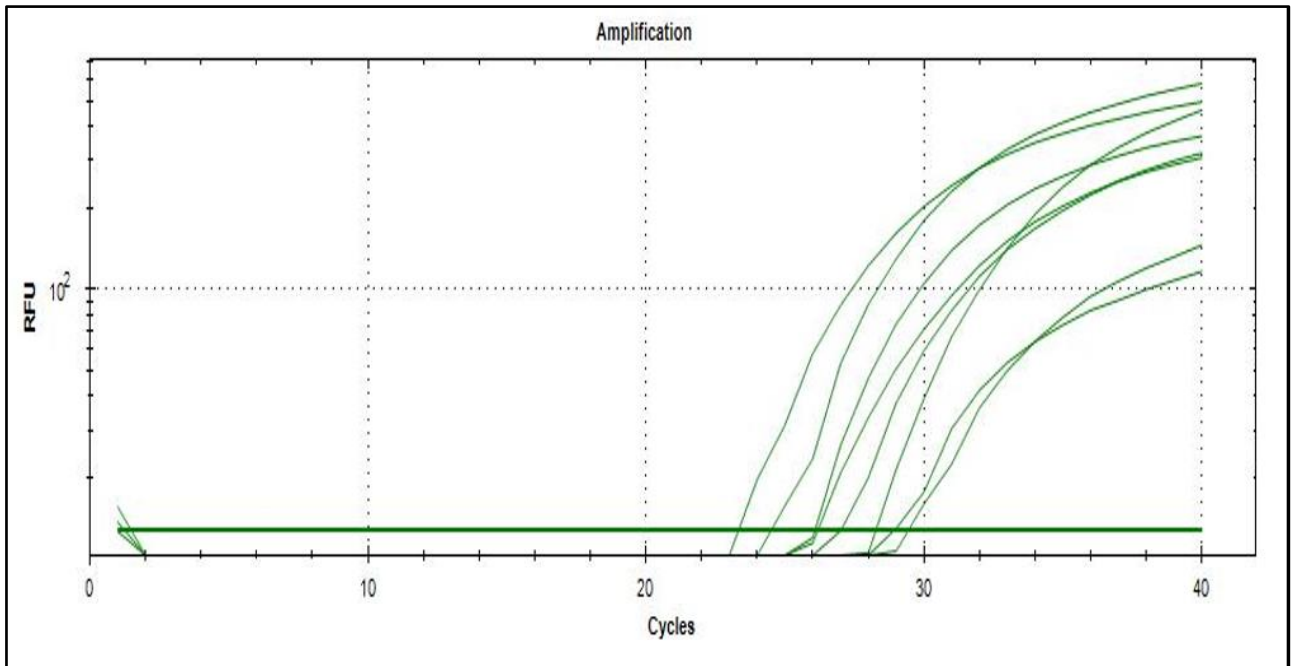


Figura 19. Amplificación de GAPDH en muestras con cáncer de mama por

Se observa que el inicio de la amplificación se encuentra entre del ciclo 23 y el 29

La finalidad de realizar la amplificación fue para corroborar la presencia de GAPDH en las 16 muestras ya que éste actuó como gen de referencia, y juega un papel importante ya que para llegar a conclusiones válidas en cualquier estudio de expresión génica es muy importante contar con un gen de referencia. Un gen de referencia ideal es aquel que se expresa en todos los tipos celulares y no se ve afectado por procesos patológicos ni por el procedimiento experimental (Kriegova y Col 2008). El gen de referencia que se utilizó fue el Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que es uno de los genes de referencia más utilizados ya que de acuerdo a estudios realizados en genes de referencia, éste se muestra estable bajo varias condiciones experimentales (Lü y Col., 2014), además de que es utilizado como normalizador en estudios de cáncer de mama y líneas celulares con RT- qPCR, ya que cuando se llevó a cabo una revisión en la base de datos

PubMed , casi la mitad de las publicaciones indicó que se utilizó GAPDH como gen de referencia para la normalización de la expresión génica (Liu y Col., 2015).

Los resultados del RT-PCR en tiempo real mostraron que todas las muestras (16/16) amplificaron para el gen de referencia GAPDH, y tuvieron un ct antes de los 30 ciclos, como se puede observar en la figura 19 para las muestras con CM y en la 18 para los controles, estos valores son importantes de considerar ya que un valor Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en el estudio (Dorak, 2016).

9.9 Amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 por PCR en tiempo real de muestras y controles y su cuantificación

Una vez que se corroboró la presencia del gen de referencia en las 16 muestras y se observó su presencia en todas se prosiguió a realizar la amplificación del gen DNMT3B y su isoforma.

A continuación se muestran los resultados de la RT-PCR en tiempo real en la figura 20 para los controles (8/16) y en la figura 21 de las muestras con CM (8/16).

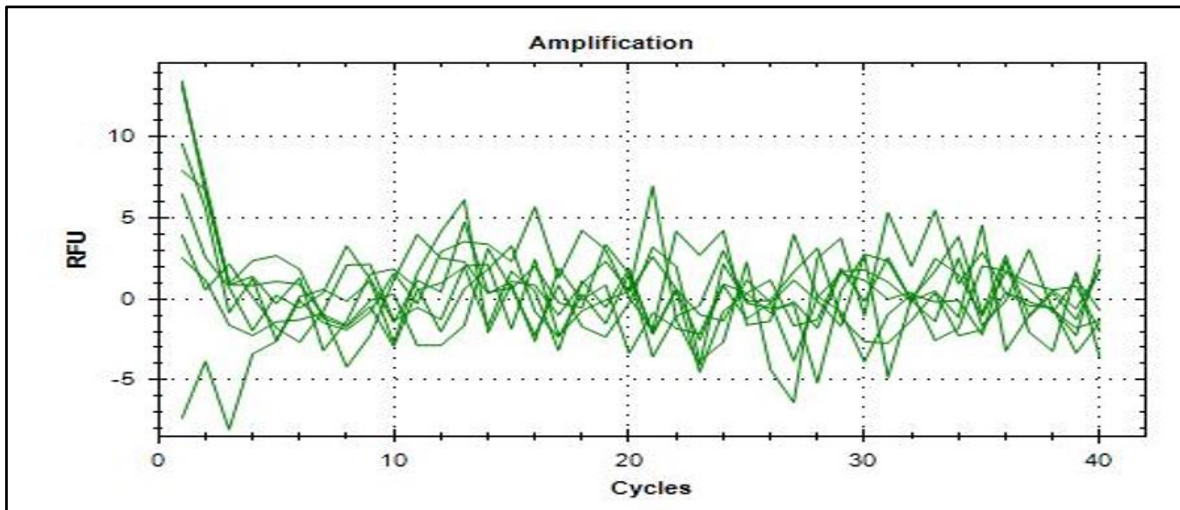


Figura 20. Amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 en controles por PCR en tiempo real.

Se observan picos inespecíficos durante la amplificación lo cual demuestra que no hay amplificación

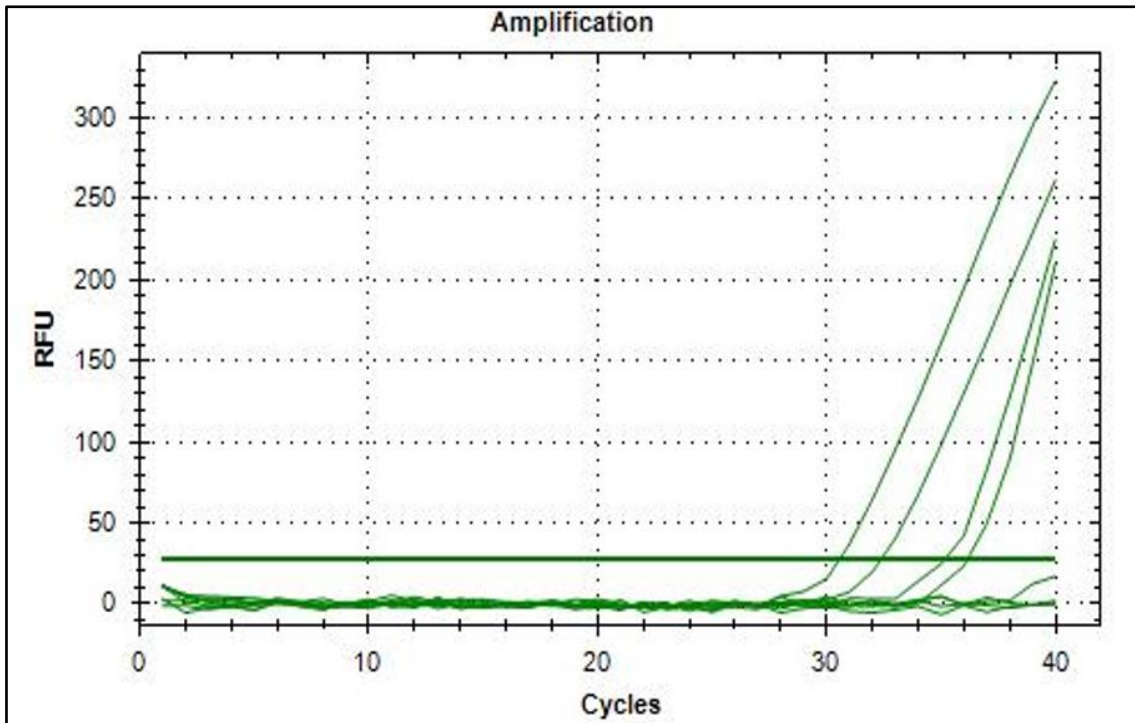


Figura 21. Amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 en 8 muestras CM por PCR en tiempo real.

De un total de 8 muestras con cáncer de mama amplificaron 4

Una vez obtenido el ct en los casos y controles se aplicó la fórmula mencionada en el método (apartado 8.10.2), esto para 4/8 muestras ya que 4/8 muestras no presentaron amplificación. Los valores obtenidos fueron de 0.0018, 0.0060, 0.0018, 0.0050 de la muestra 1 a la 4 respectivamente.

Como podemos apreciar en la figura 20 en la cual se muestra la amplificación de DNMT3B y su isoforma en las muestras control se observan picos inespecíficos dado que no se está presentando amplificación. Esto lo podemos explicar ya que el gen humano DNMT3B se expresa abundantemente en las células madre embrionarias, pero su expresión se reduce a su diferenciación y sigue siendo baja

en los tejidos somáticos adultos (Passarge, E. 2009), además de que en algunos estudios realizados se han identificado las transcripciones aberrantes de DNMT'S en células cancerígenas pero no en células normales (R. Hameed y S. Raimondi,2015) y debido a la presencia de mínimas cantidades no fue posible detectarlas por este método.

En cuanto a los resultados del RT-PCR en tiempo real para las muestras con CM como podemos ver en la figura 21 del total de muestras (8/16) solo 4/16 amplificaron para DNMT3B y su isoforma, presentando un ct antes de los 40 ciclos, por lo tanto como se puede observar de acuerdo a los resultados obtenidos de la RT-PCR no se encontró sobreexpresión de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 en las muestras con CM por lo que no se pudo comprobar lo antes mencionado en el estudio realizado por Kar y Col. En el cual menciona que hay una alta expresión de DNMT3B en tumores primarios de CM (Kar y Col, 2014).

9.10 Correlación de la expresión de la DNMT's 3b y 3b1 con los datos

Tabla 16. Estadio clínico y características histopatológicas de los casos					
	Estadio clínico	Receptor de estrógenos (RE)	Receptor de progesterona (RP)	Receptor Her2/Neu	Valor ct
1*	EC IIB	(+)100%	(+)80%	1(-)	0.0018
4*	EC II A	(+)70%	(+)90%	2(+)	0.0060
6*	EC II A	(-)	(-)	3(+)	0.0018
8*	EC III A	(-)	(-)	2(+)	0.0050

Relación de la expresión de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 en las muestras con CM con el estadio clínico y las características histopatológicas de cada uno de ellas. Tabla 3

En cuanto a la relación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 con las características histopatológicas como podemos observar en la tabla 16 en la cual se muestra la relación de las muestras amplificadas con DNMT3B y su isoforma y en las tablas 12 y 13 las cuales muestran las características histopatológicas de las 8 muestras no hay una relación relevante entre la amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 con dichas características, esto coincide con otro estudio el cual reporta que no se encontró una correlación significativa entre la expresión de DNMT3B y los parámetros patológicos como RE, RP, Her2/Neu (Ben Gacem y Col, 2012),

X. CONCLUSIONES

X. CONCLUSIONES

Los primers utilizados en este trabajo fueron específicos al realizarse la verificación de éstos.

Con respecto a la presencia de DNMT3B y su isoforma en la línea celular positiva para cáncer de mama MDA-MB-231, se confirmó la presencia del gen de estudio.

La expresión de DNMT3B y DNMT3B1, por PCR en tiempo real mostró la amplificación solo en 4 casos, observándose una subexpresión.

La relación entre las muestras que presentaron amplificación de DNMT3B y su isoforma DNMT3B1 con el estadio clínico del CM y la expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y Her 2/Neu no fue relevante

XI. PERSPECTIVAS

XI. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones mostrados en esta tesis las perspectivas de trabajo se orientan en dos direcciones principalmente, la primera de ellas sería aumentar el número de muestras para el estudio y de esta manera verificar si las variables planteadas en el trabajo se mantienen y la segunda de ellas sería dar un mayor enfoque en cuanto a la especificidad agregando un ensayo de PCR con sondas taqman detectando específicamente la aparición del producto deseado la cual mostraría algunas ventajas frente a Sybr Green que fue utilizado en el estudio ya que con las sondas taqman la fluorescencia que se produce es específica de la amplificación que se esté estudiando, además permite que se usen varios fluorocromos en la misma reacción y detectar varios DNA/RNA al mismo tiempo.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado gradual para la realización de estudios.

La M. en C. Mónica Sierra, investigador responsable del proyecto y la cual reconoce el compromiso que implica solicitar y aplicar la carta de consentimiento informado, se ha encargado de explicarme los pormenores del mismo. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Si tengo alguna duda deberé comunicarme con ella al teléfono 57477560 ext. 7475 o acudir personalmente a la Unidad de Investigación, laboratorio 2 del Hospital Juárez de México.

Al firmar este documento, yo accedo voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Nombre del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Anexo 2. Cuestionario de cáncer de mama

	CUESTIONARIO DE CANCER DE MAMA	
---	---------------------------------------	---

No. De Paciente _____	Elaboró _____	Fecha _____
-----------------------	---------------	-------------

<u>DATOS GENERALES</u>	
Nombre: _____	
No. De Expediente: _____	
Fecha de Nacimiento: _____	
Estado Civil: _____	Ocupación: _____
Dirección: _____	
Teléfono: _____	

<u>ANTECEDENTES PERSONALES</u>	
HÁBITOS	
Tabaquismo: No. De años _____	No. De cigarrillos al día _____
Alcoholismo: No. De años _____	No. De copas al día _____
Drogadicción: No. De años _____	Tipo: _____

<u>ANTECEDENTES GINO-OBSTÉTRICOS</u>		
Menarca _____	IVSA _____	Edad de la primera gesta _____
Gesta _____	Abortos _____	Para _____ cesárea _____
Ritmo _____		
Meses de lactancia por niño _____		
Métodos anticonceptivos _____		
Tiempo de uso _____		
Edad de menopausia _____	causa _____	

<u>MORFOMETRÍA</u>	
PESO _____	TALLA _____

PATOLOGÍA CRÓNICA NO NEOPLÁSICA

1. Diabetes _____ 2. Hipertensión arterial _____ 3. Obesidad _____ 4. Artritis Rumatoide _____

5. Cardiopatía isquémica _____ 6. Infecciones tipo _____

otras _____

PATOLOGIA MAMARIA PREVIA

1. Fibroadenoma _____ 2. Mastopatía fibroquistica _____ 3. Mastitis aguda (con o sin absceso) _____

4. Mastitis crónica _____ 5. Adenomas _____ 6. Papiloma _____ 7. Otros especificar _____

Lado de presentación _____ Edad de presentación _____

Comentarios: _____

NEOPLASIA MAMARIA ACTUAL

Tiempo de haberse detectado el tumor _____

lado _____ cuadrante _____ diametro en cms. _____

Paget positivo? _____

Piel: 1. Ulceración 2. Retracción 3. De naranja 4. Inflamación

Ganglios positivos:

Localización _____ Número _____ Diámetro Máximo _____

Estado de la mama contralateral _____

Describir alteraciones

Metástasis detectables clínicamente _____ sitio _____

Etapa clínica T _____ N _____ M _____

LABORATORIO DE PATOLOGÍA			
Citología No. De estudio	_____	Diagnóstico	_____
Biopsia: No. De estudio	_____	Diagnóstico	_____
Pieza quirúrgica	_____	1. cuadrantectomía	2. Mastectomia simple
		3. Mastectomia radical modif.	4. Otra
Tipo celular:	1. Ductual	2. Lobulillar	3. Otros
Grado de diferenciación	1. Buena	2. Moderada	3. Pobre
Grado nuclear de Black	_____	4. Indiferenciada	

CIRUGÍA MAMARIA INICIAL			
Fecha:	_____	Indicación:	1. Terapéutica 2. Limpieza

TRATAMIENTO NO QUIRÚRGICO PREOPERATORIO			
1. Quimioterapia	2. Radicación	3. Inmunoterapia	
Quimioterapia	Droga	Dosis/m2	ciclos
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
Radioterapia			
Sitio	_____	Dosis total	_____
		No. De sesiones	_____
Inmunoterapia			
Tipo	_____	Dosis total	_____
		No. De sesiones	_____
Fecha de inicio	_____	Fecha de terminación	_____

TRATAMIENTO NO QUIRÚRGICO POSTOPERATORIO			
1. Quimioterapia	2. Radicación	3. Inmunoterapia	
Quimioterapia	Droga	Dosis/m2	ciclos
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
Radioterapia			
Sitio	_____	Dosis total	_____
		No. De sesiones	_____
Inmunoterapia			
Tipo	_____	Dosis total	_____
		No. De sesiones	_____
Fecha de inicio	_____	Fecha de terminación	_____

HISTORIA DE NEOPLASIA EN LA FAMILIA

ÁRBOL GENEALÓGICO



XIII. BIBLIOGRAFIA

Aapola, U., Liiv, I., & Peterson, P. (2002). Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic acids research*, 30(16), 3602-3608.

Abeloff, M. D. A., Kastan, J. O., McKenna, M. B., Niederhuber, W. G., & Abeloff, J. E. M. D. (2005). *Oncología clínica*. Elsevier,.

Acevedo J.C, Rojas G. (2012). *Cáncer de mama: No le des la espalda*. Chile: Aguilar.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *La Célula*. 3ª edición. España: Omega, 2002.

Antequera, F., & Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11995-11999.

Arce, C., Villaseñor, Y., Gamboa, C., Lara, F., Pérez, V. and Villarreal, P. (2011). Onco guía Cáncer de mama. [online] Available at: <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1327324685.pdf> [Accessed 22 Jan. 2016].

Atcc.org, (2016). MDA-MB-231 ATCC ® HTB-26™ Homo sapiens mammary gland/breast. [online]: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx> [consultado el 15 Feb. 2016].

Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., & Ingram, V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells: the carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *Journal of molecular biology*, 203(4), 971-983.

Bio-rad. (2016). Script tm Reverse Transcription supermix from RT-qPCR. [online] Available at: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10020178.pdf> [Accessed 15 Mar. 2016].

Brandan M., Villaseñor Y. *Detección del cáncer de mama: estado de la mamografía en México*. Instituto Nacional de Cancerología, UNAM. 2006.

Breast Cancer Organization. Obtenida el 8 de abril de 2015 de <http://www.breastcancer.org/>

Breastcancer.org. (2013). Estado de los receptores de hormonas. [online] Available at:

http://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estado_hormonal [Accessed 29 Apr. 2016].

Breastcancer.org. (2013). Factores de riesgo del cáncer de mama . [online] Available at: http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/riesgo/factores [Accessed 14 Apr. 2016].

Burns, M. J., Nixon, G. J., Foy, C. A., & Harris, N. (2005). Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods—evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC biotechnology*, 5(1), 1.

Buryanov, Y. I., & Shevchuk, T. V. (2005). DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification. *Biochemistry (Moscow)*, 70(7), 730-742.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.

Cancer.Net(2015)<http://www.cancer.net/es/tipos-decancer/cancer-de-mama/estadios> (consultado el 10 de febrero del 2016)

Cancer.org. (2016). ¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de seno. [online] Available at: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-causas-factores-de-riesgo> [Accessed 14 Apr. 2016].

Carlson R, Allred D, Anderson B, Burstein H, Carter W and Edge S. Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2009;7:122-192

Carrillo, R. (2016). ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN CÁNCER DE MAMA Cáncer de mama. [online] Docplayer.es. Available at: <http://docplayer.es/446156-Estrategias-terapeuticas-en-cancer-de-mama-raul-carrillo-vicente-oncologia-medica-hgu-santa-lucia-cartagena-murcia.html> [Accessed 26 Feb. 2016].

Clark, S. J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P. L., & Frommer, M. (2006). DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature protocols*, 1(5), 2353-2364.

- Clarke, R. B. (2003). Steroid receptors and proliferation in the human breast. *Steroids*, 68(10), 789-794.
- Corner, J., & Bailey, C. D. (Eds.). (2009). *Cancer nursing: care in context*. John Wiley & Sons.
- Couse, J. F., & Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. *Endocrine reviews*, 20(3), 358-417.
- Deroo, B. J., & Korach, K. S. (2006). Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*, 116(3), 561-570.
- Díaz-Alonso, C., Garrote-Santana, H., Amor-Vigil, A. M., Suárez-González, Y., & González-Mugica Romero, R. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(3), 298-303.
- Dickson, R. B., & Stancel, G. M. (2000). Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 27(27), 135-145.
- Dorak, M. (2016). Real-Time PCR [M.Tevfik DORAK]. [online] Dorakmt.tripod.com. Available at: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html> [Accessed 18 May 2016].
- Dupont, W. D., Page, D. L., Parl, F. F., Vnencak-Jones, C. L., Plummer Jr, W. D., Rados, M. S., & Schuyler, P. A. (1994). Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *New England Journal of Medicine*, 331(1), 10-15.
- Dworkin, A. M., Huang, T. H. M., & Toland, A. E. (2009, June). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 19, No. 3, pp. 165-171). Academic Press.
- Easton, D. F., Steele, L., Fields, P., Ormiston, W., Averill, D., Daly, P. A., ... & Cannon-Albright, L. A. (1997). Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *American journal of human genetics*, 61(1), 120.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., & Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human

DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic acids research*, 10(8), 2709-2721.

Fernández M. (2006) Avances del cáncer de mama. Real Academia Nacional de medicina. MADRID

Fleming, I. D., Phillips, J. L., & Menck, H. R. (1996). The national cancer data base report on completeness of American joint committee on cancer staging in United States cancer facilities. *Cancer*, 78(7), 1498-1504.

Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A., & Goldgar, D. E. (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet*, 343(8899), 692-695.

Freshney, R. I. (Ed.). (2000). *Animal cell culture: a practical approach* (Vol. 8). Oxford:: IRL press.

Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., & Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature genetics*, 24(1), 88-91.

Gabriel, J. A. (Ed.). (2007). *The biology of cancer*. John Wiley & Sons.

Gacem, R. B., Hachana, M., Ziadi, S., Abdelkarim, S. B., Hidar, S., & Trimeche, M. (2012). Clinicopathologic significance of DNA methyltransferase 1, 3a, and 3b overexpression in Tunisian breast cancers. *Human pathology*, 43(10), 1731-1738.

Gail, M. H., Brinton, L. A., Byar, D. P., Corle, D. K., Green, S. B., Schairer, C., & Mulvihill, J. J. (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute*, 81(24), 1879-1886.

García Alonso, R. (2007). Las huellas de la Evolución. *Lulu. com España Disponible: <http://books.google.es/books?id=wdWY3X-tYoEC&printsec=frontcover&dq=evolucion+de+las+personas&hl=es&sa=X&ei=nTAFU8esErXIsASq8IDgAw&ved=0CDkQ6AEwAjo#v=onepage&q=evolucion%20de%20las%20personas&f=false>*, 356.

Gehring, M., Reik, W., & Henikoff, S. (2009). DNA demethylation by DNA repair. *Trends in Genetics*, 25(2), 82-90.

- Gervais-Fagnou, D. D., Girouard, C., Laperriere, N., Pintillie, M., & Goss, P. E. (1999). Breast cancer in women following supradiaphragmatic irradiation for Hodgkin's disease. *Oncology*, *57*(3), 224-231.
- Girault, I., Tozlu, S., Lidereau, R., & Bièche, I. (2003). Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clinical Cancer Research*, *9*(12), 4415-4422.
- GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Obtenida el 8 de abril de 2015 de <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>
- Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, *74*, 481-514.
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C. L., Zhang, X., ... & Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, *311*(5759), 395-398.
- Goyal, R., Reinhardt, R., & Jeltsch, A. (2006). Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic acids research*, *34*(4), 1182-1188.
- Gullick, W. J., & Srinivasan, R. (1998). The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer. In *Prognostic variables in node-negative and node-positive breast cancer* (pp. 133-143). Springer US.
- Hameed, R., & Raimondi, S. L. (2015). The role of aberrant DNMT3Bs in tumor progression. *Cancer Cell & Microenvironment*, *2*(3).
- Harris, C. C. (1991). Tumour suppressor genes, multistage carcinogenesis and molecular epidemiology. *IARC scientific publications*, (116), 67-85.
- Harris, J. R., Lippman, M. E., Osborne, C. K., & Morrow, M. (2010). *Diseases of the Breast*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Haslam, S. Z., Counterman, L. J., & Nummy, K. A. (1993). Effects of epidermal growth factor, estrogen, and progestin on DNA synthesis in mammary cells in vivo are determined by the developmental state of the gland. *Journal of cellular physiology*, *155*(1), 72-78.

- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-2054.
- Hermann, A., Gowher, H., & Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(19-20), 2571-2587.
- Hultborn, K. A., Larsson, L. G., & Ragnhult, I. (1955). The lymph drainage from the breast to the axillary and parasternal lymph nodes, studied with the aid of colloidal Au198. *Acta Radiologica*, 43(1), 52-64.
- IDTdna.com. (2016). Designing PCR Primers and Probes. [online] Available at: <https://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/pipet-tips/decoded/2013/10/21/designing-pcr-primers-and-probes> [Accessed 13 Apr. 2016].
- INEGI, I. (2015). Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). [online] Inegi.org.mx. Available at: <http://www.inegi.org.mx> [Accessed 17Nov 2015].
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.
- Kaminker, P., & Kaminker, P. (2007). Epigenética, ciencia de la adaptación biológica heredable. *Arch. argent. pediatr*, 105(6), 529-531.
- Kar, S., Sengupta, D., Deb, M., Shilpi, A., Parbin, S., Rath, S. K., ... & Patra, S. K. (2014). Expression profiling of DNA methylation-mediated epigenetic gene-silencing factors in breast cancer. *Clinical epigenetics*, 6(1), 1.
- Katzenellenbogen, B. S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T. R., Martini, P. G., Montano, M., ... & Katzenellenbogen, J. A. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 74(5), 279-285.
- Knaul, F. M., López Carrillo, L., Lazcano Ponce, E., Gómez Dantés, H., Romieu, I., & Torres, G. (2009). Cáncer de mama: un reto para la sociedad y los sistemas de salud. *Salud pública de México*, 51, s138-s140.

- Kriegova, E., Arakelyan, A., Fillerova, R., Zatloukal, J., Mrazek, F., Navratilova, Z., ... & Petrek, M. (2008). PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. *BMC molecular biology*, 9(1), 1.
- Kullmann, K., Deryal, M., Ong, M. F., Schmidt, W., & Mahlknecht, U. (2013). DNMT1 genetic polymorphisms affect breast cancer risk in the central European Caucasian population. *Clinical epigenetics*, 5(1), 1.
- La Salle, S., & Trasler, J. M. (2006). Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Developmental biology*, 296(1), 71-82.
- Lee, P. D., Sladek, R., Greenwood, C. M., & Hudson, T. J. (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Research*, 12(2), 292-297.
- Li, X. Q., Guo, Y. Y., & De, W. (2012). DNA methylation and microRNAs in cancer. *World J. Gastroenterol*, 18(9), 882-888.
- Lim, M. S. P., Neilsen, P., Kumar, R., Abell, A., & Callen, D. F. (2011). The application of delivery systems for DNA methyltransferase inhibitors. *BioDrugs*, 25(4), 227-242.
- Linhart, H. G., Lin, H., Yamada, Y., Moran, E., Steine, E. J., Gokhale, S., ... & Meissner, A. (2007). Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes & development*, 21(23), 3110-3122.
- Liu, L. L., Zhao, H., Ma, T. F., Ge, F., Chen, C. S., & Zhang, Y. P. (2015). Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. *PloS one*, 10(1), e0117058.
- Liu, L., Wylie, R. C., Andrews, L. G., & Tollefsbol, T. O. (2003). Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mechanisms of ageing and development*, 124(10), 989-998.
- Longnecker, M. P. (1994). Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes & Control*, 5(1), 73-82.

- López, F. M. (2011). *Juan Rof Carballo y la medicina psicosomática: Entre la teoría: J. Rof Carballo y la praxis: A. Fernández-Cruz*. Ediciones Díaz de Santos.
- Lü, Z. C., Wang, L. H., Dai, R. L., Zhang, G. F., Guo, J. Y., & Wan, F. H. (2014). Evaluation of endogenous reference genes of *Bactrocera* (*Tetradacus*) *minax* by gene expression profiling under various experimental conditions. *Florida entomologist*, 97(2), 597-604.
- Martínez-Carpio, P. A., & Moreno, M. Á. N. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Revista de Oncología*, 5(4), 184-191.
- Misas, J. P. R. Tesis doctoral análisis del programa de detección precoz del cáncer de mama en Jaén y del carcinoma de intervalo en Andalucía.
- Montgomery, K. G., Liu, M. C., Eccles, D. M., & Campbell, I. G. (2004). The DNMT3B C→ T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Research*, 6(4), 1.
- Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W., & Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics*, 14(suppl 1), R47-R58.
- Müller-Esterl, W. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Reverté.
- Muñoz, G. H., Barros, A. C., & Del Castillo, R. (2006). *Ganglio centinela en mastología*. Ed. Médica Panamericana.
- Naghitorabi, M., Asl, J. M., Sadeghi, H. M. M., Rabbani, M., Jafarian-Dehkordi, A., & Javanmard, H. S. (2013). Quantitative evaluation of DNMT3B promoter methylation in breast cancer patients using differential high resolution melting analysis. *Research in pharmaceutical sciences*, 8(3), 167.
- Nakayama, T. J., Rodrigues, F. A., Neumaier, N., Marcelino-Guimarães, F. C., Farias, J. R., De Oliveira, M. C., ... & Nepomuceno, A. L. (2014). Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. *Genet Mol Res*, 13, 860-871.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., ... & Gustafsson, J. Å. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*, 81(4), 1535-1565.

- Novik, K. L., Nimmrich, I., Genc, B., Maier, S., Piepenbrock, C., Olek, A., & Beck, S. (2002). Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Current issues in molecular biology*, 4, 111-128.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.
- OSORIO MARTINEZ, E. S. (2012). *ANALISIS DEL PATRON GLOBAL DE METILACION DEL DNA EN CANCER DE MAMA EN MUJERES MEXICANAS*(Doctoral dissertation).
- Ottman, R., King, M. C., Pike, M., & Henderson, B. (1983). Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *The Lancet*, 322(8349), 556-558.
- Padilla, C., Diez, J. and Martínez, E. (2016). Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. [online] Universidad de Cordoba. Available at: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf> [Accessed 2 Apr. 2016].
- Passarge, E. (2009). *Genética texto y atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- Pérez J.M, Muñoz E, Cortes J. (2013) *Comprender el cáncer de mama*. Barcelona.
- Peter, C. J., & Akbarian, S. (2011). Balancing histone methylation activities in psychiatric disorders. *Trends in molecular medicine*, 17(7), 372-379.
- Peyrat, J. P., & Bonneterre, J. (1992). Type 1 IGF receptor in human breast diseases. *Breast cancer research and treatment*, 22(1), 59-67.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, 89-113.
- Phillip Rubin. (2002). *Oncología Clínica*. España: Elsevier .Pub.; 2008.
- PIMS Prevención en Salud. (2014). ESTADIOS DE CÁNCER DE MAMA. [online] Available at: <https://pimssalud.wordpress.com/2014/08/29/estadios-de-cancer-de-mama/> [Accessed 29 Apr. 2016].

- Piñero Madrona, A., Merck Navarro, B., & Parrilla Paricio, P. (2006). Factores pronósticos y estadificación del cáncer de mama. *Cirugía de la mama. Guías clínicas de la asociación española de cirujanos*, 24, 221-233.
- Poblete, M. T. (2001). Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuad. cir.(Valdivia)*, 15(1), 74-79.
- Pouliot, M. C., Labrie, Y., Diorio, C., & Durocher, F. (2015). The role of methylation in breast cancer susceptibility and treatment. *Anticancer Research*, 35(9), 4569-4574.
- QFB HERNÁNDEZ MARTÍNEZ, M. E. L. I. S. S. A. *Modulación de la metilación de genes en células de cáncer de mama por (-)-Epicatequina y (+)-Catequina de Theobroma Cacao* (Doctoral dissertation).
- Quintela Fandiño, M. Á. (2006). Impacto pronóstico de las células tumorales residuales aisladas en sangre periférica en cáncer de mama de alto riesgo.
- Ravdin, P. M., Cronin, K. A., Howlader, N., Berg, C. D., Chlebowski, R. T., Feuer, E. J., ... & Berry, D. A. (2007). The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *New England Journal of Medicine*, 356(16), 1670-1674.
- Robertson, K. D., Keyomarsi, K., Gonzales, F. A., Velicescu, M., & Jones, P. A. (2000). Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic acids research*, 28(10), 2108-2113.
- Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. M. (2004). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Editorial Hélice.
- Rodríguez, M. and Rodríguez, W. (2006). INT-UNAM. [online] Available at: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf [Accessed 2 May 2016].
- Rountree, M. R., Bachman, K. E., & Baylin, S. B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature genetics*, 25(3), 269-277.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.

- Siedlecki, P., & Zielenkiewicz, P. (2006). Mammalian DNA methyltransferases. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*, 53(2), 245.
- Sobin LH. & Wittekind, C. (Eds). (1997) TNM classification of malignant tumors, 5th, Wiley-liss.
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (Eds.). (2010). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons.
- Struewing, J. P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S. M., Berlin, M., McAdams, M., ... & Tucker, M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine*, 336(20), 1401-1408.
- Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A., & Anant, S. (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in oncology*, 4, 80.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2, 10-78.
- Toth, M., Müller, U., & Doerfler, W. (1990). Establishment of de novo DNA methylation patterns: transcription factor binding and deoxycytidine methylation at CpG and non-CpG sequences in an integrated adenovirus promoter. *Journal of molecular biology*, 214(3), 673-683.
- Turek-Plewa, J. U. S. T. Y. N. A., & Jagodzinski, P. P. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 631.
- Valdespino-Gómez, V. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2012). Terapia epigenética en el cáncer. Logros y perspectivas. *Cir Cir*, 80, 470-480.
- Van Vliet, J., Oates, N. A., & Whitelaw, E. (2007). Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cellular and molecular life sciences*, 64(12), 1531-1538.
- Veeck, J., & Esteller, M. (2010). Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to microRNAs. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(1), 5-17.

Winer, E., Morrow, M., Osborne, C. K., & Harris, J. R. (2001). Risk Factors For Breast Cancer. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 1653-1654.

World Health Organization: WHO 2012. www.who.int/ (Consultado el de 20 diciembre del 2015)

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W. W., ... & Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236(1), 87-95.

Yoder, J. A., & Bestor, T. H. (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Human molecular genetics*, 7(2), 279-284.

Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, 7(1), 1.

Yun, J. J., Heisler, L. E., Hwang, I. I., Wilkins, O., Lau, S. K., Hyrcza, M., ... & Der, S. D. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic acids research*, 34(12), e85-e85.