



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Evaluación del grado de metilación del gen *ESR1* en pacientes
con cáncer de mama hormono-dependiente”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

NIDYA DÍAZ CAMAL

ASESORES:

DR. en C. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

DRA. en C. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ

CUAUTITLÁN, IZCALLI ESTADO DE MÉXICO 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación del grado de metilación del gen ESR1 en pacientes con cáncer de mama hormono-dependiente.

Que presenta la pasante: **Nidya Díaz Camal**

Con número de cuenta: **309244512** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Marzo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Dr. en C. Octavio Daniel Reyes Hernández	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

DEDICATORIA

Para:

Gloria Angélica Camal Pérez: No conozco a alguien más perseverante, valiente y fuerte que tú. Sin ti difícilmente habría logrado ser lo poco que soy ahora, te lo agradezco todo. Has sido madre, amiga y guía. Lo eres todo, mi heroína. ¡Que fortuna tan grande es ser tu hija!

Carolina Díaz Camal: Reconozco en ti una mujer digna, trabajadora y tenaz. Espero algún día acercarme un poquito y lograr lo que tú. Me colma de orgullo saberme tu hermana, muy a pesar de que estés un poco fea. *Love ya, sis.*

Luis Enrique Díaz Magaña: Rastreo mis primeras memorias en las que denoté interés en la ciencia y apareces en ellas, en casa experimentando con un juego de química. Mezclaste algunos reactivos al azar en tubos de ensaye; a los pocos minutos se generó un gas. Mi hermana y yo gritábamos eufóricas por la emoción mientras tú, asustado, nos sacabas de la habitación por seguridad. Ya no estás para verlo, pero sin quererlo tú me iniciaste en esto y me encanta. Gracias, papi.

Gloria Pérez de Camal: A mis seis años accidentalmente acabé con la vida de un canario. Sin una pizca de morbo ni regaños, me sugeriste diseccionarlo para averiguar “cómo era por dentro”. Me explicaste cada órgano, convidándome de tu maravillosa curiosidad, yo estaba fascinada. Tal vez tú no lo recuerdas, pero aquella gentileza marcó mi vida y mi futuro. Gracias, abuelita Llolly.

Mis profesores: Qué admirable virtud es saberse el pilar de una mejor calidad de vida para cada uno de los jóvenes que cruzamos las aulas. Durante diecinueve años me llevé un poquito de todos para formar la mujer que soy el día de hoy, estoy totalmente agradecida.

UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Colegio de Ciencias y Humanidades Vallejo. Es un orgullo pertenecer a la Máxima Casa de Estudios. Dejaré en alto tu nombre laborando con ética, profesionalismo, competencia y moral con el objetivo de colocar otro peldaño, aunque sea pequeño, para engrandecer nuestra patria.

¡¿Cómo no te voy a querer?!

¡Si mi corazón azul es y mi piel dorada, siempre te amaré!

AGRADECIMIENTOS

A:

Dr. en C. Octavio Daniel Reyes Hernández: Por apoyarme en esta etapa, brindarme parte de sus conocimientos y principalmente le agradezco por su basta paciencia y comprensión infinitas. Gracias por creer en mí al permitirme ser parte de este proyecto.

Dra. en C. Gabriela Figueroa González: Por todas sus aportaciones y comentarios a este trabajo.

Dra. en C. Claudia Vanessa Arellano Gutiérrez: Siempre te miré como una mujer asombrosa y capaz, con disposición de ayudar a los demás a través de una dulce calidad humana. Deseo de todo corazón que esas cualidades siempre brillen en ti. Gracias por todo, Vane.

Pacientes de oncología del Hospital Juárez de México: Agradezco su nobleza y bondad al acceder a participar en este proyecto con la esperanza de que, mediante la investigación, cada vez menos mujeres atraviesen por el tortuoso camino del cáncer de mama.

Las muestras empleadas en este proyecto se obtuvieron a través del protocolo con número de registro HJM-0012/15-I.

“El científico no desafía al universo, lo acepta. El universo es el plato que saborea, el reino que explora, es su aventura y su delicia inagotable, es complaciente e huidizo, nunca obtuso; es maravilloso en lo grande y en lo pequeño. En pocas palabras, explorar el universo es la más alta ocupación para el ser humano.”

Isidor Isaac Rabi (1898- 1988)

“La humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio.”

Marie Curie (1867- 1934)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS.....	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
GLOSARIO.....	12
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES.....	16
Epidemiología del cáncer.....	16
Epidemiología del cáncer de mama en México	17
Etiología del CMa	19
Anatomía mamaria	19
Clasificación del cáncer de mama con base en las características radiológicas	21
Características histológicas e inmunohistoquímicas	22
Estrógenos	22
Receptor de estrógenos.....	23
Activación del receptor.....	24
ER α	25
Epigenética	26
Metilación del DNA.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO.....	31
CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	31
CRITERIOS CONSIDERADOS	31
De inclusión	31
De no inclusión	31
METODOLOGÍA.....	32
Material biológico.....	32
Extracción de DNA	32
Evaluación de integridad de DNA	33

Conversión del DNA por Bisulfito.....	33
PCR.....	33
Determinación del estado de metilación	34
Electroforesis	35
Densitometría.....	35
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES	45
PERSPECTIVAS	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXO 1.0.....	51
ANEXO 2.0.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

Figura 1.0 Distribución del CMA por entidad federativa con proyección al 2050.....	18
Figura 2.0 Anatomía mamaria desarrollada de forma normal.....	20
Figura 3.0 Histología normal de la mama en reposo, corte sagital.....	21
Figura 4.0 Estructura química de los estrógenos principales en mujeres.....	23
Figura 5.0 Dominios funcionales del ER.....	24
Figura 6.0 Esquema representativo de la interacción hormona-ligando.....	25
Figura 7.0 Proceso de metilación de la citosina por acción de la DNA-metiltransferasa.....	26
Figura 8.0 Controles de metilación.....	36
Figura 9.0 Amplificación de los sitios susceptibles a metilación.....	37
Tabla 1.0 Condiciones de temperatura del termociclador para conversión del DNA por bisulfito.....	33
Tabla 2.0 Cantidad de los componentes para la técnica de PCR	34
Tabla 3.0 Oligonucleótidos específicos para las condiciones metilado y no metilado.....	34
Tabla 4.0 Condiciones de amplificación.....	35
Tabla 5.0 Ubicación en carriles de casos y controles metilados y no metilados.....	37
Tabla 6.0 Porcentajes de los parámetros clínicos patológicos en relación con el número de pacientes con cáncer de mama	38
Tabla 7.0 Correlación entre el estado de metilación y características clínico patológicas de los grupos en estudio.....	39
Gráfica 1.0 Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer en ambos sexos a nivel mundial vs México en 2018	16
Gráfica 2.0 Tasas estimadas de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres a nivel mundial vs México en 2018.....	17
Gráfica 3.0 Grado de metilación de DNA en pacientes sin cáncer de mama (Controles) y con cáncer de mama.....	40

RESUMEN

El cáncer es considerado un problema de salud pública, siendo el cáncer de mama la primera causa de muerte por enfermedad neoplásica en mujeres a nivel mundial, a pesar de los avances en el diagnóstico precoz y nuevos tratamientos. Esto aunado a la gran necesidad de nuevos tratamientos más eficaces y específicos, ha promovido la búsqueda de nuevos marcadores pronósticos y predictivos que permitan dilucidar la respuesta al tratamiento de un paciente con cáncer, conocer si existe riesgo de recurrencia, así como determinar el tratamiento más adecuado de acuerdo con el perfil molecular tumoral que se presente.

En la actualidad el cáncer también es el resultado de acontecimientos epigenéticos que conducen al desarrollo tumoral produciendo cambios hereditarios de la expresión génica de la célula sin que con ello se deriven cambios en la secuencia de DNA. Esto a nivel molecular, puede ser relacionado con un patrón de metilación que ocurre en la región promotora del gen, vinculada fuertemente con la represión transcripcional de la cromatina, consecuentemente con la pérdida de función de este gen sin producirse por ello cambios en la secuencia nucleotídica.

Es importante la comprensión de los mecanismos epigenéticos pues la accesibilidad de los factores de transcripción se ve alterada. El *ESR1* es uno de los genes que son susceptibles de ser metilados de manera anormal, este codifica para el receptor para estrógenos alfa ($ER\alpha$). En el presente estudio, se evaluó el estado de metilación del DNA en el promotor del gen *ESR1* en tejidos de mama con cáncer, valiéndose de la comparación de dicho estado en tejido mamario no tumoral.

Los resultados de esta investigación muestran que en la mayoría de los casos se observó mayor presencia de DNA no metilado. Estadísticamente no se evidencia una diferencia significativa entre los grupos analizados, sin embargo, otros estudios reportan resultados contrarios.

ABSTRACT

Cancer is considered a public health problem, with breast cancer being the first cause of death due to neoplastic disease in women worldwide, despite advances in early diagnosis and new treatments. This, coupled with the big need for new more effective and specific treatments, has promoted the search for new prognostic and predictive markers to elucidate the response to treatment of a cancer, to know if there is a risk of recurrence and to determine the most appropriate treatment according to the tumor molecular profile that is presented.

Currently, cancer is also the result of epigenetic events that would lead to tumor development producing hereditary changes in cell gene expression without resulting in changes in the DNA sequence. This at the molecular level, can be related to a methylation pattern that occurs in the promoter region of the gene, strongly linked to the transcriptional repression of chromatin, consequently with the loss of function of this gene without producing changes in the nucleotide sequence.

It's important to understand the epigenetic mechanisms because the accessibility of transcription factors is altered. ESR1 is one of the genes that are susceptible of being methylated in an abnormal way, this, codes for the estrogen alpha receptor (ER α). In the present study, the methylation status of the DNA in the promoter of the ESR1 gene in breast cancer tissues was evaluated, using the comparison of said state in non-tumor breast tissue.

The results of this investigation show an increase in methylation status in the analyzed groups, in comparison with the non-methylated group. There is no significant difference between the analyzed groups, however, other studies report contrary results.

GLOSARIO

BIRADS. *Breast Imaging Reporting and Data System*, por sus siglas en inglés. Reporte de imagenología mamaria y sistema de datos. Método para clasificar los hallazgos mamográficos.

CÁNCER. Patología que involucra un crecimiento y división incontrolada de células que han escapado de los mecanismos normales de regulación del ciclo celular.

CÁNCER DE MAM (CMa). Proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos de la mama.

CROMATINA. Conjunto de DNA, histonas y proteínas no histónicas que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas y que constituye el cromosoma eucariótico.

EPIGENÉTICA. La alteración en la expresión del gen, que tiene lugar durante el desarrollo y la proliferación celular, sin ningún cambio en la secuencia del gen.

GENÉTICA. Estudio de la naturaleza, organización, función, expresión, transmisión y evolución de la información genética codificada de los organismos.

ISLA CPG. Regiones ricas en GpC y CpG de 1 kilobase (1 Kb), y están asociadas generalmente al promotor del gen.

METILACIÓN. Modificación que resulta de la adición de un grupo metilo (CH₃) en el carbono 5 de la citosina.

RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ER). Receptores celulares que son activados por la hormona 17β-estradiol o estrógeno. La principal función del receptor de estrógeno es la de actuar como factor de transcripción que se une al DNA con el fin de regular la expresión génica.

RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR). Proteína ubicada dentro de las células que es activada por la hormona esteroidea progesterona.

RECEPTOR NUCLEAR. Proteínas que se encuentran en el interior de células responsables de detectar la presencia de hormonas esteroideas y tiroideas.

SERMs. *Selective estrogen receptor modulators*, por sus siglas en inglés, son los moduladores selectivos de la acción de los estrógenos.

TUMOR BENIGNO. Masa de células donde el crecimiento se localiza en el lugar de origen dentro de un tejido, sin invasión y es maligno cuando las células tumorales pueden invadir los tejidos induciendo vascularización.

TUMOR MALIGNO. Masa de células de una parte del organismo cuyas células sufren un crecimiento anormal y no tienen ninguna función fisiológica.

INTRODUCCIÓN

En la historia, el primer documento que habla sobre cáncer de mama es el papiro quirúrgico de Smith (3000 – 2500 a.C.), que describe cáncer de mama en un hombre, pero la descripción abarcaba la mayor parte de las características clínicas comunes.

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que difieren de forma variable en su histogénesis, morfología, evolución clínica, pronóstico y tratamiento, presentando particularidades morfológicas y biológicas que permiten clasificar e identificar por separado diferentes tipos de tumores, mismos que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Otra característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y puede invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso denominado “metástasis”.

Hace no más de 25 años el cáncer era considerado una enfermedad de etiología desconocida y de carácter mortal. Afortunadamente, gracias a los avances en la investigación de la biología molecular, se ha permitido encontrar nuevos blancos moleculares sobre los que desarrollar nuevos fármacos, a su vez, se ha logrado una aproximación al pronóstico de la enfermedad y un mejor manejo en el tratamiento de pacientes diagnosticados con cáncer.

Actualmente el cáncer es uno de los mayores retos en salud pública. Desde hace varias décadas los tumores malignos se han posicionado en los primeros sitios como causa de mortalidad a nivel mundial, representando un gran desafío para las economías y sistemas de salud.

Dada la prevalencia de cáncer a nivel mundial y la importancia de realizar un diagnóstico precoz, se hace necesaria la búsqueda de nuevos marcadores moleculares que ayuden a discernir pacientes afectados de cáncer y diferenciarlos de sujetos sanos o de aquellos con procesos tumorales benignos.

La epidemia del cáncer de mama constituye una prioridad en salud, ya establecida en los países desarrollados, por el contrario, en países en desarrollo no se ha prestado suficiente atención a este problema. La evidencia reciente demuestra que el cáncer de mama es hoy en día una de las principales causas de muerte y discapacidad entre las mujeres de países en vías de desarrollo. La ciencia ha producido nuevas opciones terapéuticas, muchas de las cuales tienen un costo elevado.

Hoy en día conocemos que procesos como la metilación aberrante de las regiones promotoras de múltiples genes ocurren en etapas tempranas de la carcinogénesis

y que su determinación es posible a través del análisis de DNA aislado en sangre periférica tejido o fluidos naturales mediante técnicas poco invasivas, lo que permitiría ser utilizado como un potencial biomarcador en el diagnóstico precoz de un proceso tumoral así como la identificación temprana de aquellos individuos con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama.

ANTECEDENTES

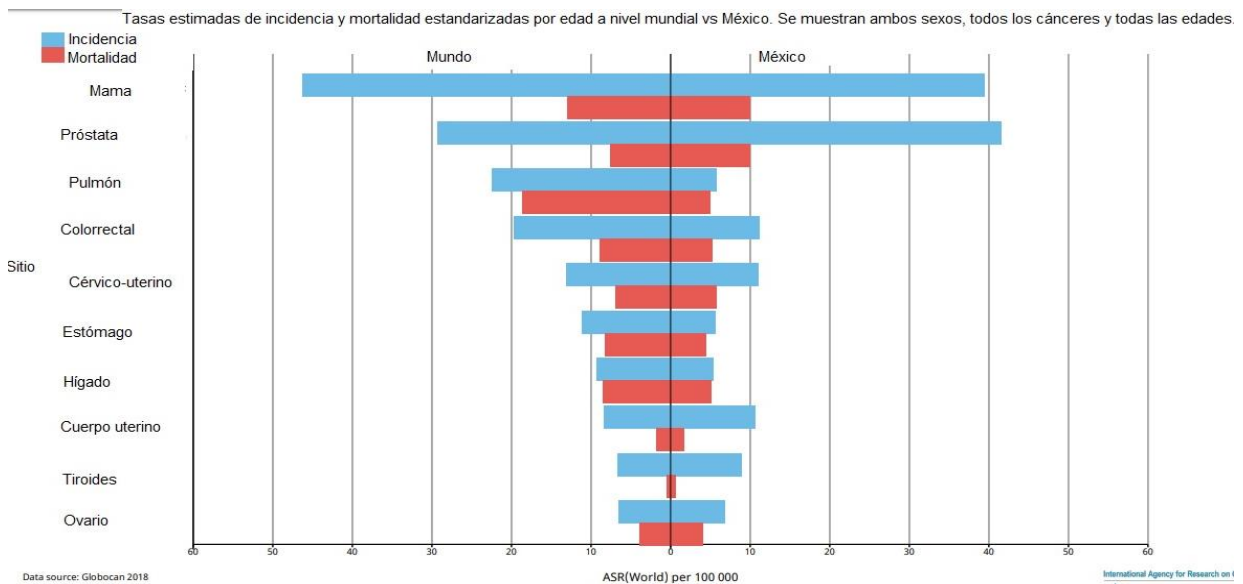
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER.

Una de cada seis defunciones en la población humana se debe a esta enfermedad y está ubicada en las diez primeras causas de muerte a nivel mundial. Cerca del 70% de las muertes por cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos.

En 2015, esta enfermedad ocasionó 8.8 millones de defunciones. Actualmente hay 32.6 millones de personas que viven con cáncer, dentro de los 5 años posteriores al diagnóstico (GLOBOCAN, 2017).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes:

- Mamario
- Próstata
- Pulmón
- Colorrectal
- Cérvico-uterino

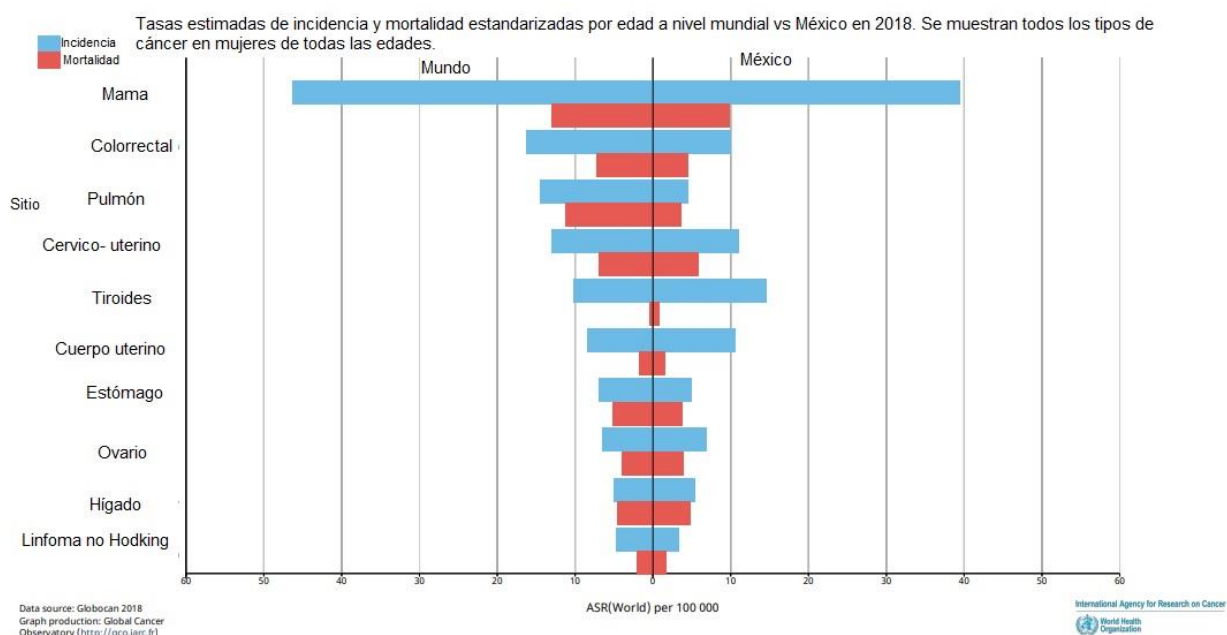


Gráfica 1.0. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad a nivel mundial vs México. Editado al español. Recuperado de: <https://www.iarc.fr/>

En la gráfica 1.0 se muestra una gráfica de barras recuperada del portal de la Organización Mundial de la Salud, donde se indica en color azul y rojo las tasas de

incidencia y mortalidad, respectivamente, de los tipos de cánceres más frecuentes en ambos sexos en México y a nivel mundial.

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA EN MÉXICO.



Gráfica 2.0. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad a nivel mundial vs México en 2018. Todos los tipos de cáncer en mujeres de todas las edades. Editado al español. Recuperado de: <https://www.iarc.fr/>

En la gráfica 2.0 se observa que el CMA establece la incidencia más elevada de esta patología a nivel mundial. Además, es el primer causal de muertes por cáncer en mujeres de todas las edades.

El Programa de Acción Cáncer de Mama de la Secretaría de Salud indica que el rango de edad predominante de las mujeres con esta neoplasia se amplió a partir de 2006, pasando de 45 a 60 años de edad al de mujeres de 14 años en adelante (Secretaría de Salud, 2006).

En el año 2014, de acuerdo con datos del INEGI reportados en las “Estadísticas a propósito del Día Internacional Contra el Cáncer de Mama”, se determinó la distribución de esta enfermedad por entidad federativa.

En la figura 1.0 se muestra en color morado intenso los estados del país donde se han reportado mayor número de casos relacionados al cáncer de mama, siendo los

colores más tenues aquellos estados con menor incidencia con una proyección hacia el 2050.

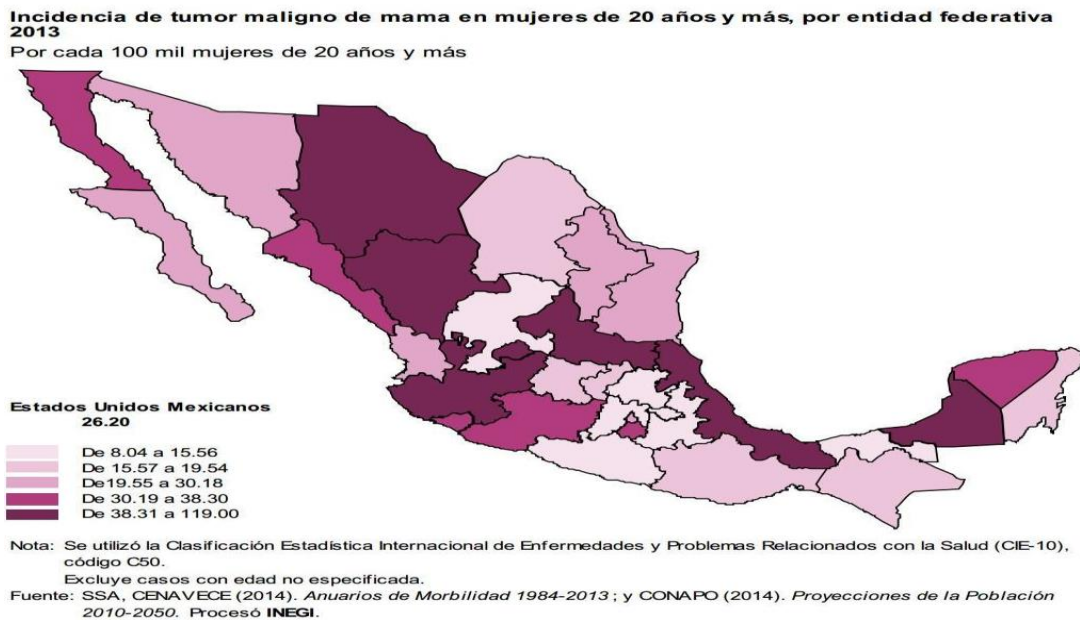


Figura 1.0 Distribución de CMA por entidad federativa con proyección de la población 2010-2050. Recuperado de: <https://www.infocancer.org.mx/?c=cancer-cifras&a=estadisticas-cancer-mama-2014>

Para el año 2015 el país presentaba una tasa promedio de mortalidad a causa de neoplasias de 66.37 por cada 100,000 habitantes, sobresaliendo los estados del norte del país como son Chihuahua, Sonora y Nuevo León además de la Ciudad de México y Veracruz con tasas por encima de 75 por cada 100.000 habitantes, observándose una disminución de la mortalidad por cáncer cérvico-uterino y un aumento por cáncer de mama, estimándose que esta situación se mantendrá durante los próximos años reduciéndose las neoplasias de cérvix a tasas de 5 por cada 100,000 mujeres; sin embargo, el cáncer de mama desarrollará una tasa superior de 11 por cada 100,000 pacientes (Reynoso & Torres, 2017).

En México las mujeres con cáncer de mama tienen en promedio 11 años menos que las mujeres estadounidenses y europeas (Brandan & Villaseñor, 2006).

Un estudio en el 2015 reportó que la mortalidad ante la enfermedad se incrementa a partir de los 55 años en la población mexicana (Sifuentes, Castañeda, Lugo, & Reyes, 2015).

ETIOLOGÍA DEL CMA.

En el año 2016, Di Sibio y colaboradores publicaron que la variación geográfica de las tasas de cáncer de mama puede explicarse por las diferencias en la prevalencia de los patrones reproductivos, los factores del estilo de vida, la detección temprana y el acceso a la atención médica (Di Sibio, Forman & Sierra, 2016).

Mencionan que los diferentes factores de riesgo para el desarrollo de CMA son:

- Antecedentes de un familiar con CMA.
- Menarca previa a los 12 años.
- Usar anticonceptivos hormonales por más de 5 años.
- Ser nulípara.
- Obesidad.
- Sedentarismo.
- Tabaquismo y/o alcoholismo.
- Dieta rica en carbohidratos.

ANATOMÍA MAMARIA.

Las mamas son dos órganos glandulares exclusivos de los mamíferos y se desarrollan a partir de crestas definidas y extendidas en la parte media del tórax. Su estructura y función es distinta según el momento del desarrollo en que se encuentre y depende del balance entre los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Se hallan en ambos sexos, sin embargo, en los machos dejan de desarrollarse mucho antes de la pubertad. (Anthony & Thibodeau, 2006). En la figura 2.0 se ilustra una mama sana de una mujer adulta.

El desarrollo de estos órganos durante la pubertad es regulado por los estrógenos y la progesterona. Los estrógenos estimulan el crecimiento de los conductos de las glándulas mamarias y la progesterona el desarrollo de los alveolos (Decherney, Nathan, & Murphy, 2007).

Las glándulas dentro de las mamas se clasifican como tuboalveolares compuestas y consisten en 15 a 20 lóbulos que se irradian a partir del pezón y se separan entre sí por tejido adiposo y conectivo colagenoso. Cada lóbulo es drenado por un conducto galactóforo propio que lleva directamente al pezón. Antes de llegar a este último, cada lóbulo se dilata para formar un seno lactífero que a continuación se estrecha antes de desembocar en el pezón (González & Ugalde, 2012).

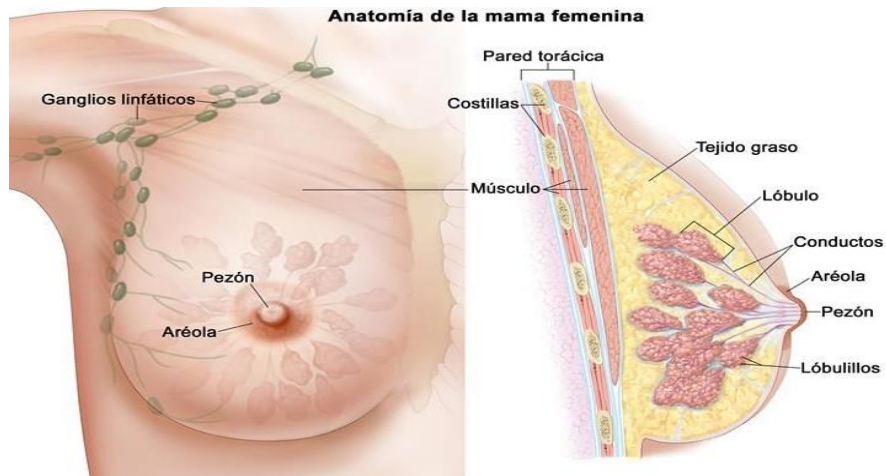


Figura 2.0 Anatomía mamaria desarrollada de forma normal. Recuperado de Teresewinsolw.com

El epitelio escamoso queratinizado se hace presente en los orificios del pezón. Los conductos y lobulillos están tapizados por células mioepiteliales contráctiles y epiteliales lumbinales. También existen dos tipos de estroma mamario; el interlobulillar, que corresponde a un tejido conjuntivo fibroso denso mezclado con tejido adiposo así como el estroma intralobulillar que rodea a los acinos de los lobulillos y está constituido por células similares a los fibroblastos con respuesta hormonal, mismos que se pueden observar en la figura 3.0 (Kumar, Abbas, Fausto, & Aster, 2010).

Los tejidos mamaros están unidos a la piel que los recubre y al tejido subcutáneo mediante bandas fibrosas o aponeuróticas llamadas ligamentos de Cooper, que sostienen a la mama en posición recta sobre la pared torácica (Decherney, Nathan, & Murphy, 2007).

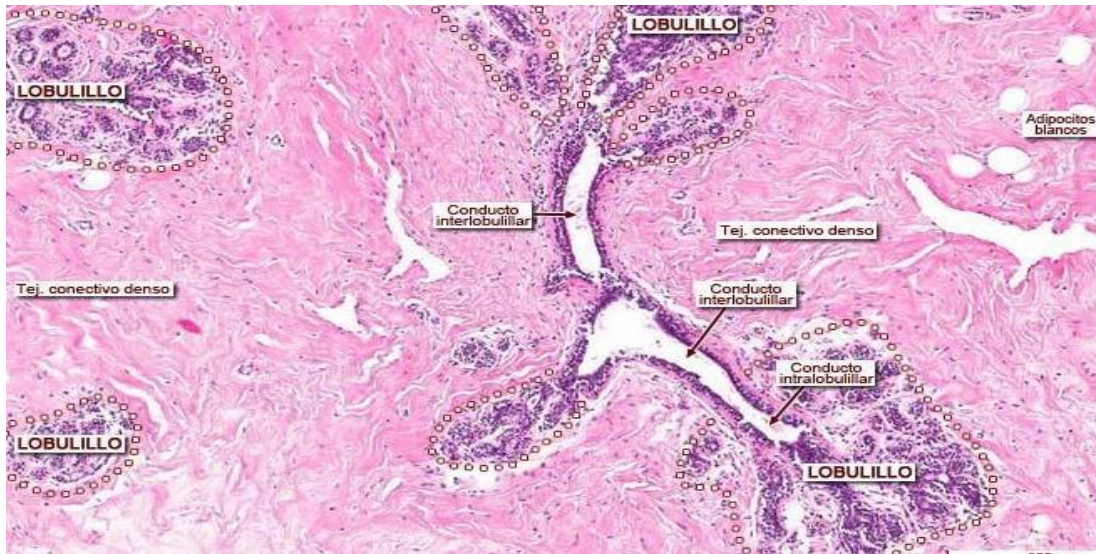


Figura 3.0 Histología normal de la mama en reposo, corte sagital. Recuperado de http://wzar.unizar.es/acad/histologia/imagenes/ImagenesHE/32_GIMamaria/GIMamaRCG_al_04etq.jpg

Es de suma importancia conocer la estructura mamaria en las diferentes etapas del desarrollo femenino, pues las células de los tumores mamarios malignos suelen extenderse hacia otras regiones del cuerpo mediante el tejido linfático (Anthony & Thibodeau, 2006).

CLASIFICACIÓN DEL CMa CON BASE EN LAS CARACTERÍSTICAS RADIOLÓGICAS.

El *American College of Radiology* identificó las imágenes mamográficas de lesiones en función de la probabilidad de ser malignas, estableciendo en 1993 la clasificación BIRADS para homogeneizar los informes de los radiólogos y condicionar un criterio común para cada imagen. Estas imágenes se clasifican de la siguiente manera:

- **BIRADS 1.** Mama sin imágenes patológicas.
- **BIRADS 2.** Mama catalogada como benigna, al presentar hallazgos inequívocamente benignos, no precisando más actuaciones diagnósticas ni especial seguimiento.
- **BIRADS 3.** Presentan hallazgos con alta probabilidad de corresponder a una lesión benigna, pero precisan seguimiento para demostrar que no existen variaciones, recomendando una nueva mamografía a los 6 meses.
- **BIRADS 4.** Corresponden a imágenes sospechosas de malignidad.

- **BIRADS 5.** Imágenes altamente sugestivas a malignidad, siendo necesaria su comprobación histológica.
- **BIRADS 6:** Malignidad confirmada histológicamente.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Es posible realizar una clasificación del tejido tumoral a partir de los resultados de la biopsia, basada en el estado del receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés) y del receptor de progesterona (PR) del tumor y el análisis de sobreexpresión o amplificación del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2/neu) (Zepeda, Recinos, & Cuéllar, 2008).

De acuerdo con estudios como los reportados por Zepeda y Arrechea, se ha formulado una clasificación general del cáncer de mama con base en los resultados de ER, PR y HER2/neu:

- Receptor hormonal positivo.
- HER2/neu positivo.
- Triple negativo (RE, RP, y HER2/neu negativos).

Una vez determinado el fenotipo que presenta una paciente, dependiendo del tipo de receptor que sea más abundante y/o activo, se dispone a elegir alguna terapia hormonal adecuada. El ER es determinante a ser considerado, ya que es el mediador de los efectos biológicos de la exposición a los estrógenos (Morales, 2006).

ESTRÓGENOS.

Dentro de las hormonas esteroides se encuentran los estrógenos, los cuales constan de 18 carbonos caracterizados por un anillo A aromático, un grupo hidroxilo fenólico en el carbono 3 y un hidroxilo o cetona. Se trata de moléculas de naturaleza no polar capaces de difundir dentro y fuera de las células atravesando la membrana celular con relativa facilidad (Mc Murry, 2012).

En la figura 4.0 se ilustra la estructura química de los tres estrógenos principales presentes en mujeres. Estos son estradiol (E2), estrona y estriol. De acuerdo con Locia y colaboradores, el E2 es el más abundante, siendo su fuente principal el ovario, mismo que produce también estrona.

Los estrógenos actúan a través de receptores intracelulares que son factores de transcripción activados por unión a ligando (Kos, Reid, & Denger, 2008).

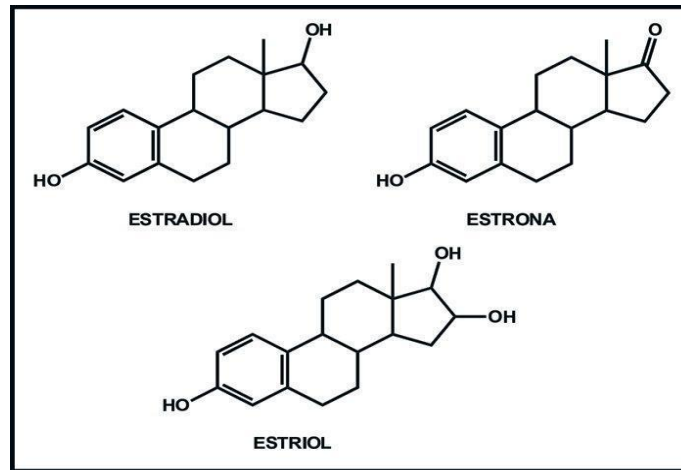


Figura 4.0 Estructura química de los estrógenos principales en mujeres. Recuperado de <https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2013/8/Locia/HTML.html>

Estas hormonas cumplen una función vital en la fisiología reproductiva tanto femenina como masculina estimulando el crecimiento y diferenciación celular en tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata. Para que los estrógenos ejerzan sus efectos biológicos requieren de la participación de los ER (Márquez, 2013).

Por otro lado, además de participar en la función reproductiva, los estrógenos son necesarios para el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico y de la masa ósea y participan en aspectos relacionados con la fisiología vascular tales como la proliferación epitelial de los vasos sanguíneos siendo factores cardioprotectores (Locia, Hernández, Aranda, & Rojas, 2007).

RECEPTOR DE ESTRÓGENOS.

Los receptores de estrógenos son los mediadores de los efectos biológicos de la exposición a los estrógenos, pertenecen a la familia de los receptores nucleares los cuales son una clase de proteínas que se encuentran en el interior de células responsables de detectar la presencia de hormonas esteroideas y tiroideas. Estos receptores tienen la capacidad de interactuar directamente con el DNA y regular la expresión de los genes blanco, siendo clasificados como factores de transcripción (Sánchez & Benítez, 2003).

Estructuralmente los ER están organizados en los dominios representados en la figura 5.0.

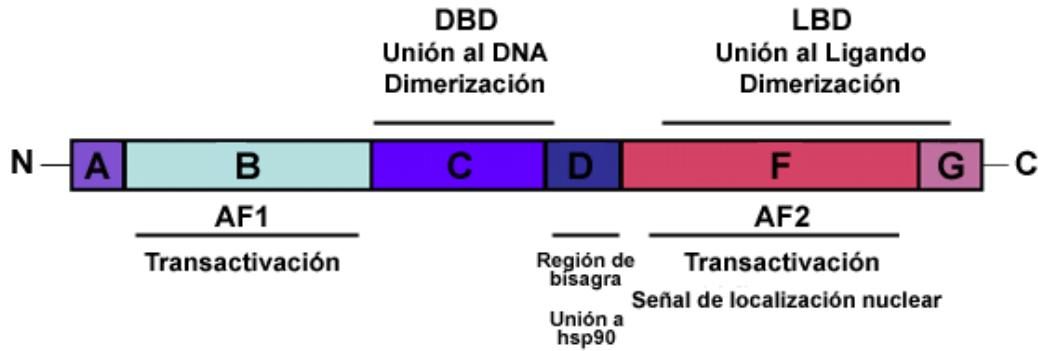


Figura 5.0 Dominios funcionales del ER. Recuperado de <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=78&n=3012&m=1&e=3013>

La estructura funcional del ER es la que le permite actuar como un transductor de la señal hormonal, ya que ésta contiene varias regiones específicas importantes como el dominio de activación transcripcional 1 (AF1), el dominio de unión a DNA (DBD), el dominio de activación transcripcional 2 (AF2) y el dominio de unión a la hormona (HBD).

ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR.

En ausencia de ligando, los ER sintetizados en el protoplasma, permanecen inactivos, ya que se encuentran enlazados a proteínas chaperonas del complejo de proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés), quienes los mantienen en una conformación que oculta sus péptidos señal de localización nuclear (Morani, Warner, & Gustafsson, 2008) (Locia, Hernández, Aranda, & Rojas, 2007).

La estructura funcional mencionada es la que le permite al ER unirse a la hormona y sufrir un cambio en su conformación espacial, desprendiéndose de las HSP, de esta manera, el complejo hormona-receptor se une directamente a las secuencias consenso en el DNA, conocidas como elementos de respuesta a estrógenos; y en forma indirecta se une con otros factores de transcripción. El receptor entra al núcleo y se une a los elementos de respuesta al estrógeno (ERE) en el genoma, para iniciar la transcripción tal y como se muestra en la figura 6.0. (Barrón, Arias, & I, 2001).

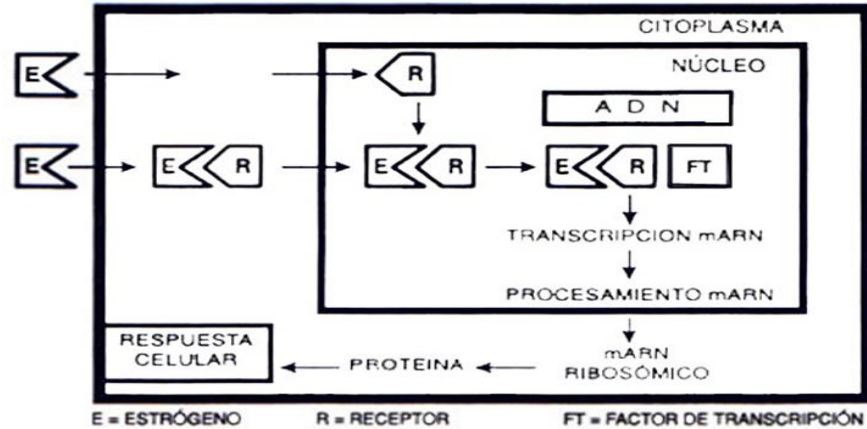


Figura 6.0 Esquema representativo de la interacción hormona-ligando. Recuperado de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol_45n1/receptores_estrogenos.htm

En ocasiones, estos ER activados con estrógeno pueden promover el crecimiento de las células cancerosas mamarias; lo anterior ocurre en mujeres quienes presentan cáncer de mama hormonodependiente, a quienes se les aplican tratamientos a base de tamoxifeno. Sobre esta base se están desarrollando nuevos fármacos anticancerosos dirigidos contra lesiones moleculares específicas con la esperanza de mayor tasa de cura y menor toxicidad a las células normales (Hómez de Delgado, 2008).

Actualmente se han identificado dos receptores de estrógenos conocidos como ER α y ER β , formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente. Existe un tercer receptor de estrógenos intracelular transmembranal conocido como GPR30, que actúa de manera independiente de ER α y ER β , pero influye en la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF) sin embargo aún no se conoce bien su biología. ER α y ER β son codificados por diferentes genes y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido. ER α es expresado predominantemente en órganos como útero, mama, ovario, hígado y en el sistema nervioso central, en tanto que la forma β es expresada mayoritariamente en tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Noriega, 2008; Pérez, 2005).

ER α .

El gen codificante para el ER α es el *ESR1* y se localiza en el cromosoma 6, región 6q25.1-q25.2. El ER es una proteína de 65 kDa, formada por 595 aminoácidos, se localiza principalmente en mama, útero, hipotálamo, hipófisis y ovario. Concretamente refiriéndose a tejido mamario, el ER α se ubica principalmente en las células epiteliales ducto-lobulillares terminales (Noriega & Langley, 2008)

EPIGENÉTICA.

La epigenética hace referencia, en un sentido amplio, al estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en el proceso de ontogenia. Ha sido definida como los cambios heredables en la expresión génica, los cuales ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA (Díaz, 2018).

La expresión de ER α puede regularse a través de mecanismos epigenéticos. Existen distintos tipos de modificaciones epigenéticas y uno de los principales que regulan la expresión de *ESR1* es la metilación del DNA (Arenas & Recillas, 2002).

METILACIÓN DE DNA.

La metilación es un proceso epigenético que ocurre por fuera de las bases del DNA teniendo repercusiones en su función, participando en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. (Roa, Anabalón, O, Martínez, & Araya, 2004). El DNA presenta regiones de 1000-1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas DNA-metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del DNA metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de DNA tal y como se muestra en la figura 7.0 (Margossian, 2006).

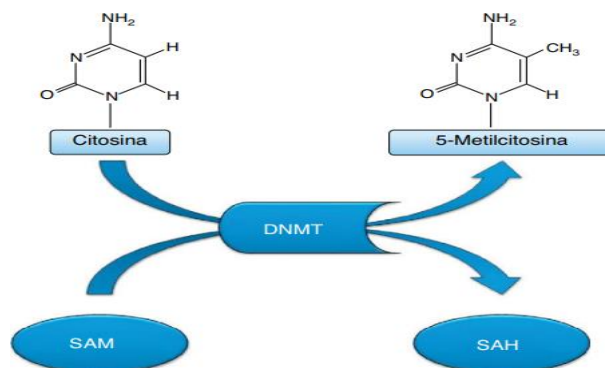


Figura 7.0 Proceso de metilación de la citosina por acción de la DNA metiltransferasa, resultando la 5-metilcitosina y S-adenosilhomocisteína. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-cirugia-espanola-36-articulo-epigenetica-cancer-colorrectal-S0009739X11004350>

En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación de novo, esta modificación

se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. La metilación del DNA es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica así como la inactivación del cromosoma X. En contraste, alteraciones en ella están implicadas en algunas enfermedades humanas, especialmente aquéllas relacionadas con defectos en el desarrollo y el proceso neoplásico. (Mesa, Barros, & Medina, 2006)

Los mecanismos epigenéticos son importantes ya que la alteración de los patrones de metilación del DNA se ha asociado con el desarrollo del cáncer debido a que se ve afectada la accesibilidad de los factores de transcripción. Uno de los genes que son susceptibles de ser metilados es el *ESR1*, el cual codifica para el ER α (Rodríguez, Téllez, & Cerbón, 2004).

El encontrar algún tipo de biomarcador que se complemente con las herramientas diagnósticas que existen permitiría un trabajo más eficiente al momento del diagnóstico. La búsqueda de sitios susceptibles de ser metilados dentro del gen *ESR1* permitiría establecer un biomarcador que dilucide el pronóstico y tratamiento más adecuado (Martínez, 2014).

La hipermetilación de islas CpG en los promotores de genes ahora se reconoce como un mecanismo común para la supresión de la expresión génica mediante la inactivación transcripcional en el cáncer (González, Castellví-Bel, Balaguer, & Pellisé, 2008).

La metilación aberrante se ha detectado con frecuencia en el cáncer de mama. Varios genes implicados en la reparación del DNA, regulación del ciclo celular y adhesión celular, solo por mencionar algunos, se metilan con mayor frecuencia en el CMa (Mehrotra, Vali, McVeigh, & Garrett-Mayer, 2004).

Los estrógenos pueden regular el crecimiento de las células mamarias, mediante la unión al ER en el CMa hormono-dependiente. Esto implica que puede incrementarse la proliferación celular. La baja expresión de ER α impide que las células cancerosas de mama puedan ser reguladas por los estrógenos, por lo tanto, no podrán ser tratadas por terapia endócrina. Hay evidencia de que la metilación del promotor *ESR1* se asocia con una disminución de la expresión de mRNA y proteínas de ER α (Ramezani, Salami, & Davood, 2012).

Aún no hay suficiente información sobre el grado de metilación de *ESR1* en la población mexicana. El análisis del estado de metilación de este gen puede relacionarse con la expresión de ER α en el tumor. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el estado de metilación del gen *ESR1* en biopsias de cáncer de mama de pacientes mexicanas del Hospital Juárez de México.

JUSTIFICACIÓN.

El CMA en México representa un problema de salud pública ya que desde el año 2006 se le hace referencia como el causante del mayor índice de muertes en mujeres sin distinción de grupo socioeconómico y alarmantemente la edad de incidencia es cada vez más cercana a la pubertad, en comparación con países europeos y asiáticos. De los casos reportados sólo el 10 % se diagnostican en el estadio inicial.

Se propone la determinación del estado de metilación del gen *ESR1* como estudio adicional para detección y clasificación del CMA. El desarrollar este tipo de estudios permitirá entender y relacionar más a fondo los procesos que modulan la expresión del ER α junto con otros mecanismos moleculares normales y anormales, contribuyendo en una mayor comprensión del desarrollo de este tipo de patología y generando nuevos biomarcadores y alternativas de pronóstico para las pacientes.

HIPÓTESIS.

Si hay un incremento en los niveles de metilación del gen *ESR1* se afectarán los niveles del ER.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el grado de metilación del gen *ESR1* en biopsias de mama mediante PCR de punto final para comparar el estado de metilación entre mujeres diagnosticadas con cáncer y sin cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el estado de metilación del promotor del gen *ESR1*, mediante PCR punto final.
- Comparar el estado de metilación entre pacientes diagnosticadas con cáncer de mama y sin cáncer de mama.

CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

- Prospectivo.
- Transversal.
- Descriptivo.
- Observacional.
- De riesgo mínimo.

CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio incluyó pacientes mexicanas con cáncer de mama de “primera vez” que acudieron al área de oncología del Hospital Juárez de México en el periodo junio de 2016 a junio de 2017, siendo el grupo control las pacientes sin este tipo de cáncer.

En este estudio se determinaron cuatro grupos:

1. Controles. Pacientes con lesiones benignas como fibroadenoma o mastitis.
2. Pacientes con cáncer de mama con resultados de ER (-).
3. Pacientes con cáncer de mama con resultados de ER < 50 %.
4. Pacientes con cáncer de mama con resultados de ER > 50 %.

CRITERIOS CONSIDERADOS

De inclusión.

- Pacientes mexicanas mayores de edad, con y sin diagnóstico de cáncer de mama.
- Pacientes que asisten al servicio de oncología del Hospital Juárez de México, que hayan leído y firmado la hoja de consentimiento informado. (Ver anexo 1.0)

De no inclusión.

- Pacientes con diagnóstico previo de neoplasia.
- Pacientes con tratamiento para cáncer de cualquier tipo.
- Pacientes que no estén de acuerdo con la hoja de consentimiento informado.

METODOLOGÍA

➤ **Material biológico.**

A través de una colaboración entre la Unidad de Investigación y el Servicio de Oncología del Hospital Juárez de México, se reclutaron pacientes antes de la microcirugía. La obtención de tejido mamario para el presente estudio se realizó al momento de la toma de biopsia indicada por los médicos. Las muestras fueron envasadas, rotuladas y almacenadas en un congelador especial a -70 °C para realizar la posterior extracción de DNA.

➤ **Extracción de DNA.**

Se colocó aproximadamente 0.5 cm³ de tejido en un mortero con nitrógeno líquido y se maceró hasta lograr la homogeneidad, posteriormente, se colocó el macerado en un tubo con capacidad de 1.5 ml con 750 µl de buffer de lisis. Se incubó durante una hora a 60 °C en agitación e inmediatamente se agregaron 3 µl de RNAsa y se mezcló por inversión. Se incubó a 37 °C por 30 min y se dejó a temperatura ambiente por 5 min para después agregar 200 µl de solución precipitadora de proteína y se agitó vigorosamente por 20 segundos. La muestra se dejó enfriar en hielo durante 5 min y posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 4 min. En el botón formado se encontraron las proteínas. Se tomó el sobrenadante, pues contenía el DNA, y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml con 600 µl de isopropanol. Se mezcló por inversión el tubo hasta observar los filamentos de DNA y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min. El DNA se hizo visible como un pequeño botón blanco. Cuidadosamente, se decantó el sobrenadante y se agregó 600 µl de etanol al 70 % para lavar el DNA invirtiendo el tubo cuidadosamente. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min, cuidadosamente se aspiró el etanol con ayuda de una micropipeta. Se dejó secar el botón, invirtiendo el tubo sobre un papel seco y se limpió durante 10 min. Se añadieron 100 µl de solución rehidratadora de DNA y se dejó incubar 1 hora a 65 °C.

➤ **Evaluación de la integridad del DNA.**

Se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, para ello se agregaron 0.5 g de agarosa y se disolvió en 50 ml de amortiguador 1X TAE. Se calentó la solución durante 30 segundos y se añadieron 1.5 µl de bromuro de etidio. Se agregaron 5 µl de muestra por pozo. Se corrió la electroforesis dentro de una cámara especializada durante 1 hora a 90 volts. El DNA se visualizó mediante el uso de luz UV.

➤ **Conversión del DNA por bisulfito.**

Se empleó el Kit *Methylcode Bisulfite Conversion* (Ver anexo 2.0).

En un microtubo se añadieron 500 ng de DNA y se llevó a un volumen de 20 µl con agua libre de RNAsas. Se añadieron 130 µl del reactivo CT de conversión previamente rehidratado con 300 µl de buffer de dilución, 50 µl de buffer de suspensión y 900 µl de agua. Se colocó en el termociclador con las condiciones especificadas en la Tabla 1.0

Tabla 1.0 Condiciones de temperatura del termociclador para conversión de DNA por bisulfito.

Desnaturalización de DNA	95 °C por 10 min
Conversión por bisulfito	65 °C por 2.5 hr
	4 °C por 20 hr

En una columna proveniente del kit se agregaron 600 µl de buffer de unión. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30 segundos. Se añadieron 100 µl de buffer de lavado para después centrifugar a 13,000 rpm. Se añadieron 200 µl del buffer de desulfonidación y se dejó reposar 20 min.

Se centrifugó durante 30 segundos a 13,000 rpm y se añadieron 100 µl de buffer de lavado para después centrifugar a 13,000 rpm. Se transfirió a un microtubo de 1.5 ml para eluir el DNA, se agregaron 10 µl de buffer de elución y se centrifugó a 13,000 rpm. El DNA se conservó a -20 °C.

➤ **Determinación del estado de metilación.**

MSP o PCR específica de metilación.

Se amplificaron las muestras de DNA previamente transformadas por la técnica de bisulfito, se usaron los oligonucleótidos específicos para identificar las islas CpG en su estado metilado y/o no metilado. En las tablas 2.0, 3.0 y 4.0 se especifican las condiciones de amplificación, así como las cantidades exactas de cada componente.

Tabla 2.0 Cantidad de los componentes para la técnica de PCR.

Componente	Cantidad μ l
Enzima High Fidelity	0.1
Buffer	2.5
MgSO ₄	1
dNTP's	0.5
Oligo Forward	1
Oligo Reverse	1
H ₂ O libre de RNAsas	17.9

El diseño de los oligonucleótidos fue realizado por Rodríguez en 2015, mediante el programa *Methyl Primer Express* para la localización *in silico* de la isla CpG susceptible a ser metilada.

Tabla 3.0 Oligonucleótidos específicos para las condiciones metilado y no metilado.

MET-ESR1 Forward	5'-TGTATTTGTTTTCGTCGGGTC-3'
MET-ESR1 Reverse	5'-AACCGACGAACCACCTAAAA-3'
UN-ESR1 Forward	5'-GATTGTATTTGTTTTGTTGGGTT-3'
UN-ESR1 Reverse	5'-AACCAACAAACCACCTAAAAAAA-3'

Tabla 4.0 Condiciones de amplificación.

94 °C	5 min	Desnaturalización
94 °C	30 seg	40 ciclos
58 °C	45 seg	
72 °C	60 seg	
72 °C	8 min	Extensión final

Los productos de amplificación se visualizaron con la ayuda de una electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

➤ **Electroforesis.**

Se pesó 1 g de agarosa y se diluyó en 50 ml de amortiguador 1X TAE. Se calentó la solución durante 30 segundos o hasta que quedara completamente translúcida. Se añadieron 1.5 µl de bromuro de etidio y se vertió en una cámara especializada para electroforesis. Se cargó en el primer pozo marcador de peso molecular Gelplot. Se cargaron 5 µl de muestra por pozo más 2.5 µl del buffer de carga. Se corrió la electroforesis durante 1 hora a 90 volts. El DNA se visualizó mediante el uso de luz UV en un transiluminador.

➤ **Densitometría.**

La intensidad de las bandas obtenidas es directamente proporcional a la cantidad de regiones CpG metiladas o no metiladas. La densidad de las bandas fue determinada mediante el programa "Image J".

RESULTADOS

Se analizaron 45 muestras de tejido mamario de las cuales 32 fueron diagnosticadas previamente con cáncer. Las últimas 13 son muestras con patologías benignas, mismas que se tomaron como controles del estado del ER en ausencia de cáncer.

➤ Controles del estado de metilación.

Para verificar que el sistema de detección del estado de metilación funciona, se desarrollaron controles positivos y negativos a metilación. El control positivo fue DNA proveniente de sangre periférica mismo que fue metilado artificialmente con la enzima CpG *Methyltransferase* y para el control negativo el DNA se amplificó sin ningún tratamiento previo. Tanto los controles positivos como negativos, fueron transformados previamente por la técnica de bisulfito y amplificados con los oligos para reconocer metilación propuestos por Rodríguez.

En la figura 8.0 se observan los controles lo que permitió continuar con la técnica.

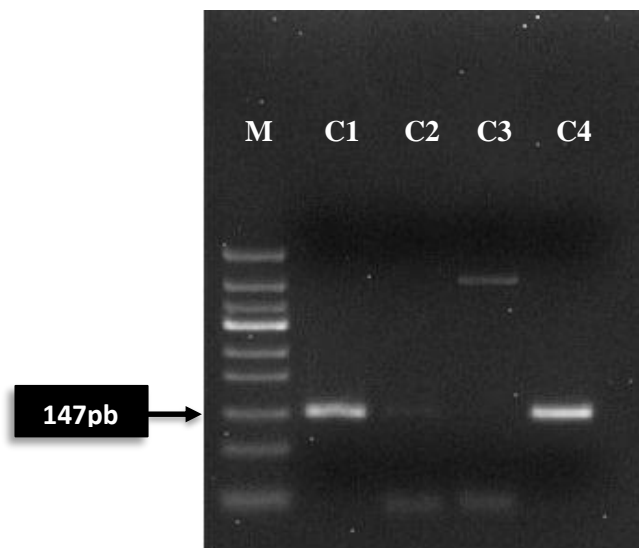


Figura 8.0 Controles de metilación. Se utilizaron DNAs controles (positivos y negativos para metilación) como templados para demostrar la especificidad de los oligonucléotidos utilizados.

Carril	Caso	Estatus
M	Marcador de 50pb	
C1	Control + Metilado	Met- <i>ESR1</i>
C2	Control + Metilado	Un Met- <i>ESR1</i>
C3	Control - Sin metilar	Met- <i>ESR1</i>
C4	Control - Sin metilar	Un Met- <i>ESR1</i>

➤ **Determinación del estado de metilación del promotor en los grupos analizados.**

Con el objetivo de determinar el estado de metilación del promotor del gen *ESR1* pacientes con cáncer de mama de primera vez, se realizó la PCR del DNA previamente extraído y transformado por la técnica de bisulfito, de los diferentes grupos para detectar el estado de metilación, posteriormente el producto de PCR con un tamaño de 147 pares de bases (pb) se corrió en un gel de agarosa al 2.0% para lograr visualizar los productos. La figura 9.0 y la tabla 5.0 muestran la ubicación de los casos y controles metilados y no metilados.

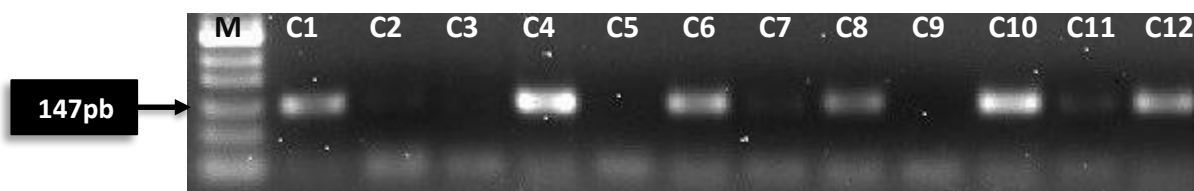


Figura 9.0 Amplificación de los sitios susceptibles de metilación. Gel representativo de los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos específicos, para determinar el estado de metilación del promotor del gen *ESR1*.

Tabla 5.0 Ubicación en carriles de casos y controles metilados y no metilados correspondientes a la figura 11.

Carril	Caso	Estatus
Marcador de peso molecular	-	50 pares de bases
C1	Control positivo MET	MET- <i>ESR1</i>
C2	Control positivo UNMET	UNMET- <i>ESR1</i>
C3	Control negativo MET	MET- <i>ESR1</i>
C4	Control negativo UNMET	UNMET- <i>ESR1</i>

C5	Caso 430, control MET	MET-ESR1
C6	Caso 430, control UNMET	UNMET- ESR1
C7	Caso 433, control MET	MET-ESR1
C8	Caso 433, control UNMET	UNMET- ESR1
C9	Caso 381, ER α > 50 % MET	MET-ESR1
C10	Caso 381, ER α > 50 % UNMET	UNMET- ESR1
C11	Caso 385, ER α < 50% MET	MET-ESR1
C12	Caso 385, ER α < 50 % UNMET	UNMET- ESR1

- **Determinación de relación entre el estado de metilación y características clínico-patológicas reportadas en los grupos de estudios.**

Tabla 0.6. Porcentajes de los parámetros clínicos patológicos en relación con el número de pacientes con cáncer de mama.

Parámetros clínicos		n= 32 pacientes (100%)
Edad	<50 años	57.77
	>50 años	42.22
Estadio clínico	I	12.5
	II	43.75
	III	25
	IV	18.75
Tabaquismo	Positivo	28.12
	Negativo	71.87
Alcoholismo	Positivo	34.37
	Negativo	65.62

La relación entre el estado de metilación de los diferentes grupos y características clínico-patológicas se determina mediante la prueba de correlación de Pearson con significancia bilateral.

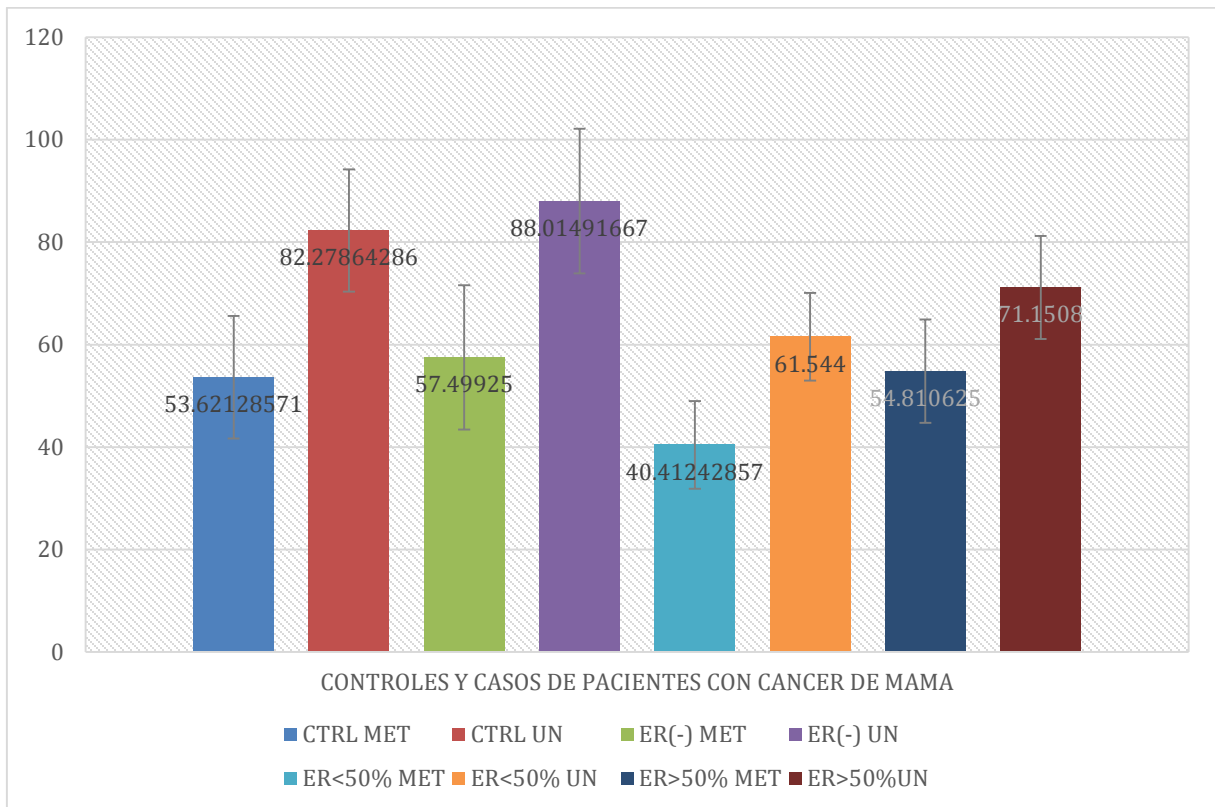
Tabla 7.0. Correlación entre el estado de metilación y características clínico patológicas de los grupos en estudio. NS= no significativo. $P > 0.05$

Grupo	Estado	Edad	Tabaquismo	Alcoholismo
Control	Metilado	NS	NS	NS
	No metilado	NS	NS	NS
ER < 50 %	Metilado	NS	NS	NS
	No metilado	NS	NS	NS
ER > 50 %	Metilado	NS	NS	NS
	No metilado	NS	NS	NS
ER (-)	Metilado	NS	NS	NS
	No metilado	NS	NS	NS

➤ **Determinación del grado de metilación en los diferentes grupos de estudio.**

Posterior a la electroforesis se determinó la intensidad de cada banda, lo que permitió determinar el grado de metilación, como se muestra en la gráfica 1.0, el grupo de pacientes con cáncer de mama se encuentra dividido en tres grupos; aquellas pacientes con menos del 50 % de ER, pacientes con un valor superior al 50 % de ER y pacientes con ER negativo.

Para el análisis estadístico se realizó una prueba Anova debido a las características de la muestra.



Gráfica 3.0 Grado de metilación de DNA en pacientes sin cáncer de mama (Controles) y con cáncer de mama. En la parte superior de las barras se muestra el promedio de cada grupo arrojado por el programa Image J. Se compararon los niveles de amplificación de las regiones de DNA susceptibles a metilación, entre tres grupos de pacientes con cáncer de mama; Casos con el ER (-), casos con el ER < 50 % y casos con ER > 50 %, respecto al DNA control, $P > 0.05$.

DISCUSIÓN

Existen cuatro componentes esenciales con una importancia clave en la regulación génica, el desarrollo y la carcinogénesis; las modificaciones de histonas, los micro-RNAs, complejos remodeladores de cromatina y la metilación del DNA (Jones & Laird., 2000).

El cáncer es considerado como un conjunto de enfermedades asociadas a alteraciones genéticas, sin embargo, no es un producto exclusivo de estas. Desde inicios de la década de los ochenta se han reportado alteraciones epigenéticas involucradas con el cáncer (Ríos & Soto, 2015). Además de los factores epigenéticos, en numerosos estudios se ha comprobado el papel de los estrógenos endógenos y exógenos en la patogenia del CMA (Clemons & Goss, 2001).

El mecanismo de acción de este esteroide se lleva a cabo a través de su unión al ER α , el cual regula la actividad de genes blanco para esta hormona. El gen que codifica para este receptor es el *ESR1* y es uno de los muchos genes que son susceptibles de ser metilados (Ramezani, Salami, & Davood, 2012).

Las Islas CpG son regiones que poseen altas concentraciones de pares de bases CpG y a menudo, rodean los promotores de los genes expresados constitutivamente, aunque también se encuentran en los promotores de los genes regulados (Ji, Hernandez, Zhang, Qu, & Frady, 1997). Aproximadamente del 60 al 90 % de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están. Estas islas se localizan entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas. (Rodríguez, Téllez, & Cerbón, 2004)

Los patrones de metilación aberrantes en los genes son una alteración temprana y frecuente en el cáncer ya que está asociada al tipo de tumor, pronóstico y respuesta a distintos medicamentos (Tume-Farfán, 2014). La hipermetilación de regiones promotoras, impulsan la iniciación y la progresión de diversos tipos de cáncer y se consideran un mecanismo clásico de inactivación de genes supresores de tumores (Sawan, Vaissière, Murr, & Z, 2008).

Se ha documentado hipermetilación aberrante de genes cuyo silenciamiento epigenético promueve la pérdida de adhesión celular, favorece la invasión del estroma o permite la evasión de apoptosis lo que constituye un estímulo para el desarrollo de metástasis. La recuperación de su expresión, bien por manipulación genética o por tratamiento con agentes desmetilantes, reduce la eficiencia invasiva

y la consiguiente formación de focos metastáticos (Carmona, Azuara, & Berenguer-Llargo, 2013).

El estado de metilación de los genes no es visible para las técnicas basadas en la amplificación por PCR para ello se necesita un tratamiento especial con bisulfito de sodio que tiene como finalidad convertir las citosinas no metiladas en uracilos. Posteriormente se realiza la amplificación del gen mediante la MSP (PCR específica para metilación, por sus siglas en inglés) (Margossian, 2006).

Aunque el ER α se expresa en la mama normal, diversos reportes a nivel mundial indican que un aumento dramático en este receptor es crítico para el desarrollo anormal de la glándula mamaria ya que se observan niveles elevados en lesiones de mama pre malignas y en muchos tipos de cáncer de esta glándula, en comparación con el tejido normal. Estas aseveraciones son relevantes en el papel que juega el ER α en la etiología del cáncer de mama y la progresión tumoral. Esta diferencia en la concentración de ER α en las mamas sanas y pre malignas o malignas podría deberse a la diferencia en el estado de metilación de los promotores que codifican para estos receptores (Ramezani, 2012; Anthony, 2006; Clemons, 2001).

Los resultados de esta investigación muestran que en la mayoría de los casos se observó mayor presencia de DNA no metilado. Estadísticamente no se evidencia una diferencia significativa entre los grupos analizados, razón posiblemente atribuible a la variabilidad genética, pues diversos estudios han demostrado lo contrario. Muchos de estos trabajos muestran una significancia y asociación entre el estado de metilación y la presencia de cáncer de mama, sin embargo, es necesario señalar que estas investigaciones han sido realizadas en líneas celulares o en tejido sanguíneo (Lapidus, 1998; Piotrowsky, 2006; Ramezani, 2012).

En la gráfica 3.0 se aprecia que el grupo con el ER α superior al 50 % está principalmente hipometilado, en comparación con el grupo con el ER α menor al 50%. Congruentemente, el primero está expresando mayor receptor. La hipometilación corresponde a la disminución del número de citosinas metiladas que afecta a las secuencias repetitivas satélite, o regiones pericentroméricas, sobre todo en las neoplasias benignas y malignas. La hipometilación puede afectar a la estructura del gen, reorganizándola y, por tanto, modificando su función, activando algún gen que se encontraba silenciado, o viceversa (Ji, 1997; Narayan, 1999).

Se ha informado que el 30 % de los tipos de cáncer de mama primarios son ER α negativos en el momento del diagnóstico. Sin embargo, se ha demostrado que una fracción de cánceres de mama inicialmente ER α positivos pierden la expresión del receptor durante la enfermedad (Hanstein, 2004; Williams, 2007).

El grupo de ER α (-) analizado presenta una mayor hipermetilación respecto al grupo menor al 50 %. Una hipermetilación de la región promotora de un gen supresor de tumores, llevará a silenciar su expresión, explicando porque el primero no expresa ER α y el otro sí. En una célula normal, la hipometilación de las islas CpG de los promotores de los genes permiten la transcripción genética. La hipermetilación de estas regiones no permite la apertura de la cromatina resultando en un silenciamiento anormal (Menéndez, 2012; Uribe, 2014).

La hipermetilación de las islas CpG en los promotores de diversos genes se reconoce ahora como un mecanismo para suprimir la expresión de estos en las células cancerosas. Varios genes implicados en la reparación del DNA (BRCA1 y GSTP1), regulación del ciclo celular (p16INK4a y ciclina D2), adhesión celular (E-cadherina), señalización celular mediada por receptor (RAR- β y THR- β), regulación de la transcripción celular (HOX5A), entre otros, son metilados con mayor frecuencia en los carcinomas de mama (Mehrotra, Vali, McVeigh, & Garrett-Mayer, 2004).

Es importante mencionar que en el gen *ESR1* se han hallado por lo menos siete promotores lo que aumenta la posibilidad de islas susceptibles a metilarse y ser determinantes en el desarrollo a cáncer (Kos, Reid, & Denger, 2008). Aunado a lo anterior, se ha descrito la presencia de potenciadores o *enhancers* en este gen así como la interacción con diferentes biomoléculas que permiten la sobreexpresión del ER α . (Kos, Reid, & Denger, 2008)

Los resultados también muestran que los grupos controles destacan una hipometilación incrementada en el subgrupo de los metilados, sin embargo se puede atribuir al hecho de que aunque no hay presencia de células cancerosas se emplearon como control muestras que presentan cambios en el crecimiento celular, diagnosticado como masas anormales benignas mediante inmunohistoquímica, lo que podría sugerir que incluso bajo estas condiciones ya se presenta una alteración en la metilación del gen.

La clasificación del cáncer de mama se basa en los resultados de la inmunohistoquímica apoyándose de otros estudios previos como la mamografía o resonancia magnética. Este proceso es llevado a cabo únicamente cuando el cáncer ya ha sido diagnosticado. En tumores benignos no se realiza comunmente y de hacerse, no se reporta. Si se realizara un análisis con inmunohistoquímica a estas muestras control, es probable que se reportaran niveles positivos e incluso elevados de ER α . Esto demuestra la importancia de conocer datos como la expresión de receptores hormonales, entre otros, en muestras de tumores benignos presentes pacientes mexicanas (Rena G. Lapidus, 1996).

Cabe resaltar que el grupo sin expresión de ER α no mostró cambios en la hipermetilación respecto al grupo con expresión del ER α mayor al 50 %.

El grupo de ER α (-) no presenta diferencia en comparación con el grupo ER α mayor al 50 %.

La complejidad del promotor del gen *ESR1* es mayor a la de los genes antes mencionados, a lo que se atribuye las diferentes frecuencias de metilación del promotor en cánceres de mama.

De acuerdo con los resultados reportados en las tablas 6.0 y 7.0 no se demostró una correlación significativa entre la edad y el estado de metilación de las pacientes, así como con los hábitos clínico-patológicos entre los que se encuentran el tabaquismo y el alcoholismo. Esto puede ser atribuible a que muchas de las pacientes omiten o modifican información de carácter personal por temor a la presión social sobre el tema. En numerosos estudios se ha reportado el tabaquismo como la adicción más frecuente y uno de los principales factores de riesgo ante diversos tipos de cáncer, incluyendo el de mama. (Peña, Maceo, & Ávila, 2017)

CONCLUSIONES

A pesar de que estadísticamente no se aprecia una diferencia significativa entre los grupos analizados, diversos estudios demuestran lo contrario.

Es necesario el análisis de otras islas CpG o sitios susceptibles al proceso de metilación que tengan implicaciones biológicas del promotor.

Tener un método no tan costoso y rápido que distinga claramente a las pacientes cuyo cáncer es tratable con hormonoterapia es vital para acelerar el proceso de iniciación en su tratamiento.

La comprobación experimental de la participación de la isla CpG en las muestras de este estudio no resultó determinante en cuestión de silenciamiento génico mediante metilación ni muestra que sea el factor causal de cáncer.

PERSPECTIVA

No solo el aumento en la expresión del ER provoca cáncer, también está estrechamente relacionado con la exposición al colesterol ingerido en la dieta. Ante esto, se propone medir el ER en pacientes sanas con hipermetilación.

Está demostrado que el estado de metilación en diferentes tejidos es exclusivo del mismo, ya que el ambiente celular es diferente para cada uno. Razón por la cual se considera importante realizar investigaciones en las que se compare el estado de metilación de este gen en tejido mamario así como en sangre perteneciente a las mismas pacientes y determinar si existe una asociación.

Para lograr un control en la mortalidad del cáncer es indispensable mejorar la planeación de los servicios de salud en todos los niveles, desarrollar una cultura basada en la prevención para el desarrollo de alguna neoplasia maligna. De ser el caso contrario, se continuará con el mismo círculo caracterizado por un diagnóstico tardío, costos altos, falta de recursos para su atención óptima y elevada mortalidad.

Comprender el funcionamiento de este receptor, así como los mecanismos epigenéticos que regulan su expresión en mama, permitirá contar con más elementos para mejorar las líneas de diagnóstico, clasificación y acción terapéutica de esta enfermedad que en nuestros días es una causa importante de mortalidad femenina a nivel mundial.

BIBLIOGRAFÍA

- Cours, A. (2018). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. *International Agency for Research on cancer*, 1:3.
- Anthony, & Thibodeau. (2006). *Anatomía y Fisiología*. México: Mc Graw-Hill.
- Arenas, F., & Recillas, F. (2002). Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. *Medicgraphia*, 547:555.
- Arrechea, I., García, V., & Córdoba, I. (2011). Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications. *Scielo*, 219-233.
- Barrón, A., Arias, J., & I, C. (2001). Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Scielo*, 577:584.
- Brandan, M., & Villaseñor, Y. (2006). Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Revista Investiga*, 147-162.
- Cancerología, I. N. (2014). Estadísticas sobre el cáncer de mama 2014. *INFOcancer*, 50-62.
- Carmona, F., Azuara, D., & Berenguer-Llargo, A. (2013). DNA methylation biomarkers for non-invasive diagnostic of Colorectal Cancer. *American Association for Cancer Research*, 230:240.
- Clemons, M., & Goss, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *NCBI*, 276:285.
- Decherney, Nathan, L., & Murphy, G. (2007). *Diagnóstico y tratamiento ginecoobstétrico*. México : Manual Moderno.
- Díaz, A. (2018). Biomarcadores epigenéticos en cáncer: un pilar de la oncología de precisión. *Genética médica y Genómica*.
- GLOBOCAN. (2017). New Global Cancer Data. Retrieved 2019, from <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>
- González, J., & Ugalde, E. (2012). La glándula mamaria embriología, histología y una de sus principales patologías, el cáncer. . *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXIX*, 317-320.
- Gonzálo, V., Castellví-Bel, S., Balaguer, F., & Pellisé, M. (2008). Epigenética del cáncer. *Elsevier*, 37:45.
- Hanstein B, D. S. (2004). Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *NCBI*.

- Hómez de Delgado, B. (2008). Hormonas en la mama: De la fisiología a la enfermedad. *Scielo*, 1:8.
- INEGI. (2014). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEI DÍA INTERNACIONAL CONTRA EL CÁNCER DE MAMA*.
- INEGI. (2014). *INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA GEOGRAFÍA E E INFORMÁTICA, DATOS Y ESTADÍSTICA*.
- Ji, W., Hernandez, R., Zhang, X., Qu, G., & Frady, A. (1997). DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *NCBI*, 33:41.
- Jones, & Laird. (2000). Cancer epigenetics comes of age. *NCBI*, 163-170.
- Kos, M., Reid, G., & Denger, S. (2008). Genomic Organization of the human ERa Gene Promoter Region. *Molecular Endocrinology by the Endocrinology Society*, 2057:2063.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., & Aster, Y. (2010). Robbins And Cotran Pathologic, Basis Of Disease. *ELSEVIER*, 978-984.
- Lapidus. (1998). Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. *NCBI*.
- Locia, Hernández, Aranda, & Rojas. (2007). El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. *Neurobiología*.
- Margossian, A. (2006). Revista Argentina de Mastología . *Estudio multicéntrico de validación del estado de metilación del gen PITX2 para predicción de riesgo en pacientes con cáncer de mama "N0" tratadas con tamoxifenos en muestras en parafina*. , 96:101.
- Márquez, M. (2013). Receptor de Estrógeno: Bases Moleculares Aplicadas a Medicina. *Escuela de Medicina de California, Los Ángeles. Depto. de Hematología y Oncología*, 200:213.
- Martínez, J. (2014). *Anomalías en el perfil de metilación como bio-marcador en el cáncer de mama*. España: Edit de la Universidad de Granada.
- Mc Murry, J. (2012). *Química Orgánica* . México: Mc Graw Hill.
- Mehrotra, J., Vali, M., McVeigh, M., & Garrett-Mayer, E. (2004). Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. *NCBI PubMED*, 3104:3109.
- Menéndez, Villarejo, & Padilla. (2012). Epigenética y cáncer colorectal,. *Elsevier*, 275:344.

- Mesa, Barros, & Medina. (2006). Metilación del ADN: marcador diagnóstico. *Medicgraphia*, 80-84.
- Morales, F. (2006). Estrategias clínicas y desarrollo de las bases científicas en el empleo de la hormonoterapia para cáncer de mama. *Oncología médica. INCAN*, 163:175.
- Morani, Warner, & Gustafsson. (2008). Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *NCBI*. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01976.x
- Noriega, & Langley. (2008). Correguladores del Receptor de Estrógenos y su implicación en el tejido mamario. *Revista Investiga*, 29:40.
- Ortiz, M., Sánchez, J., & Mora, I. (2012). Expresión de los receptores de estrógenos, progesterona y Her2/neu en muestras de tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama. *Revista de Sanidad Militar México*, 172:180.
- Peña, Y., Maceo, M., & Ávila, D. (2017). Factores de riesgo para padecer cáncer de mama en la población. *Finlay*, 283-287.
- Pérez, J., Aguilar, Á., & Alejandro, V. (2008). Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos. *Redalyc*, 437-452.
- Piotrowsky, Benetkiewicz, Menzel, & Mantripragada. (2006). Microarray-based survey of CpG islands identifies concurrent hyper- and hypomethylation patterns in tissues derived from patients with breast cancer. *NCBI*, 656:657.
- Qu, G., PE, G., Narayan, A., & Ehrlich, M. (1999). Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *NCBI*, 34:39.
- Ramezani, F., Salami, S., & Davood, M. (2012). CpG Island Methylation Profile of Estrogen Receptor Alpha in IRanian Females with Triple or Non-Triple Negative Breast Cancer: New MArker of Poor Prognosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 451:457.
- Rena G. Lapidus, A. T. (1996). Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clinical Cancer Research*, 6.
- Reynoso, N., & Torres, J. A. (2017). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*, 09:15.
- Ríos, M., & Soto, A. (2015). Alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer cervicouterino. *Revista Medica Instituto Mexicano del Seguro Social*, 2013: 2017.
- Roa, J., Anabalón, L., O, T., Martínez, J., & Araya, J. (2004). Patrón de metilación génico en el cáncer de mama. *Revista Médica de Chile*, 1069:1077.

- Rodríguez, M., Téllez, N., & Cerbón, M. (2004). Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Scielo*, 56:71.
- Sánchez, P., & Benítez, L. (2003). Receptores estrogénicos alfa y beta en cáncer de mama. *Medigraphic*, 159:161.
- Sawan, C., Vaissière, T., Murr, R., & Z, H. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *NCBI*.
- Secretaría de Salud . (2006). *“Programa de Acción: Cáncer de mama”, SS, México. .*
- Sibio, D., Abriata, Forman, & Sierra. (2006). Female breast cancer in Central and South America. *NCBI*, 110:120.
- Sibio, D., Abriata, Forman, & Sierra. (2016). Female breast cancer in central and south America. *PubMED*, 110-120.
- Sifuentes, Castañeda, Lugo, & Reyes. (2015). Factores de riesgo asociados con el cáncer de mama en mujeres del estado de Durango, México. *Medigraphic*, 662-669.
- Tume-Farfán, L. F. (2014). Las alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer. *El Sevier* , 201:270.
- Uribe, D., Cortés, & F. (2014). Melitación del DNA: Implicaciones en carcinogénesis. *Revista Cubana de investigaciones biomédicas*, 81:93.
- Williams, C., Edvarsson, K., Lewandowski, S., & Ström. (2007). A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Nature*, 1019:1032.
- Zepeda, J., Recinos, E., & Cuéllar, M. (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama. *. Medigraphic*, 87-93.

ANEXO 1.0



HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA COMITE DE ETICA E INVESTIGACION



CONSENTIMIENTO INFORMADO GRADUAL PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS ENZIMÁTICOS Y/O GENÉTICOS

Médico que informa Dr. Xicotencatl Jiménez y Dra. Ángela Hernández
del Servicio ONCOLOGIA Hospital HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
Teléfono 57477560

Persona a quien se informa _____, de
_____ de edad, con y domicilio en calle _____, núm.
_____ Delegación o Municipio _____ C.P. _____

Muestra: 1 Sangre, 1 Biopsia de piel, 1 Otras sangre periférica y biopsia de tejido mamario
Declaro estar informado de la finalidad del estudio y, en este sentido, haber comprendido que (nombre del paciente) _____

puede estar afectado o ser portador de un trastorno genético/metabólico hereditario y que el diagnóstico se basa en los resultados de pruebas de laboratorio, que se realizan a partir de muestras biológicas del paciente, y de otros familiares cuando sea necesario.

La técnica puede fracasar por no conseguir la extracción de DNA o por otros problemas de laboratorio que impidan la emisión de un diagnóstico completo. En el análisis genético, las técnicas actuales no permiten la detección del 100% de las mutaciones.

Asimismo, y de acuerdo con lo establecido en la ley, se le informa de que:
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

El estudio se llevará a cabo por el CENTRO _____,
que constituye la comisión científica de HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO, y
que está ubicado en Instituto Politécnico Nacional 5160. Col. Magdalena de las Salinas. D.F. México.

El proyecto lleva por título: "Evaluación de la frecuencia del SNP rs2066853 del receptor para hidrocarburos arilo (AhR) en un grupo de mujeres sanas y otro con cáncer de mama del hospital Juárez de México" con número de registro: HJM2055/12-B

A dicho centro se remitirá la muestra biológica y en el mismo se archivarán mis datos los cuales son totalmente confidenciales y a entero resguardo del investigador responsable.

Que las únicas personas que tendrán acceso a los resultados de los análisis serán los integrantes de los equipos del mencionado centro de investigación y los profesionales del servicio del hospital vinculados a la asistencia del paciente.

Se le advierte sobre la posibilidad de descubrimientos inesperados en el proceso de análisis de la muestra, no relacionados con la patología de diagnóstico, y respecto a los mismos manifiesta:

- 1.- **Querer conocerlos.**
- 2.- **No querer conocerlos.**
- 3.- **Delegar en el médico esa decisión.**

HJM-DIE-011-4-AP



**HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
COMITE DE ETICA E INVESTIGACION**



Se le advierte igualmente de la implicación que puede tener para sus familiares la información que se llegue a obtener y de la conveniencia de que, en ese supuesto, sea el propio paciente (o su representante en su caso) quien les transmita dicha información.

Por último, se le comunica el compromiso de este Servicio hospitalario de suministrarle consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del análisis.

Doy consentimiento al Servicio de Unidad de Investigación
del Hospital Juárez de México y a otras Instituciones que colaboran con este Hospital

para utilizar estas muestras para el proceso diagnóstico.

Adicionalmente, doy consentimiento para que a la finalización del estudio. El Investigador Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández pueda utilizar la muestra biológica para la investigación de la patología cuyo diagnóstico se pretende y en otras líneas de investigación relacionadas con aquélla.

1.- Si.

2.- No.

En caso afirmativo, se le informa de lo siguiente:

- Que la finalidad de la investigación será la patología objeto de diagnóstico y otras relacionadas con esta última, y que se realizará previo informe favorable del Comité ético.
- Que los beneficios esperados de dicha investigación consistirán en un mayor conocimiento de la enfermedad Cáncer de mama
- Que, si lo acepta, podrá ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras, para lo cual la forma en que prefiere ser contactado es:

1.- Lo acepto y deseo que sea por carta a mi domicilio.

2.- Lo acepto y deseo que sea por teléfono (_____).

3.- No lo acepto.

- Que el responsable de la investigación será Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández se llevará un archivo con los datos personales, pudiendo ejercitar ante el mismo los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, en los términos previstos en la Ley de protección de datos de carácter personal.
- El sujeto tiene derecho a revocar este consentimiento en cualquier momento, y a decidir también la destrucción o anonimización de la muestra.



**HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
COMITE DE ETICA E INVESTIGACION**



- Que al final de la investigación o investigaciones autorizadas el destino de la muestra será su destrucción o anonimización.
- Que tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que existe la posibilidad de que se obtenga información relativa a su salud derivada de los análisis genéticos, en relación a lo cual decide:

1.- Querer conocerla

2.- No querer conocerla

- Que la información que se obtenga puede tener implicaciones para los familiares del sujeto fuente de la muestra, de lo que resulta la conveniencia de que sea este último (o su representante, en su caso) quien la transmita.

En _____, a _____ de _____ de _____.

Médico responsable / Paciente o persona responsable / Testigo (en su caso)

ANEXO 2.0



MethylCode™ Bisulfite Conversion Kit

Catalog no. MECOV-50

Version A
6 March 2007
25-1015

DNA Methylation

DNA methylation is a naturally occurring event in both prokaryotic and eukaryotic organisms. In prokaryotes, DNA methylation provides a way to protect host DNA from digestion by their own restriction enzymes that are designed to eliminate foreign DNA. In higher eukaryotes DNA methylation acts as another method for the regulation of gene expression (Costello & Plass, 2001).

Aberrant methylation is a widespread phenomenon in cancer and may be among the earliest changes to occur during oncogenesis (Stirzaker *et al.*, 1997). DNA methylation has also been shown to play a central role in gene imprinting, embryonic development, X-chromosome gene silencing, and cell cycle regulation.

In many plants and animals, DNA methylation consists of the addition of a methyl group to the fifth carbon position of the cytosine pyrimidine ring via a methyltransferase enzyme (Adams, 1995). The majority of DNA methylation in mammals occurs in 5'-CpG-3' dinucleotides, but other methylation patterns also exist. In fact, about 80 percent of all 5'-CpG-3' dinucleotides in mammalian genomes are found to be methylated, whereas the majority of the 20 percent that remain unmethylated are within promoters or in the first exons of genes.

Example of Bisulfite Conversion

(hMLH1)
aggaggccaC GggcaagtCG ccctgaCGca gaCGctccac



Bisulfite treatment

aggaggttaC GggttaagtCG ttttgaCGta gaCGttttat

DNA sequencing before and after bisulfite conversion reveals that methylated cytosines (in caps) remain intact while unmethylated cytosines (lower case) are completely converted to uracil and detected as thymine following PCR.

Continued on next page

Appendix

Optimization and PCR Guidelines

Alternative Thermal Cycling Programs

The thermal cycling program provided in the Bisulfite Conversion Procedure, Step 3, page 6, will generate consistent results for both easy and difficult-to-convert DNA templates, including GC-rich templates.

The alternative programs below may yield better results in PCR amplification of longer DNA fragments. Note that these programs may result in incomplete cytosine-to-uracil conversion of DNA templates with >80% GC composition.

Alternative 1:

1. 98°C for 10 minutes
2. 53°C for 30 minutes
3. 8 cycles of:
 - 53°C for 6 minutes
 - 37°C for 30 minutes
4. 4°C storage

Alternative 2:

1. 98°C for 10 minutes
 2. 53°C for 4 hours
 3. 4°C storage
-

Primer Design

For PCR amplification of the bisulfite-converted DNA, we recommend using primers that are 24–26 bases in length. For human and mouse DNAs, all unmethylated C's (*i.e.*, non-CpG) will be converted into uracils during the bisulfite treatment. Therefore, these C's should be treated as T's for primer design purposes. For example, for the sequence 5'-AACCTTACAGGCAC-3', the corresponding primer should be 5'-AATTTTATAGGTAT-3'.

Continued on next page