



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Implementación del método de conversión
por bisulfito de sodio y secuenciación
masiva para el análisis de metilación en
genes conductores del cáncer de mama**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

Ana Cristina Paredes Gutiérrez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Claudia Fabiola Méndez Catalá



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2021



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.

DEDICATORIA

A mi tía-hermana Karen por ser mi ejemplo de trabajo constante, por ser mi motivación, por ser mi guía, por impulsarme a intentarlo todo, aunque pareciera imposible y porque sin su apoyo no lo habría logrado.

A mis papás, por elegir mis sueños sobre su tranquilidad, por aceptar mis decisiones a pesar de no estar de acuerdo, por no dejarme sola y creer en mí, por impulsarme a no rendirme y buscar conmigo cambiar los patrones sociales de nuestro entorno. A mi mamá, por sus consejos y su guía espiritual que me ayudó y fortaleció en los momentos difíciles durante esta etapa, por darme tanto amor cada vez que regresaba a casa y cargarme de energía y valor cuando tenía que tomar el autobús. A mi papá, por todo su amor, paciencia y confianza, por acompañarme desde el primer día, por estar siempre dispuesto a apoyarme en todas las formas que lo necesitara.

A mis hermanos Daniela, Beto y Alison, por crecer conmigo, por ser la alegría de mi vida, por todo su cariño y las peleas también, aprendo de ustedes más de lo que imaginan.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por permitirme ser parte de sus estudiantes y dejarme cumplir lo que parecía inalcanzable, por enseñarme que ningún sueño es demasiado grande y ningún soñador demasiado pequeño, por todas sus enseñanzas y las aventuras que sin duda nunca olvidaré. No tengo las palabras para describir la inmensa gratitud que siento para con mi queridísima UNAM.

Al Dr. Felipe, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo y confiarme todo lo necesario en su laboratorio, por creer en mis capacidades e impulsarme siempre a seguir intentándolo y no rendirme a pesar de mis fallidos resultados.

A la Dra. Fabiola, por su paciencia y enseñanza en el trabajo de laboratorio, por toda su ayuda durante este proyecto, por sus consejos, por aceptarme como su alumna y apoyarme siempre en todos los aspectos, tanto académicos como personales.

Al Dr. Glustein por sus pláticas y consejos, ampliando mi panorama fuera cual fuese el tema, siempre valoraré sus consejos. A la Dra. Clara, al Dr. Ignacio y al Dr. Aldo por apoyarme en la última fase de mi proceso, por sus enseñanzas y consejos.

A mis padres por su apoyo incondicional y todos los momentos de incertidumbre que aceptaron pasar por mí. A mis abuelos, por sus oraciones, su cariño y su apoyo. A mis tías Karen y Cristina, y a mi hermana por su cariño infinito desde siempre.

A Daniel, por acompañarme durante toda esta etapa, por siempre estar dispuesto a escucharme y aconsejarme en los momentos que se me complicaban las cosas. Gracias.

A mis amigas Aimeé, Alexa, Anita, Xia y Andy, por acompañarme durante esta etapa, por reconfortarme y hacerme sentir que no estaba sola, por todos los días buenos y malos que pasamos, las quiero.

A mis compañeros del laboratorio Monse, Cris, Jime, Stef, Bony, Pao, Sebastián, Luis y Jahel, por su amistad, compañía y apoyo. De manera especial agradezco a Miguel, Héctor y Ernest por todo su apoyo en el análisis de resultados de este trabajo, por su paciencia, tiempo y amistad.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA205519. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Investigación realizada también con el apoyo del Proyecto CONACyT Ciencia Básica Número 37785.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. DEFINICIÓN DE CÁNCER.....	2
2.2. ETAPAS DEL DESARROLLO DEL CÁNCER	2
2.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	2
2.4. CÁNCER DE MAMA.....	4
2.5. SÍNDROME DE CÁNCER DE MAMA Y OVARIO HEREDITARIO	10
2.6. GENES CONDUCTORES DEL CÁNCER DE MAMA.....	11
2.7. DEFINICIÓN DE EPIGENÉTICA	13
2.8. MECANISMOS EPIGENÉTICOS.....	13
2.9. METILACIÓN DEL ADN.....	14
2.10. MOLÉCULAS RESPONSABLES DE LA METILACIÓN	15
2.11. METILACIÓN DEL ADN DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	16
2.12. FACTORES QUE ALTERAN LOS NIVELES DE METILACIÓN	17
2.13. ENFERMEDADES INVOLUCRADAS CON ALTERACIONES EPIGENÉTICAS.....	18
2.14. EVENTOS TEMPRANOS QUE OCURREN EN LA CARCINOGENESIS	19
2.15. METILACIÓN DEL ADN EN CÁNCER DE MAMA	20
2.16. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA METILACIÓN	22
3. ANTECEDENTES	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. HIPÓTEISIS	26
6. OBJETIVOS	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
7.2. LÍNEA CELULAR MCF-7.....	27
7.3. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE SANGRE PERIFÉRICA TOTAL.....	27
7.4. CUANTIFICACIÓN DE ADN Y CALIDAD DEL ADN	28
7.5. DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS DE METILACIÓN.....	28
7.6. CONVERSIÓN DE ADN POR BISULFITO DE SODIO.....	30
7.7. CUANTIFICACIÓN DE ADN CONVERTIDO POR BISULFITO DE SODIO	31
7.8. AMPLIFICACIÓN POR PCR	32
7.9. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR	33
7.10. PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS	33
7.11. CUANTIFICACIÓN, CALIDAD Y MEZCLA DE BIBLIOTECAS	35
7.12. SECUENCIACIÓN MASIVA EN PARALELO (ILLUMINA).....	35
7.13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	36
8. RESULTADOS.....	38
8.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE PERIFÉRICA TOTAL DE C1	38
8.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO	39
8.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE REGIONES PROMOTORAS EN GENES CONDUCTORES DE CÁNCER DE MAMA	40
8.4. CONVERSIÓN DE ADN GENÓMICO CON BISULFITO DE SODIO.....	43
8.5. AMPLIFICACIÓN DE ADN CONVERTIDO CON BISULFITO DE SODIO	43
8.6. ANÁLISIS DE BIBLIOTECAS DE SECUENCIACIÓN.....	44

8.7.	ANÁLISIS DE CALIDAD DE LAS LECTURAS DE SECUENCIACIÓN	46
8.8.	ANÁLISIS DE METILACIÓN	49
9.	DISCUSIÓN.....	52
10.	CONCLUSIONES	58
11.	PERSPECTIVAS	59
12.	REFERENCIAS	59
13.	ANEXOS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiología del cáncer en el mundo, ambos sexos, todas las edades..	3
Figura 2. Epidemiología del cáncer en México.	4
Figura 3. Anatomía de glándula mamaria con neoplasia maligna y principales tipos de cáncer de mama.	5
Figura 4. Moléculas implicadas en la metilación del ADN.	16
Figura 5. Eventos subyacentes que ocurren en la carcinogenesis.	18
Figura 6. Represión transcripcional típica de un gen supresor tumoral por metilación aberrante ...	20
Figura 7. Alteraciones epigenéticas involucradas en el cáncer de mama	21
Figura 8. Cobertura de técnicas de metilación en ADN convertido con bisulfito de sodio.	24
Figura 9. Cascada de reacciones químicas que ocurren durante la conversión de citosinas no metiladas a uracilos	30
Figura 10. Programas de PCR utilizados	32
Figura 11. Proceso de preparación de bibliotecas de secuenciación	34
Figura 12. Ejemplo de una biblioteca final.	35
Figura 13. Proceso de secuenciación por síntesis.	35
Figura 14. Flujo de análisis bioinformático de los datos de secuenciación obtenidos.	37
Figura 15. Extracción e Integridad de ADN genómico en electroforesis en gel de agarosa al 0.8%	39
Figura 16. Diseño de oligonucleótidos específicos para secuenciación de Bisulfito	39
Figura 17. Productos de PCR de MCF-7 y C1 en gel de agarosa al 1.5%.	44
Figura 18. Electroferogramas de una electroforesis de alta resolución (Bioanalyzer).	46
Figura 19. Filtrado de lecturas que no cumplieron con la calidad de Q30	44
Figura 20. Calidad de las lecturas obtenidas de secuenciación masiva en paralelo.	48
Figura 21. Eficiencia de mapeo de secuenciación directa de bisulfito mediante el alineador Bismark.	49
Figura 22. Heat map 1. Representación de porcentaje de metilación en regiones promotoras de genes conductores del cáncer de mama.	50
Figura 23. Heat map 2. Análisis de metilación diferencial de sitios CpG en la región promotora de genes conductores del cáncer de mama.	51
Figura 24.. Región promotora en PTEN.	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de cáncer de mama y terapias dirigidas	10
Tabla 2. Mecanismos de regulación de genes conductores en cáncer de mama.	12
Tabla 3. Genes conductores de cáncer de mama relevantes en este trabajo	12
Tabla 4. Enfoques de análisis de metilación del ADN por secuenciación de próxima generación.	22
Tabla 5. Cuantificación por Qubit para ADN de doble cadena	39
Tabla 6. Conversión in silico de las secuencias seleccionadas de la región promotora de genes conductores en cáncer de mama.	42
Tabla 7. Características de primers específicos para secuenciación directa de PCR (BSP) de ADN convertido con bisulfito de sodio.	43
Tabla 8. Características de la conversión de ADN con bisulfito de sodio.	43
Tabla 9. Molaridad de las bibliotecas esperadas respecto al total de moléculas en cada muestra.	45

Abreviaturas

AS: Síndrome de Angelman	IC: centro de impresión
BWS: Síndrome de Beckwith-Wiedemann	ICR: región de control de impresión
BRCA1: Breast cancer 1	KLLLN: killin, inhibidor de la replicación del ADN regulado por p53
BRCA2: Breast cancer 2	MBD: Proteína de unión a metil
CpG: Citosina-fosfato-Guanina	MGMT: Metil guanin metiltransferasa
CDH1: Caderina 1	MSH2: Homólogo de mutS humano
CHEK2: serina/treonina proteína quinasa CHK2	MLH1: Homólogo MutL 1
DCIS: Carcinoma Ductal in situ	PWS: síndrome de Prader-Willi
DNMT: ADN metiltransferasa	PR: Receptor de progesterona
DAPK1: proteína quinasa 1 asociada a la muerte celular	PI3KA: isoforma alfa de la subunidad catalítica de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato 3-quinasa
ERBB2: oncogén eritroblástico B2	PALB2: socio y localizados de <i>BRCA2</i>
ER: Receptor de estrógeno	PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
FMR1: retraso mental 1 por X frágil	PWS: Síndrome de Prader-Willi
HDAC: histona desacetilasa	RAD51: Recombinasa 51
HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano	RH: Recombinación homóloga
HNPCC: Síndrome colorrectal hereditario sin poliposis	TSG: gen supresor tumoral
HDM: Histona desmetilasa	TDG: Glicosilasa de Timina-ADN
HDAC: Histona desacetilasa	TET: Ten Eleven Translocation
HMT: Histona metiltransferasa	TP53: Proteína tumoral 53
HAT: Histona acetiltransferasa	TRH: Reemplazo Hormonal
IARC: <i>International Agency for Research on Cancer</i>	Postmenopáusico
IDC: Carcinoma Ductal Inespecífico	5mC: 5 metil citosina
ILC: Carcinoma lobular in situ	

1. RESUMEN

El cáncer es un problema de salud mundial, posicionándose como la segunda causa de muertes en todo el mundo. Dentro de las principales neoplasias malignas se encuentra el cáncer de mama, que es una enfermedad altamente heterogénea, en la que se han identificado causas con implicaciones genéticas y epigenéticas. Como parte de los mecanismos epigenéticos está la metilación de ADN, que consiste en la adición de un grupo metilo en la citosina, principalmente en dinucleótidos CpG. Frecuentemente, la región promotora de los genes es regulada por sitios ricos en CpG (islas CpG), se ha visto que este mecanismo de regulación génica puede estar alterado en oncogenes (hipometilación) y genes supresores de tumor (hipermetilación), generando activación o silenciamiento génico, respectivamente. En la última década, las alteraciones epigenéticas se han evidenciado en varias enfermedades, específicamente, en cáncer de mama se ha propuesto que la hipermetilación del ADN es el evento inicial que detona la transformación maligna celular en un 5-10% de los casos. Una forma de medir la metilación del ADN es mediante la técnica de secuenciación directa de PCR convertida por bisulfito de sodio (BSP), con este método es posible identificar la metilación a una resolución sitio específica, con una alta cobertura y profundidad, lo que la hace ser una de las mejores metodologías para este tipo de análisis.

En este trabajo se analizaron fragmentos de la región promotora de cinco genes conductores del cáncer de mama, con el objetivo de implementar el método de conversión por bisulfito de sodio y secuenciación masiva en el análisis de metilación del ADN, dentro de la región promotora de los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* y *PTEN*, usando como modelo de estudio ADN genómico de la línea celular MCF-7 y de una persona saludable (C1). Nuestros resultados indicaron una óptima amplificación y conversión con bisulfito de sodio. En cuanto al estado de metilación, la línea celular MCF-7 presentó mayores niveles de metilación en *BRCA1*, *CHEK2* y *PALB2* que la muestra C1, mientras que en *BRCA2* y *PTEN* se presentaron niveles mayores de metilación en C1 que en MCF-7. Particularmente, la región analizada en *PTEN* presentó hipermetilación en ambas muestras. Por lo que se concluye que la metodología empleada es eficiente para lograr identificar metilación aberrante sitio específica y, además, es ideal para ser implementada en amplios lotes de muestras de pacientes con cáncer de mama u otra patología, lo que podría ayudar a los métodos de diagnóstico y pronóstico de enfermedades.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Definición de cáncer

El cáncer, según el Instituto Nacional del Cáncer (EE. UU.), es definido como las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control, y que además, tienen la capacidad de invadir tejidos adyacentes (1). La pérdida de control del crecimiento celular en tales células es causada por la acumulación de múltiples alteraciones en los mecanismos genéticos y epigenéticos durante un periodo (2). Los cambios de expresión génica conducen al desequilibrio en procesos como la replicación, proliferación, muerte celular, angiogénesis, estabilidad genómica de la célula y, finalmente, a la progresión de poblaciones celulares con habilidades de invasión y metástasis (3).

2.2. Etapas del desarrollo del cáncer

El cáncer se desarrolla en tres etapas: iniciación, promoción y progresión.

- La iniciación implica la alteración, cambio o mutación en genes. Esto puede surgir espontáneamente o ante la exposición a carcinógenos. Las alteraciones genéticas pueden conducir a alteraciones en vías de señalización bioquímicas asociadas con la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Estas pueden verse influenciadas por una serie de factores incluidos el grado y tipo de metabolismo cancerígeno, y la respuesta del daño a la reparación del ADN.
- La etapa de promoción es considerada como un proceso relativamente largo y reversible, en el que se acumulan células preneoplásicas en proliferación activa.
- Por último, la etapa de progresión y metástasis incluye la fase entre una progresión premaligna y el desarrollo del cáncer invasivo. En esta etapa ocurre la transformación final neoplásica, se producen cambios genéticos y fenotípicos. Adicionalmente, una proliferación celular que aumenta el tamaño del tumor donde las células pueden experimentar mutaciones adicionales con potencial invasivo y metastásico (4).

2.3. Epidemiología del cáncer

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial, puesto que una de cada seis defunciones se debe a esta enfermedad, lo que le confiere el segundo lugar de causas de muerte en el mundo (5). En 2018, *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) reportó que a nivel mundial hubo un estimado de 18.1 millones de nuevos casos de cáncer y 9.6 millones

de muertes por cáncer en todo el mundo (6), estos casos comparados con los reportes del 2012, se han visto fuertemente incrementados, pues dicho año el número de nuevos casos fue de 14.1 millones y de 8.2 millones de muertes (7).

Las neoplasias malignas con mayor incidencia reportadas en 2019 corresponden en primer lugar al cáncer de pulmón con 11.6% del total de casos de cáncer, seguido por el cáncer de mama con el mismo porcentaje (11.6%), cáncer colorrectal con 10.2%, cáncer de próstata 7.1%, cáncer de estómago 5.7%, cáncer de hígado 4.7% y en séptimo lugar cáncer de esófago con 3.2%. Estos datos fueron recopilados de 185 países y 36 tipos de cáncer (Figura 1A). En cuanto a la mortalidad, las neoplasias malignas con mayor mortalidad son: el cáncer de pulmón con 18.4% del total de muertes, el cáncer colorrectal ocupa el 9.2%, cáncer de estómago 8.2%, cáncer de hígado 8.2%, cáncer de mamá con 6.6%, cáncer de esófago 5.3% y cáncer de páncreas con 4.5% (Figura 1B) (8).

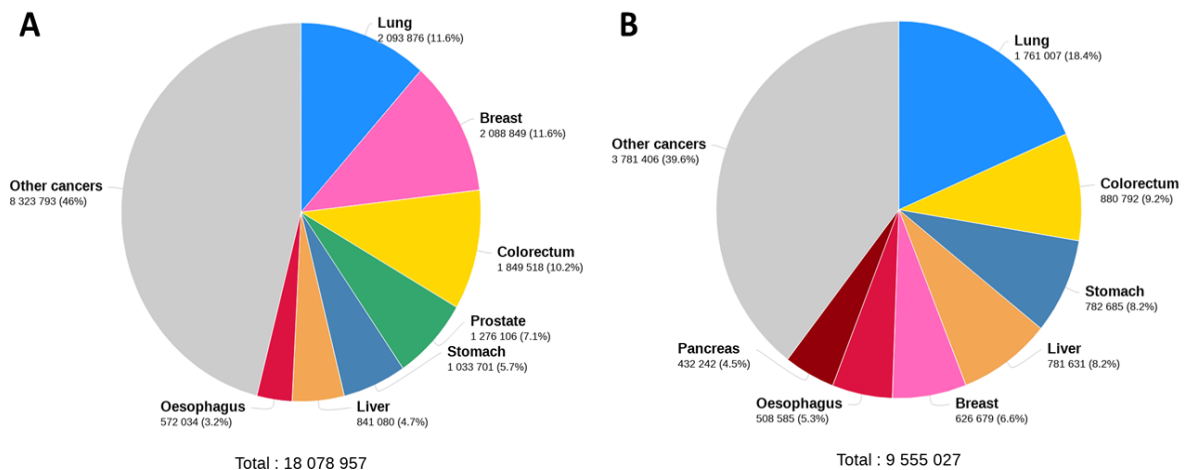


Figura 1. Epidemiología del cáncer en el mundo, ambos sexos, todas las edades. A. Números de incidencia estimada a nivel mundial. **B.** Números de mortalidad por cáncer en el mundo (Tomado de GLOBOCAN (9)).

Dentro de todas estas neoplasias malignas, el cáncer de mama es la principal en mujeres en todo el mundo (sólo $\approx 1\%$ de los casos de cáncer de mama afecta a hombres), en 2018 se estimaron 2.1 millones (Figura 1) de mujeres diagnosticadas con nuevos casos, lo que significa un caso nuevo diagnosticado cada 18 segundos (10). Además, es una de las cinco neoplasias malignas con mayor mortalidad a nivel mundial, 626,679 mujeres murieron por cáncer de mama en 2018 (5). Estos valores se deben a que en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad es curable en 70-80% de los casos, sin embargo, en etapas metastásicas (etapa avanzada) se considera incurable (10).

2.3.1. Epidemiología del cáncer en México

En México, la principal incidencia neoplásica y causa de muerte en mujeres corresponde a cáncer de mama. A partir de un registro del 2006 al 2015 realizado por la Secretaría de Salud se presenta un incremento en el número de muertes por esta enfermedad. Lo anterior coincide con datos nacionales reportados en el año 2017 por el INEGI, donde muestra que la población femenina mayor de 20 años es la más afectada por neoplasias malignas, siendo el cáncer de mama el tumor maligno con mayor frecuencia en la población en general, con un 17.6% de todos los casos de cáncer (11,12).

Con respecto a los últimos reportes del GLOBOCAN, el cáncer de mama se presenta como la principal neoplasia maligna en la población mexicana, con 14.2% (227,017) del total de incidencias de cáncer y en cuarto lugar con 7.9% (59,442) del total de muertes por cáncer corresponden a dicha neoplasia (Figura 2) (8).

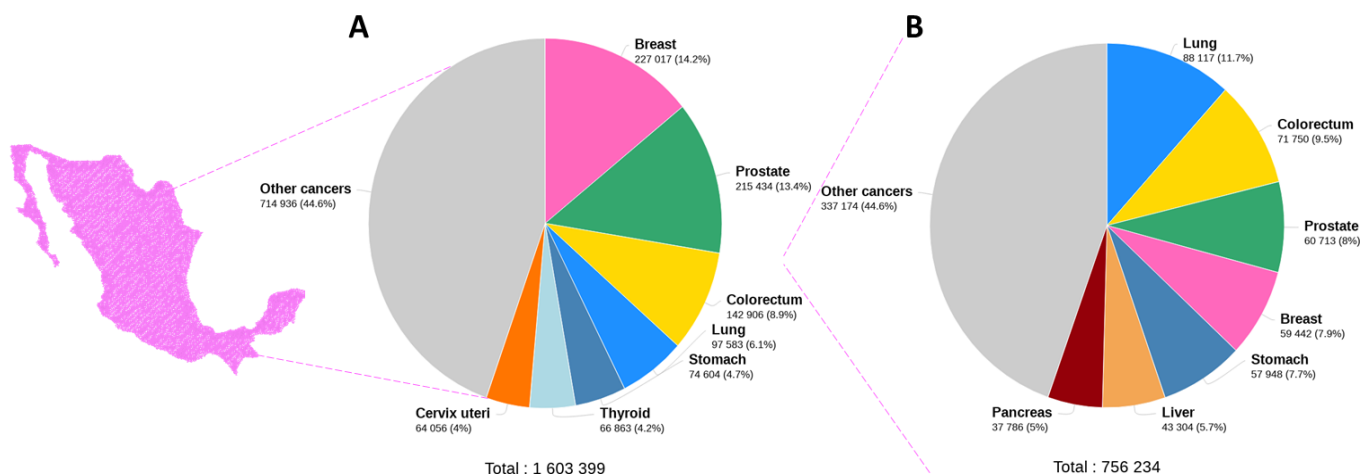


Figura 2. Epidemiología del cáncer en México. A. Incidencia de nuevos casos de cáncer en ambos sexos, todas las edades, reportados en 2018. **B.** Muertes por cáncer en ambos sexos, todas las edades, reportados en 2018 (Tomado de GLOBOCAN (9)).

2.4. Cáncer de mama

El cáncer de mama es la proliferación descontrolada de las células de tejido mamario. Todos los tipos de cáncer de mama surgen en las unidades funcionales de la mama, es decir, en la unidad ducto-lobular terminal que está formado por un lóbulo y su correspondiente conducto terminal extra lobular (10). Por su naturaleza celular, se denominan carcinomas, pues su origen es en las células epiteliales. De acuerdo con sus características histológicas altamente glandular, se denominan adenocarcinomas al cáncer de mama originado en los lóbulos o conductos lactíferos (Figura 3) (13).

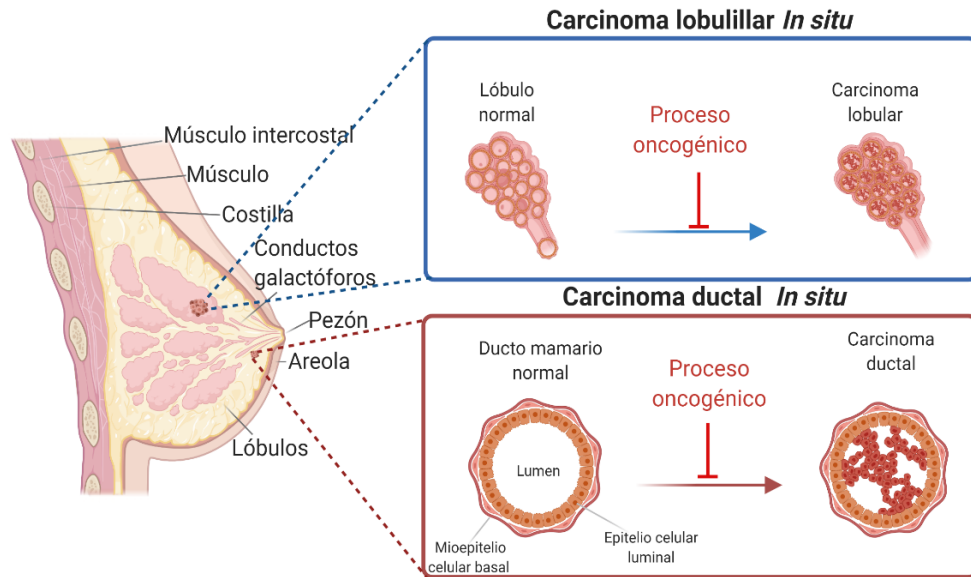


Figura 3. Anatomía de la glándula mamaria con neoplasia maligna y dos tipos de cáncer de mama. Modificada de Harbeck *et al.*, 2019 (10). Creada con BioRender.com.

Las características biológicas subyacentes en el fenotipo de cáncer de mama, han permitido mejorar su diagnóstico y tratamiento. Con ello se ha logrado que en estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad sea considerada curable en 70-80% de los casos. Sin embargo, en etapas metastásicas (etapa avanzada) se considera incurable (10).

2.4.1. Factores de riesgo en cáncer de mama

Se han asociado múltiples factores que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, los cuales se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su naturaleza biológica, su modificabilidad y de acuerdo con la literatura. El primer grupo corresponde a los factores intrínsecos, los cuales comprenden las alteraciones espontáneas inevitables que surgen por errores aleatorios durante la replicación del ADN, estos no son modificables y dependen de la tasa de mutación (14).

El segundo grupo corresponde a factores extrínsecos, que se subclasifican de acuerdo con su modificabilidad en: endógenos (parcialmente modificables) y exógenos (modificables). Dentro de los factores de riesgo endógenos está el envejecimiento, la susceptibilidad genética, los mecanismos de reparación del ADN, hormonas, entre otros. Como parte de los factores de riesgo exógenos está la exposición a radiación y carcinógenos químicos, la dieta y estilo de vida, virus que causan tumores, etc. (14). A continuación, se describen algunos factores de riesgo extrínsecos.

Factores Endógenos

❖ Envejecimiento

El riesgo que surge con la edad se debe a que, con el envejecimiento se acumulan otros factores de riesgo, que se combinan con la pérdida de eficiencia de los mecanismos de reparación celular (15).

❖ Factores familiares y predisposición heredada

Del 5% al 10% de las mujeres que desarrollan cáncer de mama presentan una historia familiar de la enfermedad. El riesgo se ve incrementado de 1.5-3 veces cuando los parientes son de primer grado (mamá o hermana). Sin embargo, este factor de riesgo es heterogéneo, pues depende del número de parientes con la enfermedad, la relación exacta, edad de diagnósticos y el número de parientes no afectados (16).

Las pacientes con mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, presentan una susceptibilidad y predisposición genética de tipo autosómica dominante para el desarrollo del cáncer de mama. El riesgo de desarrollar la enfermedad en portadores con mutaciones *BRCA1* es de 10%, y 27% en portadores de mutaciones *BRCA2*, mientras que en portadores con ambas mutaciones (*BRCA1* y *BRCA2*) varía en 26% a 85% (17). Sin embargo, se han reportado otras mutaciones genéticas de predisposición hereditaria en el desarrollo de la enfermedad, entre ellas, mutaciones en *PTEN* que aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad de 67-85% (18), en *CHEK2* se ha reportado un riesgo >20% (19), en *PALB2* un riesgo del 35% (16) y mutaciones germinales en *TP53* aumentan el riesgo >90%(20).

❖ Factores hormonales

El desarrollo del cáncer de mama muestra una relación con los cambios fisiológicos que se adquieren durante la vida reproductiva, tales como menarquia, embarazos y menopausia (21). La edad temprana de menarca, nuliparidad, edad avanzada en el primer embarazo y edad avanzada en la menopausia son eventos de implicación con el aumento de riesgo de desarrollar la enfermedad por factores hormonales con un valor de riesgo relativo ≤ 2 (16).

Lo anterior se explica con base en que las hormonas reproductivas femeninas, estrógenos endógenos particularmente, son un tipo de carcinógenos humanos, producidos por los ovarios, la exposición prolongada ante estas hormonas incrementa el riesgo del desarrollo de cáncer de mama (22). En mujeres posmenopáusicas, con obesidad y con terapia de

reemplazo hormonal posmenopáusica (TRH), los niveles de estrógeno y los niveles plasmáticos de estradiol están asociados con un mayor riesgo de cáncer de mama (16).

Por otro lado, la privación de estrógenos a través de la menopausia prematura iatrogénica se ha visto que reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad, por lo que, en portadores de mutaciones en BRCA se ha empleado como una alternativa de prevención (23). Además, el retraso de la menarquia se ha visto que reduce el riesgo de cáncer de mama en un 20% por cada año (16).

Factores Exógenos

❖ Dieta y estilo de vida

Se han relacionado las dietas altas en grasas con el incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, en mujeres con índices de masa corporal ≥ 31.1 el riesgo es 2.5 veces mayor que en mujeres con índices de masa corporal ≤ 22.6 . Esto se debe a que tener más tejido graso eleva los niveles de estrógeno, además, el sobrepeso tiende a elevar los niveles de otra hormona, la insulina (16,24). Adicionalmente, se ha aceptado que la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama postmenopáusico, pero no premenopáusico (25).

Otro hábito alimenticio que incrementa el riesgo en forma lineal es el consumo de alcohol, aunado a ello está la baja ingesta de nutrientes como vitamina C, folato y β -carotenos que incrementan el riesgo del desarrollo de la enfermedad (16).

❖ Factores ambientales

La exposición a radiación ionizante (rayos X, rayos γ o en forma de partículas subatómicas α y β) incrementa el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Este tipo de radiación produce daño a nivel molecular, específicamente en el ADN, induciendo roturas de doble cadena (DSB) y generando especies reactivas de oxígeno (ROS) que oxidan proteínas y lípidos, y éstas a su vez, inducen daños al ADN (generación de sitios abásicos y roturas monocatenarias (SSB) (26). A nivel celular, el daño genera inestabilidad genómica y con ello las células pueden presentar una ventaja de crecimiento selectivo y proliferación ante las células sanas (27).

2.4.2. Clasificaciones del cáncer de mama

El cáncer de mama se caracteriza por ser una enfermedad altamente heterogénea (28). De acuerdo con el último reporte generado por la Organización Mundial de la Salud, los carcinomas de mama se clasifican en 19 subtipos por sus características histológicas, moleculares e histoquímicas (29).

2.4.2.1. Clasificación histológica

- Carcinomas Pre-Invasivos: con base en los patrones de crecimiento y las características citológicas se subdividen en carcinoma ductal *in situ* (DCIS) y carcinoma lobular *in situ* (CLIS). El DCIS se extiende a través de los conductos, distorsionando la arquitectura ductal, este tipo puede progresar a cáncer invasivo unilateral, mientras que el CLIS no distorsiona la arquitectura del conducto y puede progresar a cáncer bilateral (10).
- Carcinomas Invasivos: este grupo se subdivide en carcinoma ductal de tipo no específico (IDC) y carcinoma lobular (ILC). El IDC representa del 70-80% de los tumores, se desarrolla a partir de DCIS, su crecimiento produce las características histológicas de una masa fibrosa y adquiere la fase de metástasis a través de los vasos sanguíneos y vasos linfáticos. El ILC en las células tumorales aisladas (con mutaciones *CDH1*) presentan una respuesta fibrosa mínima y adquieren la fase de metástasis principalmente a través de vísceras (10).

2.4.2.2. Clasificación Molecular

A partir de estudios genéticos y genómicos en tumores de mama, se han logrado identificar un conjunto de genes que clasifican al cáncer de mama en cuatro subgrupos intrínsecos, según su perfil de expresión génica: tipo basal (tumores que no expresan receptores de estrógeno (ER⁻), receptores de progesterona (PR⁻) y receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2⁻) o triples negativos), subtipo Luminal A (tumores de bajo grado que expresan ER⁺ y PR⁺), subtipo Luminal B (tumores que expresan bajos niveles de receptores hormonales y son de alto grado histológico ER⁺ y PR⁺) y subtipo HER2⁺ (tumores con alta amplificación y expresión del gen *ERBB2*) (30,31).

- Tipo Basal: se expresan 8% de ER, 7% de PR, 7% del HER2, debido a que los porcentajes de expresión son muy bajos se consideran negativos para los tres marcadores. Este subgrupo representa del 10-20% de los tumores de cáncer de

mama, su origen es en las células próximas a la membrana basal de los conductos galactóforos, son tumores con alto grado histológico y altos niveles proliferativos, presentan un pronóstico desfavorable debido a que no se tienen blancos terapéuticos para estos tipos de tumores, aquí se incluyen la mayoría de los tipos de cáncer de mama triples negativos (70-80%) (32).

- Luminal A: expresan 90% ER+, 89% PR+, 14% HER2+ (32), este subtipo molecular representa del 30-60% de casos de cáncer de mama, las células que dan origen a este tipo de tumores son células del lumen de los conductos galactóforos, presentan lento crecimiento y son poco agresivos, su pronóstico es favorable debido a la alta expresión de receptores hormonales lo que permite dar una terapia dirigida (10).
- Luminal B: expresan 98% ER+, 82% PR+, 24%HER2+, este subtipo representa del 10-20% del total de casos de cáncer de mama, son tumores con origen en las células próximas del lumen de los conductos mamarios, son más grandes que los Luminales A y presentan pronóstico pobre. Los tumores de esta subclase presentan un fenotipo particular de hipermetilación con base en los patrones de metilación del ADN de todo el genoma (32).
- Subtipo HER2+: expresan 38% ER+, 20% PR+, 72%HER2+ (32). El gen *ERBB2* es amplificado en 13-15% de casos de cáncer de mama, genera la activación de la vía de señalización de HER2, y a su vez, la activación de la proliferación, supervivencia celular, metástasis y adhesión mediante diferentes vías de señalización, tales como la de *RAS*, *PI3K*, *AKT* y *MAPK* (10).

2.4.2.3. Clasificación inmunohistoquímica

Con base en las diferencias de prevalencia, pronóstico y terapia sistémica se caracteriza el cáncer de mama en tres subtipos: HR+, HER2+ y triple negativo. La mayoría de los tumores de mama (70%) presentan expresión de receptores hormonales, por lo que son el tipo tumoral con mejor pronóstico y mayores opciones de terapia (33). Las terapias que existen para esta neoplasia se han desarrollado de acuerdo con la clasificación inmunohistoquímica que presentan los diferentes tumores, en la tabla 1 se presenta de forma resumida las terapias que existen como tratamiento para esta neoplasia, así como las características patológicas que presentan.

Tabla 1. Tipos de cáncer de mama y terapias dirigidas (Modificado de Waks *et al.*, 2019 (34)).

	Receptor de Hormona (HR) +/HER2-	HER2+ (HR+ O HR-)	Triple Negativo
Definición patológica	≥1% de células tumorales se tiñen positivamente para proteínas de receptor de estrógeno o progesterona.	Las células tumorales se tiñen fuertemente (3+) para proteínas HER2, los genes <i>HER2</i> son amplificados en células tumorales, la mitad también son HR+.	El tumor no cumple ningún criterio patológico para la positividad de la progesterona del receptor de estrógenos o HER2.
Patogénesis molecular	Receptor de estrógeno, es un receptor de hormona esteroide que activa la vía de crecimiento oncogénico.	El oncogén <i>HER2</i> codifica de forma hiperactiva para el receptor tirosina cinasa HER2 de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico.	Desconocido (probablemente varios)
Porcentajes de casos de CM*	70%	15-20%	15%
Pronóstico			
Estadio I (5 años de sobrevida en CM*)	≥99	≥94	≥85
Metástasis (mediana de supervivencia)	4-5 años	5 años	10-13 meses
Terapia sistémica típica en enfermedad no metastásica	Terapia endócrina 5-10 años Quimioterapia 12-20 semanas.	Quimioterapia 12-20 semanas Terapia Endócrina 5-10 años	Quimioterapia 12-20 semanas

*CM: Cáncer de mama

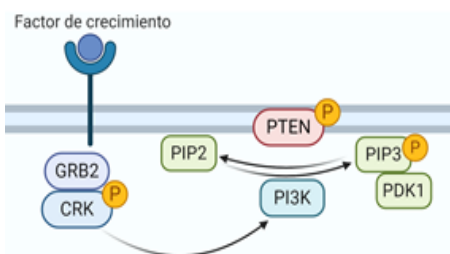
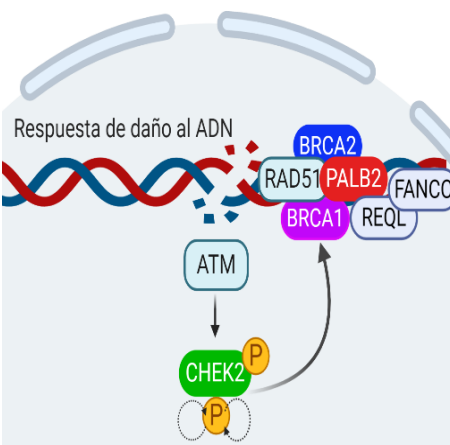
2.5. Síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario

El síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SHCMO) es una enfermedad de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta, que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama y/u ovario. La predisposición genética del SHCMO se debe principalmente a una mutación heredada en un alelo de los genes *BRCA1/2*, seguido de la pérdida de heterocigosidad del alelo correspondiente. Características distintivas de este síndrome incluyen: múltiples miembros familiares con cáncer de mama y/u ovario en edades tempranas, antecedentes de cáncer de mama masculino y mutaciones *BRCA*, entre otras (21).

2.6. Genes conductores del cáncer de mama

La mayoría de los tipos de cáncer son causados por al menos tres alteraciones sucesivas en un periodo de entre 20 a 30 años en genes específicos conocidos como genes conductores. Los genes conductores son aquellos que tienen mutaciones conductoras (gen *Mut-Driver*) o se expresan aberrantemente (gen *Epi-Driver*), confiriendo una ventaja de crecimiento selectivo en la célula en que se encuentran, éstos se clasifican en tres grupos: proto-oncogenes, genes supresores de tumor (TSG) y genes de reparación del daño al ADN (35). Los TSG actúan para prevenir el inicio o progresión de la enfermedad en la reparación de errores, por lo que, cuando hay una pérdida funcional por alguna alteración genética o epigenética, aumenta la ventaja de crecimiento selectivo de la célula en la que residen (36). Los proto-oncogenes cuando se activan por mutación reciben el nombre de oncogenes (OG). Los OG regulan el ciclo celular constitutivamente de forma anormal adquiriendo una ganancia de función, por lo que promueven el cáncer al adquirir defectos genómicos específicos, además, aumentan la ventaja de crecimiento selectivo de la célula en la que se generan (37). La regulación de los TSG comprendidos en este estudio se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Mecanismos de Regulación de un grupo selecto de genes conductores en cáncer de mama.

Gen	Regulación	Señalización celular
<i>PTEN</i> : TSG en Chr10q23, codifica para una proteína fosfatasa.	Antagonista en la vía de señalización oncogénica PI3K-AKT. Doble especificidad: Cataliza reacciones de desfosforilación y reacciones de hidrólisis por su actividad de lípido fosfatasa Procesos celulares: crecimiento, proliferación, supervivencia y metabolismo celular (38).	
<i>CHEK2</i> : TSG en Chr22q12, codifica para la proteína serina/treonina cinasa.	Cinasa no específica que fosforila residuos de serina y treonina. Regulación apoptótica en respuesta al daño al ADN de doble cadena. Regulación del ciclo celular previniendo la entrada en fase M* (39).	
<i>BRCA1</i> : TSG en Chr17q21, codifica para una fosfoproteína nuclear.	Complejo de vigilancia del genoma asociado a ARN polimerasa. Reparación de roturas de doble cadena. Reparación del ADN por RH** (40)	
<i>BRCA2</i> : TSG en Chr13q12, codifica la proteína de susceptibilidad al CM tipo 2.	BRCA2 se une a otras proteínas para arreglar daños de doble cadena del ADN por RH** (40).	
<i>PALB2</i> : TSG en Chr16q12, codifica para la proteína asociada a BRCA2	La proteína PALB2 se une al ADN de cadena sencilla e interactúa directamente con RAD51 para estimular la invasión de cadena en un paso vital de la RH** (41).	

*M=Mitosis **RH=Recombinación Homóloga

Estos genes relevantes para el mantenimiento e integridad del genoma han sido clasificados como genes de susceptibilidad al cáncer de mama, pues al presentar alteraciones germinales, aumentan la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Además, son genes con penetrancia de media a alta, por ejemplo, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN* y recientemente *PALB2*, se han reportado como genes de alta penetrancia (42,43). Los genes *BRCA1* y *BRCA2* aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad con un promedio de 11.4 veces por mutaciones germinales con alta penetrancia. *CHEK2* también aumentan la probabilidad de presentar el fenotipo, de una a dos veces por mutaciones germinales con baja penetrancia (44). Adicionalmente, algunos de estos genes se han visto relacionados con síndromes hereditarios, sus características se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Grupo de genes conductores de cáncer de mama relevantes en este trabajo (Modificado de Harbeck et al., 2019).

Gen clave	Síndrome	Características de mutaciones	Penetrancia	Prevalencia	Tipos de CM
<i>BRCA1</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Síndrome Hereditario de Cáncer de mama. •Síndrome Hereditario de cáncer de mama y ovario 	<ul style="list-style-type: none"> •Mutación no “hot spots” •Supresor tumoral Reparación del rompimiento de doble cadena del ADN	Riesgo acumulado de presentar cáncer de mama a los 70 años con 65% de probabilidad. Muy alta penetrancia.	Autosómica dominante 3 en 1000 Raro Riesgo relativo promedio 11.4	Adenocarcinoma NST* Medular Metastásico Triple negativo 80% tipo basal Femenino y masculino
<i>BRCA2</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Síndrome Hereditario de Cáncer de mama. •Síndrome Hereditario de cáncer de mama y ovario 	Mutación no “hot spots” Supresor tumoral Reparación del rompimiento de doble cadena del ADN	Riesgo acumulado de presentar cáncer de mama a los 70 años con 45% de probabilidad. Alta penetrancia.	Autosómica dominante 7 en 1000 Raro Riesgo relativo promedio 11.7	Adenocarcinoma Fenotipo no distintivo Femenino y masculino
<i>CHEK2</i>	No reportado	Variantes sin sentido Cinasa en punto de control del ciclo celular Reparación del ADN Activador de BRCA1 y p53	Riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama durante la vida con 20-30% de probabilidad. Penetrancia moderada baja.	Autosómico dominante Riesgo relativo promedio de 2.26 para mujeres y 3.13 para hombres Alto en casos con historia familiar Variantes sin sentido confieren riesgo inferior.	Adenocarcinoma NST Clase no distintiva ER positivo, varios de acuerdo con el tipo de mutación. Femenino y masculino Riesgo de presentar cáncer colorrectal
<i>PALB2</i>	No reportado	Mutaciones monoalélicas en la línea germinal Mutaciones bialélicas (anemia Fanconi) Reparación del rompimiento de doble cadena del ADN	Riesgo acumulado de presentar cáncer de mama durante la vida con 33-58% de probabilidad. Penetrancia moderada alta.	Autosómico dominante Riesgo relativo promedio de 5.3	Adenocarcinoma NST Clase no distintiva Páncreas, ovario
<i>PTEN</i>	Síndrome de Cowden	Mutación en línea germinal Variantes y epimutaciones Supresor de tumor Vía de señalización PIK3CA	Riesgo acumulado de presentar cáncer de mama durante la vida con 85% de probabilidad. Muy alta penetrancia.	Autosómica dominante, 1 en 250,000 Riesgo relativo promedio de 25% Muy raro	Adenocarcinoma NST Clase no distintiva Mujeres y hombres Lesiones mamarias benignas.

*NST, tipo no específico (también conocido como carcinoma ductal invasivo)

Sin embargo, los estudios genéticos realizados en cáncer de mama han logrado revelar un amplio panel de genes implicados en la enfermedad (45,46) . Específicamente en pacientes mexicanas con cáncer de mama hereditario se han identificado 21 genes con variantes patogénicas No-*BRCA* (21), sugiriendo que hay otros genes que predisponen al fenotipo de la enfermedad.

Si bien, las mutaciones germinales en genes supresores de tumor pueden causar síndromes de predisposición al cáncer, se sabe que existen otros tipos de alteraciones causales de síndromes hereditarios (47), las cuales son alteraciones de tipo epigenético.

2.7. Definición de epigenética

La epigenética se ha definido como los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN (48), recientemente se ha establecido a la epigenética como "el estudio de moléculas y mecanismos que pueden perpetuar estados alternativos de actividad génica en el contexto de la misma secuencia de ADN" (49).

2.8. Mecanismos epigenéticos

Las modificaciones epigenéticas generan un perfil que controla la actividad génica y es esencial para la diferenciación celular y el desarrollo de tejidos, permitiendo la variabilidad de fenotipos en células genéticamente idénticas (50). Estas modificaciones heredables son transmitidas mediante mitosis y meiosis (51) y constituyen el código epigenético que modula la expresión del genoma durante las etapas del desarrollo en la diferenciación celular (52,53).

Los cambios epigenéticos se pueden clasificar en tres mecanismos químicos principales (54): modificaciones de histonas (55), silenciamiento génico mediado por ARN no codificante, principalmente microARN (56) y metilación del ADN (57). Los microARNs son pequeñas moléculas de 18-25 nucleótidos, recientemente se han identificado sus funciones con relación a la regulación epigenética, las cuales pueden alterar los estados de expresión génica dirigiéndose a los ARNm para degradarlos o bloquear su traducción (58). Las acciones de los microARN y la regulación epigenética parecen formar un ciclo de retroalimentación, el cual al ser desregulado puede interferir con los procesos fisiológicos y patológicos que contribuyen a una variedad de enfermedades (56).

Por su parte, las modificaciones de histonas son reacciones covalentes postraduccionales que ocurren en extremos N-terminales y pueden modificar la arquitectura de la cromatina, así como su distribución espacial. Los mecanismos que provocan estos cambios en la estructura de la cromatina, divergen de la topología nuclear, los complejos polycomb/trithorax y las modificaciones de histonas (59). La topología nuclear está relacionada con los paisajes mutacionales del cáncer (60). Los complejos polycomb/trithorax afectan las modificaciones en las colas de histonas, por lo general el complejo polycomb se asocia con una represión transcripcional (61), mientras que los productos proteicos del trithorax están involucrados con una activación génica (62).

Por lo tanto, las modificaciones de la cromatina afectan las interacciones no covalentes entre histonas o entre histonas y ADN. Las proteínas histonas se asocian en un octámero conformado por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, envueltas por ADN, dando lugar al nucleosoma. Las principales modificaciones de las histonas incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, ribosilación de ADP, deiminación, isomerización de prolina y sumoilación (63). En la modificación de histonas, hay varias enzimas modificadoras de histonas involucradas, incluidas las histonas acetiltransferasas (HAT), histonas metiltransferasas (HMT), desacetilasas de histonas (HDAC) y desmetilasas de histonas (HDM) (64,65). Estas modificaciones de histonas pueden activar o reprimir la transcripción, según su ubicación y tipo, afectando el estado de la cromatina (eucromatina y heterocromatina) (66).

2.9. Metilación del ADN

La metilación del ADN implica una modificación química post-replicativa mediante la adición de un grupo metilo en la posición C5 de la citosina (5mC), en mamíferos afecta principalmente a los dinucleótidos CpG, comprendiendo aproximadamente del 3-6% del total de citosinas del ADN humano (67), sin embargo, este mecanismo se ha evidenciado en otros dinucleótidos (68,69). Las regiones de mayor susceptibilidad a la metilación se conocen como islas CpG (CGI), estas regiones constan de al menos 200 pb, constituidas por más del 50% de CG y una proporción de dinucleótidos CpG mayor a 0.6 (70). Menos del 10% de las 5mC ocurre en CGI (71), lo que sugiere que la metilación del ADN no está distribuida uniformemente sobre el genoma, sino que está asociada con la densidad de CpG (72).

Las CGI generalmente se encuentran asociadas con la región promotora de genes, lo cual se relaciona con la función regulatoria de la metilación sobre la expresión génica. De tal manera que la adición de grupos metilo, impide la unión de los factores de transcripción, además, de atraer proteínas con dominios de unión a CpG metiladas (MBD) para iniciar la compactación de la cromatina; por lo que la metilación del ADN se asocia casi siempre con el silenciamiento en la expresión de los genes o represión transcripcional (59).

Existen dos tipos de metilación del ADN, la que ocurre predominantemente en dinucleótidos CpG, también llamada metilación simétrica, este contexto CpG permite que sea una marca heredable a través de la división celular. La metilación que no ocurre en un contexto CpG, observada principalmente en células madre y neuronales embrionarias humanas se conoce como metilación asimétrica, este tipo de metilación suele perderse a través de los procesos celulares (73).

2.10. Moléculas responsables de la metilación

Las enzimas catalizadoras de la metilación son las ADN metil transferasas (DNMTs), las cuales transfirieren los grupos metilo al carbono 5 de la citosina mediante un enlace covalente (59). Los grupos metilo son adquiridos de la dieta, siendo las principales fuentes de obtención el ácido fólico, la betaína y la vitamina B12. La disponibilidad del grupo metilo está influenciada por el ciclo del ácido fólico y el metabolismo de la metionina, que generan la S-adenosil-metionina (SAM), siendo la molécula SAM la principal donante de metilo para varias metiltransferasas (74,75).

Existen tres DNMTs activas en mamíferos encargadas de realizar la metilación del ADN: la DNMT1, la cual se encarga de mantener los patrones de metilación durante la división celular y las DNMT3a y DNMT3b, las cuales efectúan la metilación de novo, DNMT3L es una proteína regulatoria que no tiene actividad de metil transferasa, sin embargo, estabiliza a DNMT3a y DNMT3b para incrementar la metilación *de novo* (76,77).

Dicho mecanismo de tipo enzimático puede ser reversible y permanecer estable a través de la división celular (78–80). Se han identificado dos mecanismos por los cuales puede ocurrir la desmetilación del ADN; la desmetilación activa y la desmetilación pasiva. La desmetilación activa del ADN ocurre por la familia de proteínas *Ten Eleven Translocation* (TET), éstas tienen la capacidad de convertir 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5hmC). Las oxidaciones de 5hmC catalizadas por TET dan como resultado 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). La marca 5caC se extrae del ADN mediante la glicosilasa

de timina-ADN específica del mal apareamiento G/T (TDG), dando como resultado el residuo de citosina a su estado no modificado (81). Por su parte, la sobreexpresión de TET1 induce la desmetilación de sitios CpG tanto metilados como hemimetilados, TET1 tiene mayor capacidad para desmetilar sitios CpG hemimetilados que completamente metilados (82). Por otro lado, la desmetilación pasiva ocurre por la supresión de DNMT1 nuclear, que induce la desmetilación pasiva del ADN, al afectar la metilación de los sitios CpG en la cadena recién sintetizada, durante la fase S (83) (Figura 4).

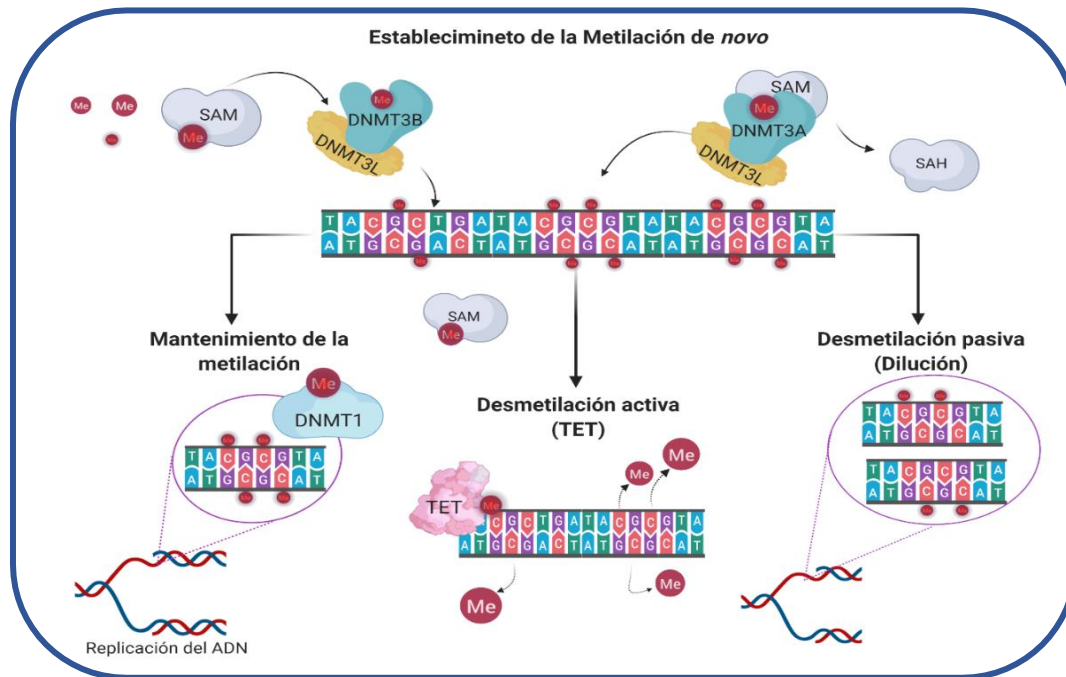


Figura 4. Moléculas implicadas en la metilación del ADN. La metilación en el ADN ocurre por actividad enzimática de tres tipos de DNMT, que obtienen el grupo metilo del cosustrato donante de metilo, SAM. Mientras que la desmetilación puede ocurrir de manera enzimática (TET) o por desmetilación pasiva. Elaboración propia creada con BioRender.com.

2.11. Metilación del ADN durante el desarrollo embrionario

En las primeras etapas del desarrollo ocurre una reprogramación epigenética, generando en primer lugar una desmetilación activa que conduce al borrado epigenético en las células progenitoras, seguido del restablecimiento de la metilación durante la fertilización por metilación de *novo* (84). Los cambios de metilación en embriones preimplantados se dividen en tres etapas. La primera ocurre durante la fertilización, en la cual hay una disminución drástica del nivel de metilación, se dice que es una desmetilación selectiva, ya que ocurre una desmetilación activa del genoma paterno y una desmetilación pasiva del genoma materno, durante esta etapa puede originarse un mosaicismo epigenético. La segunda etapa ocurre durante el proceso de mórula a blástula, en la cual se presenta un aumento

de la metilación rápidamente. En la última etapa se restablece la metilación de novo en el blastocisto, con ello se establece el compromiso del linaje (85,86). Estos eventos de reprogramación podrían ser la causa de las alteraciones epigenéticas presentes en la etapa adulta en síndromes epigenéticos.

2.12. Factores que alteran los niveles de metilación

Los factores genéticos, ambientales y metabólicos, pueden inducir paisajes epigenéticos excesivamente restrictivos o permisivos, que contribuyen a la patogénesis del cáncer y otras enfermedades (87). Los estados restrictivos pueden evitar la función apropiada de TSG o bloquear la diferenciación celular. Por el contrario, los estados permisivos o "plásticos" pueden permitir la activación de OG o las transiciones del destino celular no fisiológicas. Estos eventos estocásticos pueden ser "pasajeros", es decir, intrascendentes, sin embargo, algunos pueden conferir una ventaja de aptitud celular en genes conductores (*epi-driver gene*) (88).

Dentro de los factores genéticos que causan aberración epigenética, hay una extensa lista de genes cuya mutación modifica las marcas epigenéticas de la cromatina, y conduce a la aparición de enfermedades cancerosas o, al menos, coopera con su desarrollo. En esa lista se incluyen los que codifican a enzimas implicadas en la metilación del ADN, acetilación o desacetilación de histonas, metilación de histonas, remodelación de la cromatina y reconocimiento de marcas epigenéticas (89).

Los factores metabólicos están relacionados directamente con la dieta. Como se mencionó anteriormente la principal molécula donante de grupos metilo es la SAM, la cual es derivada del ciclo de la metionina. Los grupos metilos adquiridos de la dieta son obtenidos por el metabolismo de folatos. El impacto del folato en la dieta sobre los cambios de metilación del ADN se ha observado en varios tipos de cáncer, por otro lado, la ausencia de folatos ha conferido hipometilación en el ADN, lo que indica que la dieta restringida o en ausencia de vitamina B12, disminuye la metilación del ADN (90).

Adicionalmente, la metilación del ADN se ha relacionado con el envejecimiento, pues con la edad y ciertos estados de enfermedades, incluido el cáncer, el estado de metilación del ADN puede verse alterado (91). Por ejemplo, durante el envejecimiento, se facilita la hipermetilación del ADN de manera competitiva, debido a la desestabilización del complejo represivo polycomb (92).

Los factores ambientales que contribuyen con la alteración de los mecanismos epigenéticos, comprenden la exposición a agentes químicos, tales como: metales pesados,

aerosoles en el aire y humo de cigarro, sustancias disruptoras endocrinas, carcinógenos no genotóxicos y exposición de la línea germinal (vinclozolina, bisfenol A o 2-etilhexilo), pueden generar cambios en la expresión génica, activación de vías de señalización, cambios en el epigenoma y transcriptoma, por mencionar algunas (93).

2.13. Enfermedades involucradas con alteraciones epigenéticas

Alteraciones conocidas como epimutaciones pueden mimetizar el efecto de las mutaciones germinales. Desde este punto, una epimutación describe una aberración epigenética que resulta en silenciamiento transcripcional de un gen que normalmente está activo, o la expresión de un gen que normalmente está inactivo (94,95).

Las primeras evidencias de enfermedades relacionadas con base molecular epigenética, fueron los síndromes de impronta genómica, en los cuales uno o varios genes se expresan a partir de un solo alelo dependiendo de su progenitor (materno o paterno). La impresión de genes se encuentra regulada generalmente por metilación, aunque no siempre el alelo metilado es el silenciado (96), como en el Síndrome de Prader-Willi (PWS), el Síndrome de Angelman (AS) y el Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS), entre otros. El PWS, es un trastorno neuroconductual complejo y multisistémico, causado por una deficiencia en genes del cromosoma 15, expresados por el alelo paterno y silenciados por metilación en el alelo materno. El AS es un trastorno durante el neurodesarrollo, en el cual, el alelo paterno presenta impresión por metilación y el alelo materno es suprimido (97). Por su parte, el BWS, se caracteriza por un crecimiento somático excesivo y una predisposición a tumores pediátricos, asociado con la pérdida de impresión en genes del cromosoma 11 del alelo paterno (96).

Sin embargo, recientemente se han relacionado otras enfermedades con epimutaciones, tales como: el síndrome del X frágil causado por la inactivación de *FMR1* (98), glioma cerebral, asociado a la hipermetilación del promotor de *MGMT* (99), leucemia linfocítica crónica causada por silenciamiento de *DAPK1* (100), problemas cardiovasculares (101,102), y salud mental (70).

Por otro lado, el síndrome colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC), también llamado síndrome de Lynch, se ha relacionado con alteraciones en el gen *MLH1*, los estudios reportan que una alteración específica en *Cis* de la región 5'UTR es la causa de la hipermetilación de su promotor, y por lo tanto, de la pérdida funcional de *MLH1* (105,106). Una alteración similar se ha evidenciado en *MSH2* causante del cáncer colorrectal

(107,108). Por consiguiente, el rol que desempeña la metilación del ADN en el organismo es de suma importancia, evidenciándose en la regulación de la expresión génica desde el desarrollo temprano hasta el envejecimiento (109,110).

2.14. Eventos tempranos que ocurren en la carcinogénesis

En la actualidad se reconoce que la susceptibilidad al cáncer está determinada no solo por las variaciones de la secuencia de ADN, sino también por los cambios en la actividad de los genes o las regiones cromosómicas (111). Se han propuesto tres modelos que explican los eventos tempranos que ocurren durante la carcinogénesis de mama (112) (Figura 5). Los primeros dos modelos se refieren a las mutaciones somáticas y germinales que ocurren en genes de regulación y control celular, las cuales son las causas mayormente estudiadas como eventos iniciales de la transformación maligna de células en cáncer (113). El tercer modelo propuesto indica que además de las mutaciones, las alteraciones epigenéticas somáticas, pueden afectar los niveles de expresión génica, desempeñando así un papel fundamental en los eventos de iniciación del cáncer, surgiendo de una minoría de células normales con un supresor tumoral clave metilado, desde la vida embrionaria temprana, dicha alteración actúa como el evento inicial junto con posteriores alteraciones que conducen a la transformación maligna celular (52,56,54) (Figura 5).

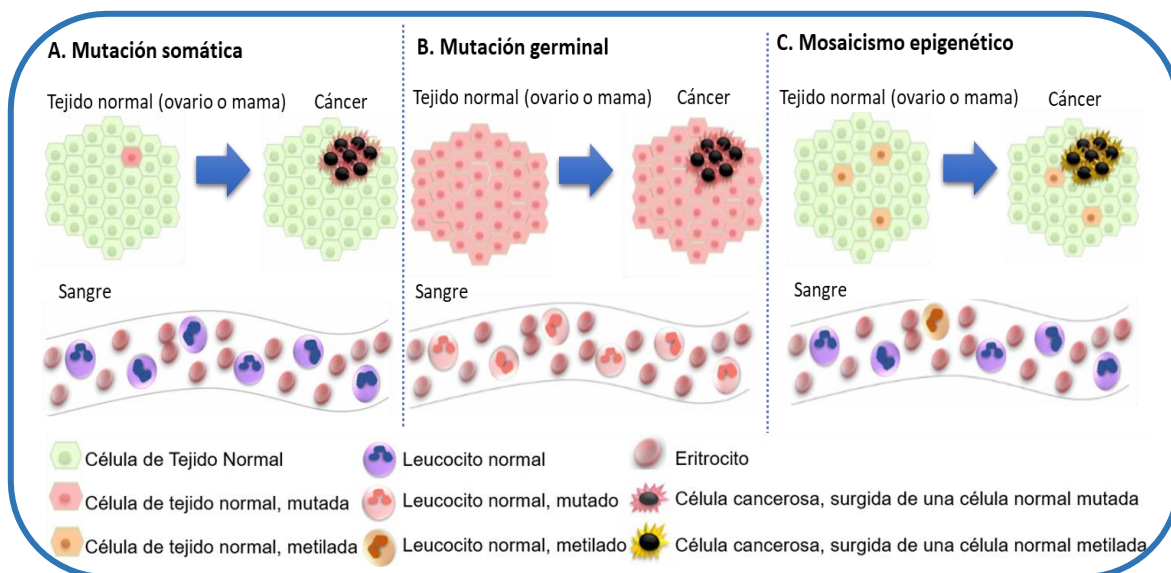


Figura 5. Eventos subyacentes que ocurren en la carcinogénesis. A. Mutación somática. Modelo que indica que el cáncer tiene como evento inicial una mutación conductora somática, la cual no es detectable en sangre. **B. Mutación germinal.** Plantea que el cáncer tiene su evento inicial en células normales que albergan una mutación conductora en línea germinal, por lo que es detectable en sangre. **C. Mosaicismo epigenético.** Modelo que plantea que el cáncer surge de una minoría de células normales con un supresor tumoral clave metilado desde la vida embrionaria temprana y es detectado como mosaicismo en sangre (Modificado de Lonig *et al.*, 2019 (112)).

Se ha propuesto que este tipo de modificación epigenética aumenta la mutagénesis espontánea y puede influir en la forma en que el ADN interactúa con los carcinógenos (115,116), lo cual indica que un evento epigenético, y no genético, puede ser el paso inicial en el proceso de carcinogénesis. Las epimutaciones ampliamente distribuidas en los tejidos normales que predisponen al cáncer, se definen como epimutaciones constitucionales (117), dichas epimutaciones involucran tejido derivado de las tres capas germinales (mesodermo, ectodermo y endodermo) (118), lo cual aumenta la “predisposición epigenética”, definida como una herencia propensa a un estado epigenético alterado en los tejidos normales que confiere predisposición a la enfermedad (47).

2.15. Metilación del ADN en cáncer de mama

La metilación del ADN se ha evidenciado en procesos oncogénicos a través de la metilación aberrante de promotores, presente como hipermetilación en TSG e hipometilación en OG, conduciendo hacia un silenciamiento o activación génica, respectivamente (119,120). De esta forma, la hipermetilación del ADN en islas CpG del promotor podría generar el desarrollo, la progresión y la metástasis de los tumores (121–123), lo cual se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (124,125) (Figura 6).

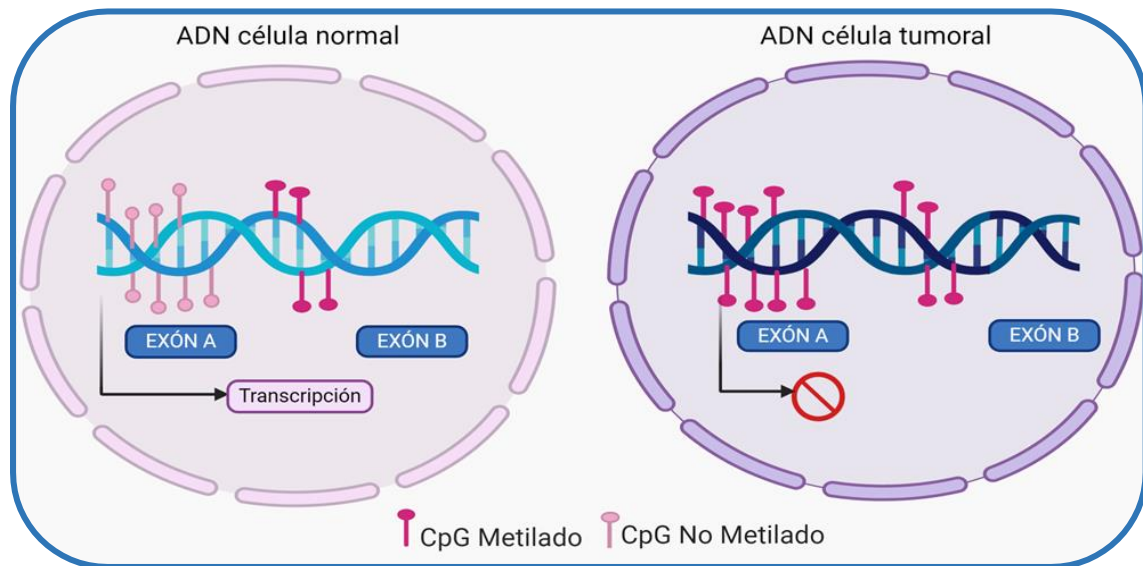


Figura 6. Represión transcripcional típica de un gen supresor tumoral por metilación aberrante. Del lado izquierdo de la imagen se muestra el ADN de una célula en estado normal, del lado derecho el ADN en una célula con aberración epigenética y represión transcripcional. Creada para este trabajo en Biorender.com

Por tanto, la metilación aberrante juega un papel muy importante en el desarrollo del cáncer de mama. En investigaciones sobre esta neoplasia, frecuentemente se han reportado alteraciones en OG, como hipometilación del ADN a nivel genómico, e hipermetilación en islas CpG de TSG que normalmente no están metiladas. Los estudios sobre este mecanismo epigenético han aumentado el enfoque sobre genes hipermetilados en cáncer de mama, debido al papel crucial que tienen a nivel biológico, como en la regulación del ciclo celular, apoptosis y señalización proliferativas, entre otras. Adicionalmente del mecanismo de metilación, hay otras alteraciones epigenéticas que se han evidenciado en cáncer de mama, como la localización diferencial nuclear de genes involucrados en la carcinogénesis de mama, modificaciones de la cromatina y regulación por miARN (52)(Figura 7).

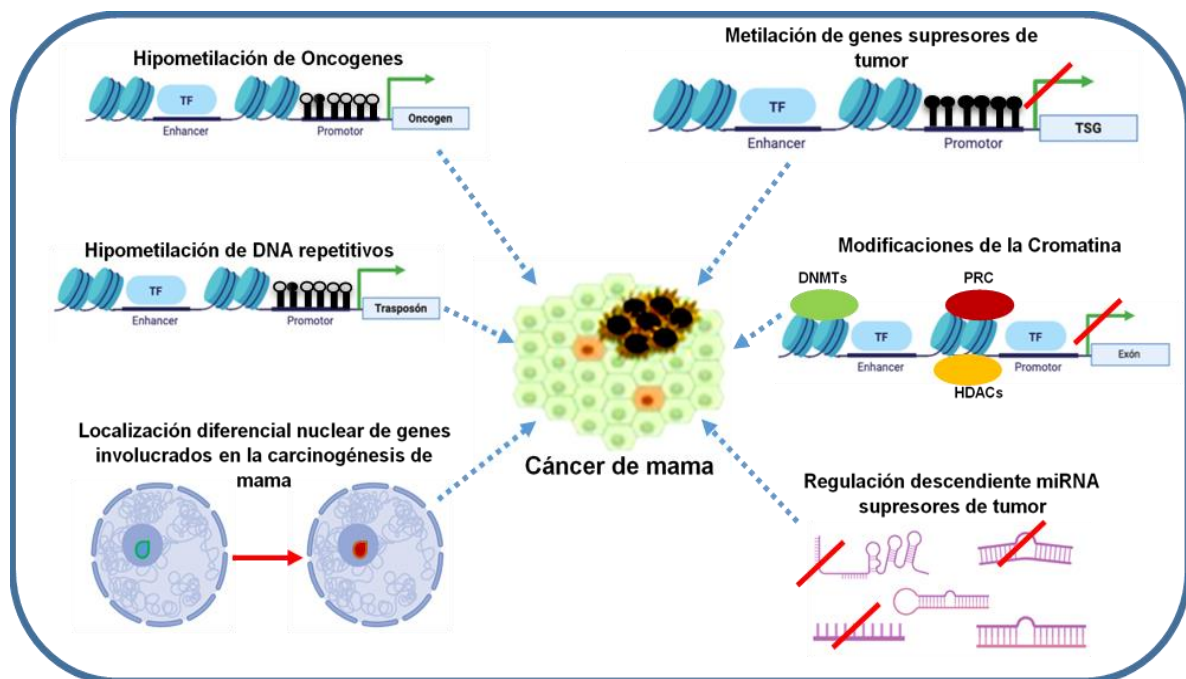


Figura 7. Alteraciones epigenéticas involucrados en el cáncer de mama. DNMT: DNA Metiltransferasa; HDAC: Desacetilasas de histona; miRNA: MicroRNA; PRC: Complejo Polycomb Represor; TSG: Gen supresor de tumor (Modificado de Karsli-Ceppioglu *et al.* 2014 (52)).

La metilación del ADN ha sido el mecanismo epigenético más ampliamente estudiado en el cáncer de mama, se ha reportado tanto en estadios tempranos como en metástasis, indicando que las alteraciones en el proceso de metilación del ADN juegan un papel importante en la iniciación y progresión de la enfermedad (58). Recientes estudios sobre CM han reportado que una variante patogénica en *Cis* genera la hipermetilación del promotor de *BRCA1*, fungiendo como el iniciador del desarrollo de la enfermedad (126).

Por otra parte, estudios realizados en leucocitos de pacientes con cáncer de mama, se han identificado alteraciones en los patrones de metilación en el gen *BRCA1*, indicando que la presencia de metilación en dicho gen, aumenta un 30% el riesgo de desarrollar la enfermedad a edades tempranas (124). Adicionalmente, en otras investigaciones se han identificado niveles de metilación mayor dentro de la región promotora del gen *BRCA1*, exhibiendo frecuencias con diferencias estadísticamente significativas, en muestras de sangre periférica total de pacientes con cáncer de mama, en comparación con controles sanos (125,127,128).

2.16. Técnicas para el estudio de la metilación

Las técnicas para estudios del epigenoma se han empleado desde 1973, con la descripción de la técnica de conversión de ADN genómico mediante bisulfito de sodio (129). La cronología del análisis de metilación del ADN se ha desarrollado, a partir de la capacidad de medir la cantidad de 5mC dentro de un genoma particular. En 1980, la variedad de métodos básicos comparativos se incorporó, mediante el uso de enzimas de restricción sensibles a metilación e inmunoprecipitación. Para 1990, la secuenciación de bisulfito en combinación con PCR se empezó a utilizar como técnicas para este tipo de análisis. En los años 2000, surgió la introducción de las tecnologías basadas en microarreglos, cromatografía de alto rendimiento con líquido de fase inversa, primera extensión de nucleótido simple sensible a la metilación (MS-SnuPe), combinación de análisis de restricción de bisulfito (COBRA) e impresión arbitraria por AP-PCR (PCR con oligonucleótidos arbitrarios). La más reciente tecnología incorporada en los análisis de metilación, fue la secuenciación de próxima generación en la amplificación de sitios intermetilados (AIMS) y la representación reducida de secuenciación de bisulfito (RRBS) (130) (ANEXO 1).

Las técnicas para perfilar la metilación del ADN en todo el genoma se dividen en cuatro categorías (131): métodos basados en enzimas de restricción sensibles a la metilación del ADN, inmunoprecipitación de ADN metilado mediante el uso de anticuerpos (MeDIP-seq), específicos de metil citosina (132), dominios de unión de metil-CpG para enriquecer el ADN metilado en sitios de interés (133) y las técnicas basadas en el tratamiento con bisulfito de sodio (131)(Tabla 4). Esta última técnica es una de las formas más confiables para medir la metilación del ADN, dicho método permite la cuantificación de la metilación del ADN en la resolución de un solo nucleótido (134).

Tabla 4. Enfoques de análisis de metilación del ADN por secuenciación de próxima generación.

Método	Cobertura genómica	Referencia
MBDiGS	ADN metilado enriquecido	Serre et al., 2009 (135)
MMSDK	Etiquetas representativas del genoma	Li et al., 2009 (136)
MeDIP-seq anti-5mC	ADN metilado enriquecido	Maunakea et al., 2010 (137)
MRE-seq	Selección de fracción por tamaño	Maunakea et al., 2010 (137)
Secuenciación de Bisulfito	Todo el genoma	Cokus et al., 2018 (138)

Con las recientes técnicas de secuenciación masiva se han implementado estudios del epigenoma completo, siendo la secuenciación de bisulfito el estándar de oro para medir la metilación sobre los genomas de interés. La conversión de ADN genómico con bisulfito de sodio, combinado con la secuenciación de próxima generación (BS-seq), es ampliamente usado para medir el estado de metilación del metiloma (genoma completo), a una resolución de base única. Sin embargo, el análisis de los datos BS-seq todavía plantea un desafío considerable, por lo que se siguen perfilando los protocolos de análisis (139).

Para este trabajo, la técnica que se implementó fue la conversión con bisulfito de sodio y secuenciación de próxima generación (ensayo BSP), la cual presenta la mayor cobertura en comparación con otras técnicas utilizadas (115). Con los ensayos por la técnica MS-HRM se evalúan todos los sitios CpG flanqueados por los *primers* (generalmente >80 pb), sin evaluar la región de unión del *primer*; con los ensayos de MethyLight se evalúan los sitios CpG mediante sondas dirigidas, por lo que sólo las regiones de unión son evaluadas; en los ensayos MSP los *primers* van dirigidos a regiones metiladas, siendo evaluados sólo los CpG que se abarcan en las regiones del *primer*. A diferencia de estas técnicas, con ensayos de BSP es posible evaluar el estado de CpG en todo el producto de PCR (Figura 8).

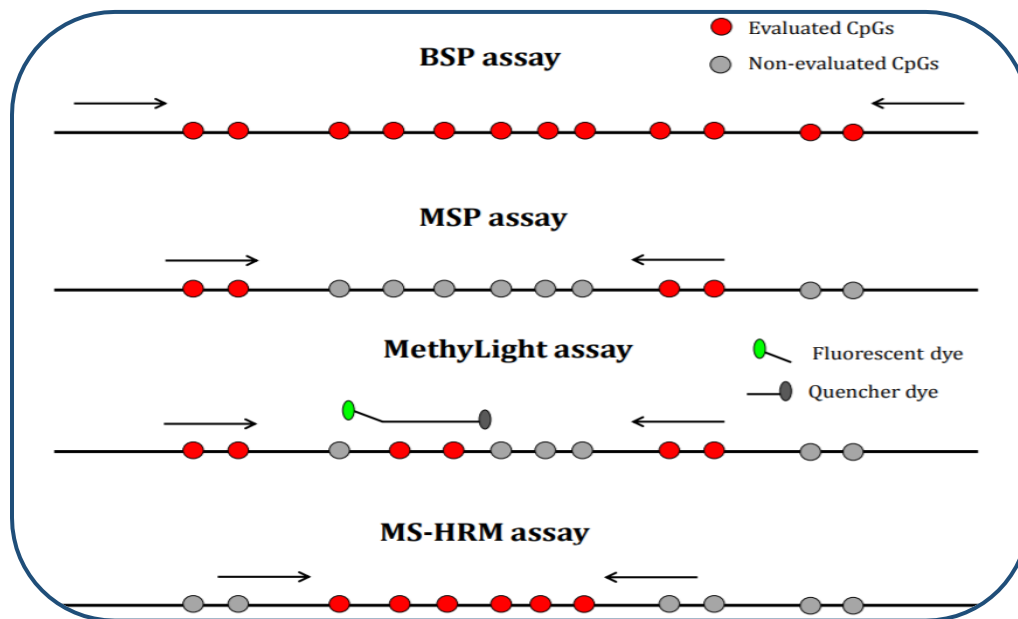


Figura 8. Cobertura de CpG de técnicas de metilación en ADN de PCR convertido con bisulfito de sodio (Tomado de Hernández et al., 2013)(115). Los círculos grises representan las CpG no evaluadas en cada técnica, los círculos rojos representan las CpG evaluadas. En el ensayo MethyLight los círculos verdes representan la molécula fluorescente.

3. ANTECEDENTES

Scott y colaboradores (140) realizaron un estudio para evaluar el papel de la metilación, en el contexto de otros genes adicionales a *BRCA1* de predisposición al CM. Examinaron muestras de sangre y tumor de 43 pacientes no portadoras de mutaciones germinales, diagnosticadas antes de los 40 años. Ellos identificaron niveles variables de metilación en la región promotora de los genes *BRCA1*, *PALB2* y *MLH1* en ambos tipos de muestras, con ello brindan una descripción más precisa de la metilación del ADN, en regiones genómicas de interés para la susceptibilidad del CM. Lo anterior abre la perspectiva de que los cambios en los patrones de metilación están fuertemente influenciados en la iniciación del CM (141).

Adicionalmente a los estudios descritos, Evans y colaboradores en 2018 realizaron un estudio donde informaron que la metilación en *BRCA1*, está fuertemente relacionada con variantes genéticas que actúan en *cis*. Ellos identificaron metilación constitucional en *BRCA1*, en sangre periférica de dos miembros de familias caracterizadas por una alta incidencia de cáncer de mama y ovario, negativas para mutaciones germinales *BRCA1/2*. Encontraron aproximadamente 50% de los alelos metilados, lo cual indica metilación completa de los alelos afectados y asociaron la metilación con una variante del promotor en la región 5'UTR (126).

Por otro lado, como antecedente directo se tiene el trabajo realizado por Quezada-Urban y colaboradores (21), quienes identificaron nuevos alelos patogénicos en un panel de 143 genes de predisposición al cáncer, en 327 pacientes mexicanas con síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (SHCMO), mediante secuenciación masiva en paralelo. Entre los hallazgos de la investigación, encontraron variantes patogénicas en 23 genes, incluidos *BRCA1/2*. De manera importante, el 15% presentó una variante patógena, el 11% presentaron variantes con significado clínico desconocido (VUS) y el 74% fueron negativas. Si bien, estos resultados muestran por primera vez en la población mexicana, mayor contribución de alelos patogénicos de genes de susceptibilidad al CM diferentes a *BRCA1/2* (54%), que los mismos *BRCA1/2* (46%), surge la interrogante: ¿Qué mecanismos moleculares están implicados en el desarrollo carcinogénico de mama en pacientes negativas para variantes patogénicas con SHCMO?

De manera inicial para este trabajo se seleccionaron 5 genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* y *PTEN*) de los 23 que se identificaron con variantes patogénicas, por ser genes de susceptibilidad cuyas variantes de la línea germinal son un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama, además, las variantes de alta penetrancia en genes como *BRCA1*, *BRCA2* y *PTEN*, así como variantes de riesgo moderado como el conferido por *CHEK2* y *PALB2* pueden ser causales de los casos de cáncer de mama hereditario. Es importante mencionar que en los próximos análisis se evaluarán los 23 genes con variantes patogénicas identificados por nuestro grupo, en pacientes mexicanas con SHCMO.

4. JUSTIFICACIÓN

Las anomalías epigenéticas junto con las alteraciones genéticas son las responsables de patologías como el CM. Se ha propuesto que la metilación del ADN puede imitar los efectos de mutaciones, tanto germinales como somáticas, en genes de predisposición al cáncer. Dichas alteraciones en los patrones de metilación se pueden distinguir de células cancerosas y células normales, lo cual es de gran importancia, ya que se ha evidenciado que la metilación aberrante puede dar origen a los eventos tempranos en la carcinogénesis, principalmente por la hipermetilación en regiones promotoras de TSG, generando la inactivación de estos y aumentando el riesgo de desarrollar CM.

Adicionalmente, se sabe que las anomalías en los patrones de metilación pueden ser heredables, por lo que un mayor enfoque sobre estos procesos contribuirá a entender los mecanismos de desarrollo del cáncer. Un aspecto destacable de la metilación es su

reversibilidad, por lo cual, la determinación de las alteraciones epigenéticas hará posible identificar biomarcadores epigenéticos para proponer un diagnóstico molecular y una terapia adecuada en pacientes con cáncer de mama y otras enfermedades.

Por lo anterior, una combinación de tratamiento con bisulfito de sodio y secuenciación de alto rendimiento (BS-Seq) en ADN, puede ser clave en la captura correcta del estado de metilación de un gen, al revelar su metilación a una resolución de base única.

5. HIPÓTEISIS

Esta tesis no cuenta con una hipótesis experimental a probar, ya que el objetivo es estandarizar la técnica de conversión de ADN genómico por bisulfito de sodio y secuenciación masiva en paralelo, para el análisis de metilación en regiones promotoras de genes conductores del cáncer de mama.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Implementar el método de conversión por bisulfito de sodio y secuenciación masiva en el análisis de metilación del ADN en islas CpG, dentro de la región promotora de genes conductores del cáncer de mama (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* y *PTEN*), en la línea celular MCF-7 y en una persona saludable (C1).

6.2. Objetivos particulares

1. Identificar sitios probables de metilación dentro de regiones promotoras de genes conductores del cáncer de mama, mediante *primers* específicos de metilación.
2. Establecer las condiciones de conversión y amplificación de ADN genómico con bisulfito de sodio.
3. Determinar el perfil de metilación de la línea celular MCF-7 y de una persona saludable, en regiones promotoras de cinco genes conductores del cáncer de mama.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Diseño de investigación y estrategia experimental

El diseño de la investigación es de tipo experimental, descriptivo-piloto, cuya estrategia experimental se basa en la estandarización de la conversión de ADN genómico con bisulfito

de sodio, mediante el modelo de línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama, a la par fue implementado en una muestra de tejido sanguíneo de una persona saludable.

La selección de la persona saludable fue de forma aleatoria. El tejido sanguíneo, así como el ADN genómico de la línea celular MCF-7, fueron obtenidos del banco del laboratorio 13 de la Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; constituido bajo el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, aprobado por el Comité de Ética de la Secretaría de Salud.

7.2. Línea celular MCF-7

La línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama fue obtenida del *American Type Culture Collection (ATCC)*. Las células provienen de un tumor primario (carcinoma ductal invasivo), con expresión de receptores de estrógeno y progesterona, lo que le confiere una respuesta proliferativa en presencia de estrógenos, presenta el fenotipo basal luminal A.

Las células fueron cultivadas en medio *Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM, Gibco)* modificado por Dulbecco, este medio es rico en aminoácidos y vitaminas, así como nitrato férrico, piruvato de sodio y algunos aminoácidos suplementarios, adicionalmente, se suplementó con suero fetal bovino a una concentración del 10% (Corning), a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y adicionado con 0.01 mg/mL de insulina humana recombinante.

7.3. Extracción de ADN genómico de sangre periférica total

El ADN genómico de pacientes sanos se aisló a partir de 100 µL de sangre total periférica. Las extracciones se realizaron utilizando el kit *DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)*, cuyo método se basa en el principio de columna por afinidad a membrana de sílica y la utilización de sales caotrópicas. La función de los agentes caotrópicos es la de desorganizar la red tridimensional del agua, influyendo en la organización de las moléculas a través de enlaces de hidrogeno, lo que genera su desnaturalización.

El procedimiento inicia con la lisis celular con proteinasa K en presencia de un buffer con sales caotrópicas, estos actúan durante una hora a 56 °C (temperatura requerida por la proteinasa K). Dicha proteasa pertenece al grupo de serinas, posee en su centro catalítico un aminoácido de serina, cuya función es romper los enlaces peptídicos, de esta forma actúa liberando el ADN nuclear, mientras destruye a las proteínas nativas e inactiva a las nucleasas (RNasas y DNasas) (142).

Una vez obtenidas las muestras lisadas, se agregó etanol al 96% y se colocaron en la columna. En esta fase se aprovechan las propiedades del ADN, quien por su carga negativa y $\text{pH} > 2$, le permiten unirse a un adsorbente (material cromatográfico) a través de puentes salinos y de hidrógeno, con ligandos negativos (membrana de sílica). Por consiguiente, con el etanol se precipita el ADN facilitando su adsorción a la membrana de sílica. Por último, los restos de sales, contaminantes y enzimas son removidos de la muestra mediante un par de lavados. Una vez eliminados los contaminantes, la molécula de ADN es hidratada mediante una elución con 100 μL de agua inyectable.

7.4. Cuantificación de ADN y calidad del ADN

El ADN se cuantificó obteniendo su densidad óptica (OD, equivalente al logaritmo de base 10 de reciprocidad por la transmitancia) a través de espectrofotometría por absorbancia. Se midió en el Nanofotómetro NP80 (Implen) la absorbancia a 260 nm, que es la longitud de onda que absorben los ácidos nucleicos, con ello se obtiene la cantidad de ADN que se tiene en un microlitro de muestra. Este método de espectrofotometría se basa en la absorción de luz, conociendo que la máxima absorción de los ácidos nucleicos es a 260 nm, correspondiente a la luz UV, mientras que las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm (principalmente por residuos de triptófano). Para determinar la pureza se midió la OD del ADN a 280 nm con ello se obtuvo la razón 260/280, conociendo que el valor de pureza del ADN es de 1.8 a 2 después del proceso de extracción y purificación.

Para evaluar la integridad del ADN genómico de MCF-7 y de C1, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en TAE 1X con un voltaje de 80 V por 60 minutos. Para la visualización del ADN se utilizó bromuro de etidio como colorante, cuya función es la de intercalarse entre las bases del ADN cuya fluorescencia naranja se visualiza bajo luz ultravioleta.

7.5. Diseño de *primers* específicos de metilación

El diseño de *primers* se realizó en el software *Methprimer 2.0* bajo las características específicas para “Secuenciación de PCR de Bisulfito” (BSP por sus siglas en inglés)(143), dentro de las regiones promotoras de los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* y *PTEN*, adicionalmente, se usaron *primers* de *MLH1* sugeridos por *Zymo Research* en el protocolo de conversión *EZ DNA Methylation-Gold kit*[®], estos como control positivo de que la conversión con bisulfito de sodio se realizó correctamente (ANEXO 2).

7.5.1. Reglas de diseño para *primers* de mapeo de metilación usando la predicción de islas CpG (*MethPrimer 2.0*[®]):

- I. Los *primers* no deben tener sitios CpG dentro de su secuencia, para garantizar la amplificación únicamente en ADN convertido.
- II. El tamaño de producto de PCR debe ser entre 100 y 400 pb, no se sugiere sobrepasar el tamaño, pues el ADN tiende a estar fragmentado después de la conversión.
- III. El producto debe abarcar el mayor número de CpG posible dentro la isla seleccionada. Si la isla tiene un tamaño menor que el tamaño del producto, el par de *primers* debe abarcar toda la isla.
- IV. Únicamente si el tamaño de la isla es mayor que el tamaño máximo del producto, el par de *primers* puede estar dentro de la isla.
- V. Cualquier isla predicha puede ser la región objetivo para PCR. La isla seleccionada será de acuerdo con la proximidad al sitio de inicio de la transcripción.
- VI. Los productos de PCR deben abarcar un número mínimo de sitios CpG especificados (valor predeterminado: 5-10 sitios CpG).

Los parámetros específicos utilizados para el diseño de los *primers* siguiendo las referencia de Patterson (144) y Long y Rajvir (145) fueron las siguientes: el rango de tamaño de *primer* fue de 20 a 32 nucleótidos; la temperatura de fusión (T_m) mínima de 50 °C, óptima de 55 °C y máxima de 60 °C; ADN templado con más del 80% de GC (sobre islas CpG's) y los dinucleótidos CpG fueron evitados en los *primers* para prevenir sesgos hacia templados metilados, no metilados o no convertidos; contenido de GC en *primers* de 40-60%; tamaño del producto de 100 pb como mínimo, 150 pb óptimo y 400 pb máximo, y mapeo mínimo de 5 CpG.

7.5.2. Preparación de los *primers*

Los *primers* se compraron liofilizados y se resuspendieron en Tris 10 mM a una concentración de 100 μ M. Para las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), los *stocks* se diluyeron a 10 μ M y se usó una concentración final para cada reacción de PCR de 500 nM.

7.6. Conversión de ADN por bisulfito de sodio

7.6.1. Fundamento

Esta técnica es el principal método empleado en estudios de metilación del ADN desde 1973, año en que fue descrita (129). Su fundamento se basa en la capacidad del bisulfito de sodio por convertir a las citosinas no metiladas en uracilos, en ADN de cadena sencilla, por medio de una serie de reacciones químicas. Este cambio de citosinas a uracilos ocurre de manera muy lenta en 5mC, además, la conversión sólo se completa en condiciones alcalinas, propiedad que permite que el tratamiento con bisulfito de sodio produzca únicamente la conversión de citosinas no metiladas, ya que en 5mC se generan productos resistentes a la alcalinidad (146). De esta forma, después de dicho tratamiento es posible distinguir el ADN metilado del no metilado mediante una amplificación por PCR (115,144).

7.6.2. Principio de conversión de ADN

La química de la conversión de citosinas no metiladas en uracilos por el bisulfito de sodio ocurre en tres pasos (Figura 9):

- I. Sulfonación: referente a la adición reversible del grupo sulfito al doble enlace en el carbono 5 de la citosina, la clave del sitio de ataque está en un par de electrones que no participan en un enlace de hidrógeno, lo que le permite acceder al anillo del nucleótido.
- II. Desaminación hidrolítica: ocurre la liberación del grupo amino por hidrólisis del derivado de citosina-bisulfito resultante, generando un sulfonato de uracilo.
- III. Desulfonación de álcali: ocurre la eliminación del grupo sulfito por un tratamiento alcalino, lo cual regenera el doble enlace entre C5 y C6, dando lugar al uracilo.

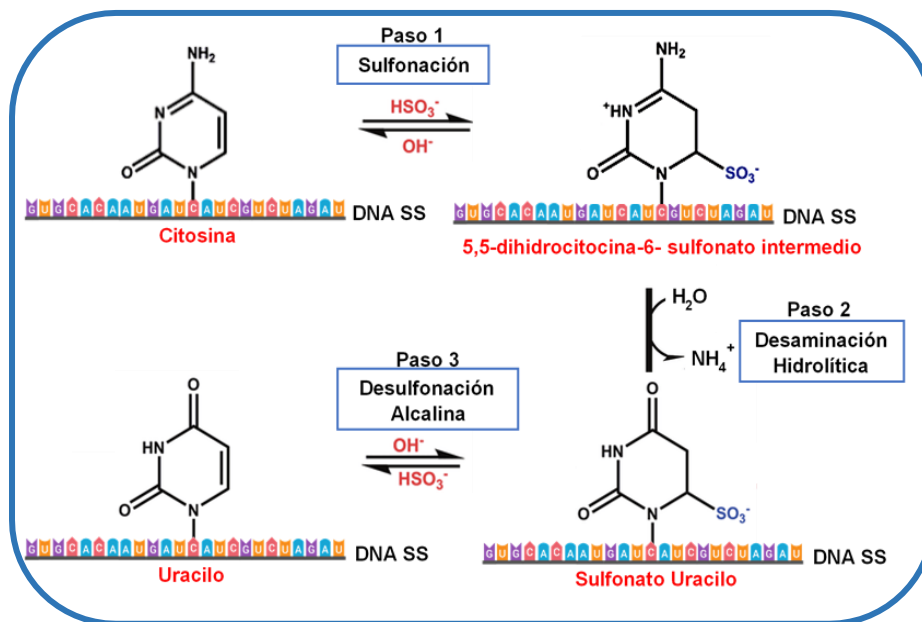


Figura 9. Cascada de reacciones químicas que ocurren durante la conversión de citosinas no metiladas a uracilos.

7.6.3. Proceso experimental

El ADN genómico de la línea celular MCF-7 y de C1 se procesaron mediante la técnica de conversión por bisulfito de sodio, utilizando el *kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research)*. Para ello se agregaron 130 μL de reactivo de conversión CT a 500 ng de ADN genómico de MCF-7 y C1 (volumen final 150 μL), se desnaturalizó la cadena doble de ADN a 98 $^\circ\text{C}$ por 10 minutos, esto es necesario porque la conversión solo puede realizarse en ADN de cadena simple; posteriormente se incubó a 64 $^\circ\text{C}$ por 2.5 horas, tiempo necesario para que se lleven a cabo las reacciones de conversión.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 600 μL de *Buffer M-Binding*, las columnas se centrifugaron a 10,000 g por 30 segundos, posteriormente se adicionaron 100 μL de *Buffer M-Wash* y se centrifugaron a 10,000 g nuevamente. Para la desulfonación, se agregaron 200 μL de *Buffer M-Desulphonation* y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos, luego se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos. Se lavó una vez más la columna con 200 μL de *Buffer M-Wash* seguido de una centrifugación a 10,000 g por 30 segundos. Por último, el ADN se extrajo de la columna agregando 20 μL de H_2O inyectable y centrifugando a 10,000 g por 30 segundos, paso que se repite para realizar dos lavados. El ADN convertido se guardó a -80 $^\circ\text{C}$.

7.7. Cuantificación de ADN convertido por bisulfito de sodio

Se cuantificó el ADN mediante el método fluorométrico con *kit ssDNA Quantifluor* (Promega), bajo el protocolo “*Low Estandar Calibration*” en fluorómetro *Quantus* (Promega), así como por espectrofotometría en el Nanofotómetro NP80 (Implen).

El fundamento del sistema *Quantifluor* se basa en el uso de colorantes fluorescentes para determinar la cantidad de ácidos nucleicos o proteínas en una muestra. Dichos tintes específicos para un tipo de molécula (ADN, ARN, proteína), presentan fluorescencia extremadamente baja hasta que se unen específicamente a sus analitos de interés, por intercalación entre las bases, adquiriendo una forma más rígida y volviéndose intensamente fluorescentes, una vez agregados los tintes a las muestras a cuantificar, se alcanza el equilibrio de fluorescencia en menos de dos minutos (147,148), lo cual permite una cuantificación con alta precisión. Al ser un método sensible, es posible cuantificar pequeñas cantidades de ADN, por ello se recomienda en estudios de metilación, donde las cantidades de ADN tratado con bisulfito de sodio suele ser bajas.

7.8. Amplificación por PCR

Para la amplificación de las regiones de interés del ADN convertido por bisulfito de sodio, se utilizó la *GoTaq Polimerasa Máster Mix* (Promega) a 1X. Cada reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L. Para cada gen se empleó un control negativo sin ADN molde (NT). También se usó un control positivo de conversión incluido en el kit de conversión (*MLH1*), este par de *primers* indican la correcta conversión al generar productos de PCR, debido a que están compuestos de citosinas metiladas y no metiladas, por lo que, de no haber una conversión completa, no habría amplificación. Las temperaturas de hibridación para cada par de *primers* se estandarizaron, hasta generar amplificaciones óptimas de las regiones de interés (Figura 10).

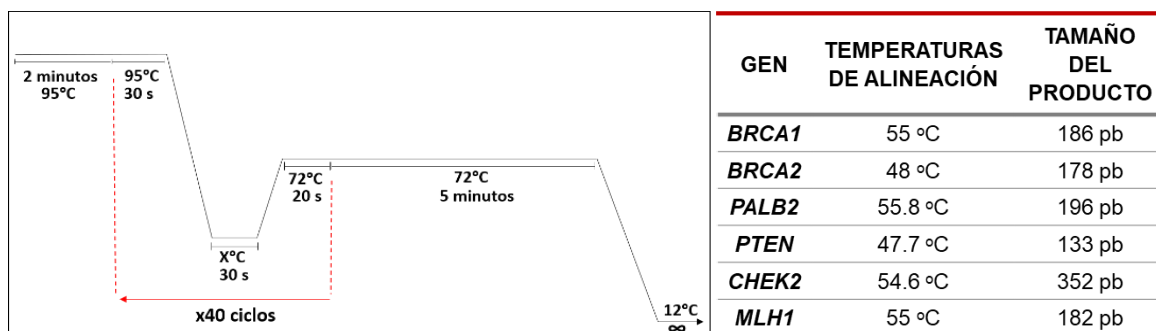


Figura 10. Programas de PCR utilizados. Del lado izquierdo se muestra el protocolo para la amplificación por PCR de los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *PTEN*, *CHEK2* y *MLH1*, se usaron 40 ciclos, con temperaturas de hibridación específicas para cada región, con una temperatura de desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Del lado derecho se indican las temperaturas óptimas para cada región.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE 1X y tinción con bromuro de etidio, esto para corroborar que los tamaños obtenidos correspondieran a los productos esperados. Para la electroforesis se usó un voltaje de 80 V por un tiempo de 60 minutos.

7.9. Purificación de productos de PCR

La limpieza de productos de PCR se realizó mediante perlas magnéticas de fase sólida *Ampure XP Beads*, (Beckman Coulter), usando una proporción de 1.8X de perlas *Ampure* por microlitro de reacción de PCR, de tal forma que los productos seleccionados fueran >100 pb. Esta purificación permite remover los fragmentos no amplificados, enzimas de amplificación, sales, *buffer*, y oligonucleótidos no usados.

Este método se basa en el uso de materiales cromatográficos (perlas magnéticas) que presentan dos propiedades: una es la de los ligandos de unión y la otra es el poder ser manipuladas por magnetismo, lo cual permite ajustar la cantidad de perlas a las muestras a purificar, así como la automatización. Otra de las particularidades que tiene esta técnica es que las perlas sólidas se encuentran en suspensión en polietilenglicol (PEG), lo cual permite la precipitación selectiva del ADN en función de la proporción añadida.

El procedimiento inicia con la adición de las perlas magnéticas a las muestras, con ello ocurre la precipitación y unión del ADN a las perlas, al colocarse en el magneto las perlas junto con el ADN se compactan, de esta forma se remueven los contaminantes a través de un par de lavados con etanol al 80%. Por último, el ADN se separa de las perlas mediante una elución en agua. Una vez purificados los productos de PCR, se cuantificaron mediante fluorometría con el *kit dsDNA Quantifluor* (Promega), en el equipo *Quantus* (Promega) (ANEXO 4).

7.10. Preparación de Bibliotecas

La preparación de bibliotecas es un proceso en el que se agregan en los extremos de los amplicones obtenidos por PCR, secuencias conocidas como adaptadores universales y etiquetas moleculares, esto con la finalidad de amplificar, identificar y secuenciar simultáneamente varias moléculas de interés. La preparación de bibliotecas para secuenciación masiva por síntesis consta de tres pasos (Figuras 11 y 12):

I. Reparación y adenilación de productos de PCR.

Se realizó mediante el kit *NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module* (New England BioLabs) y consta de dos pasos, el primero es la “reparación de los extremos”, en donde se eliminan los extremos salientes de las regiones 5´ y 3´ para generar extremos romos. Posteriormente se les agrega una adenina en los extremos 3´ usando una Taq polimerasa, con actividad de adenina transferasa terminal. Esto es importante ya que tiene la finalidad de prevenir que los fragmentos se ligan unos con otros durante el proceso de ligación de adaptadores.

II. Adición de adaptadores universales.

El proceso de ligación consiste en la adición de secuencias de 24 pb en cada extremo, estos adaptadores contienen las secuencias complementarias de los *primers* de secuenciación en la celda de flujo de Illumina. Dicho proceso se realizó mediante el kit *NEBNext® Ultra™ II Ligation Module* (New England BioLabs). Los adaptadores no ligados fueron removidos de las bibliotecas obtenidas de ADN, mediante una purificación por tecnología de perlas magnéticas (Beckman Coulter) a una relación de 1.6X.

III. Adición de etiquetas moleculares.

Las etiquetas moleculares fueron agregadas por PCR, dichas etiquetas tienen 8 nucleótidos únicos (*barcodes* o índices) que se agregan en cada extremo de las bibliotecas, esto permite diferenciar una muestra de otra durante la secuenciación. Además, se adicionaron unas secuencias en el extremo 5´ denominadas P5 y P7, las cuales hibridan con los *primers* complementarios en la laminilla de secuenciación. Posteriormente las construcciones de bibliotecas finales se purificaron por medio de perlas *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter) a una relación de 1.8X.

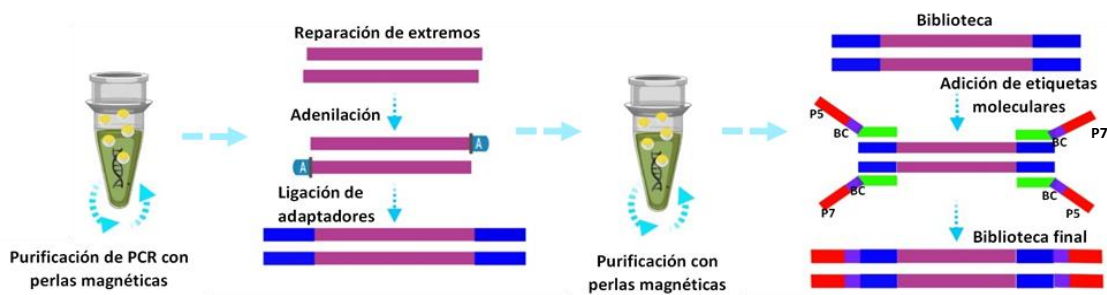


Figura 11. Proceso de preparación de bibliotecas de secuenciación. Inicia con la purificación de productos de PCR, posteriormente se realiza la reparación, adenilación y ligación de productos. Se realiza una segunda purificación de las bibliotecas, finalmente se agregan las etiquetas moleculares mediante PCR.

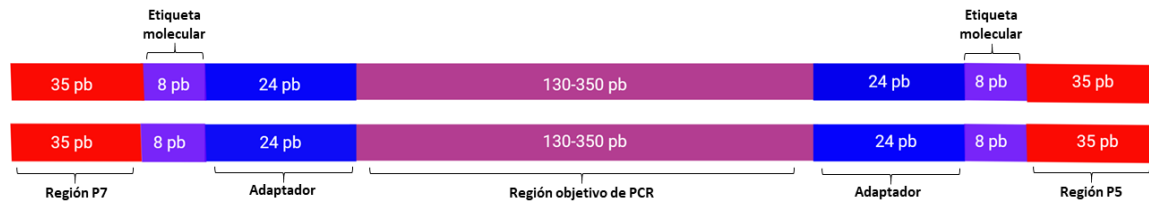


Figura 12. Ejemplo de una biblioteca final.

7.11. Cuantificación, calidad y mezcla de bibliotecas

Las bibliotecas se cuantificaron por método de fluorimetría con el *kit dsDNA Quantifluor* (Promega) y el equipo *Quantus* (Promega). La calidad y tamaño de las bibliotecas se analizaron en el equipo de electroforesis de alta resolución *Bioanalyzer 2100* (*Agilent Technologies*), con el chip *High Sensitive DNA Kit*. Este equipo basa su tecnología en una electroforesis por capilaridad en gel, permite analizar y detectar de forma cualitativa y cuantitativa moléculas, tanto pequeñas como grandes, mediante la migración diferencial de éstas, de acuerdo con sus tamaños. La forma de detectar las muestras es mediante la absorción de luz UV-visible a través de un capilar de sílice contenido en un cartucho. Dicho cartucho tiene los electrodos utilizados para producir el contacto eléctrico entre la fuente de alimentación y el capilar, permitiendo así, la separación de las muestras de acuerdo con su tamaño.

Una vez evaluadas las bibliotecas, se realizaron las eculizaciones para obtenerlas a una concentración de 4 nM. Por último, se mezclaron las bibliotecas de las diferentes muestras generando la mezcla de secuenciación.

7.12. Secuenciación masiva en paralelo (Illumina)

La mezcla de bibliotecas se secuenció mediante la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS, *sequencing by synthesis*) en el secuenciador MiSeq (Illumina). La secuenciación fue de tipo pareada (*paired-end*) de 2x300 ciclos para todos los genes. Las muestras fueron secuenciadas en dos corridas de secuenciación diferentes, en ambas se usó un *PhiX* al 2%, el cuál es una biblioteca utilizada como control en la secuenciación en Illumina. La biblioteca *PhiX* proporciona un control de calidad para la generación, secuenciación y hibridación de *clústers* en la laminilla de secuenciación (149).

La tecnología de SBS basa su química en la utilización de cuatro nucleótidos marcados con fluorescencia, para secuenciar decenas de millones de *clusters* en paralelo. Durante cada ciclo de secuenciación, se agrega un solo dNTP a la cadena molde de ADN, gracias a que

los nucleótidos están unidos a un terminador reversible y a un fluoróforo. De esta manera, después de agregar los dNTPs marcados con terminadores reversibles y lavar, se identifica el nucleótido incorporado por la excitación láser y la captura de imágenes; posteriormente, por acción enzimática, se libera el terminador y el fluoróforo para permitir el siguiente ciclo de incorporación de nucleótidos. Estas etapas son repetidas cientos de veces en ciclos que generan una serie de imágenes colorimétricas, que una computadora convierte en lecturas de secuencias (150). El proceso de secuenciación consta de tres pasos (Figura 13):

1. El primero paso inicia con la hibridación de las bibliotecas por las regiones P5 y P7 con los *primers* complementarios en la laminilla de secuenciación, con ello ocurre la amplificación clonal por puentes mediante polimerización en cadena por PCR.
2. Posteriormente se crean *clusters* (grupos) de moléculas idénticas de ADN.
3. Finalmente, ocurre la secuenciación bajo la química descrita anteriormente.

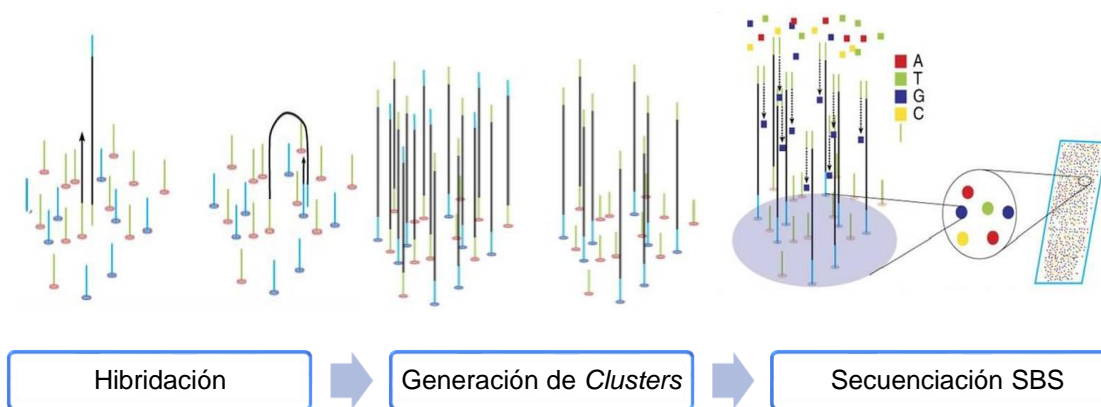


Figura 13. Proceso de secuenciación por síntesis. Inicia con la hibridación y amplificación por puente, generando la formación de *clusters* de moléculas idénticas, finalmente con la adición de nucleótidos marcados con fluoróforos ocurre la SBS.

7.13. Análisis Bioinformático

Después de la secuenciación se comprobó que las secuencias obtenidas tuvieran el puntaje de calidad esperado (Q30), que nos indica que hay un 99.9% de probabilidad de que una base sea llamada correctamente. En la Figura 14 se esquematiza el flujo para el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

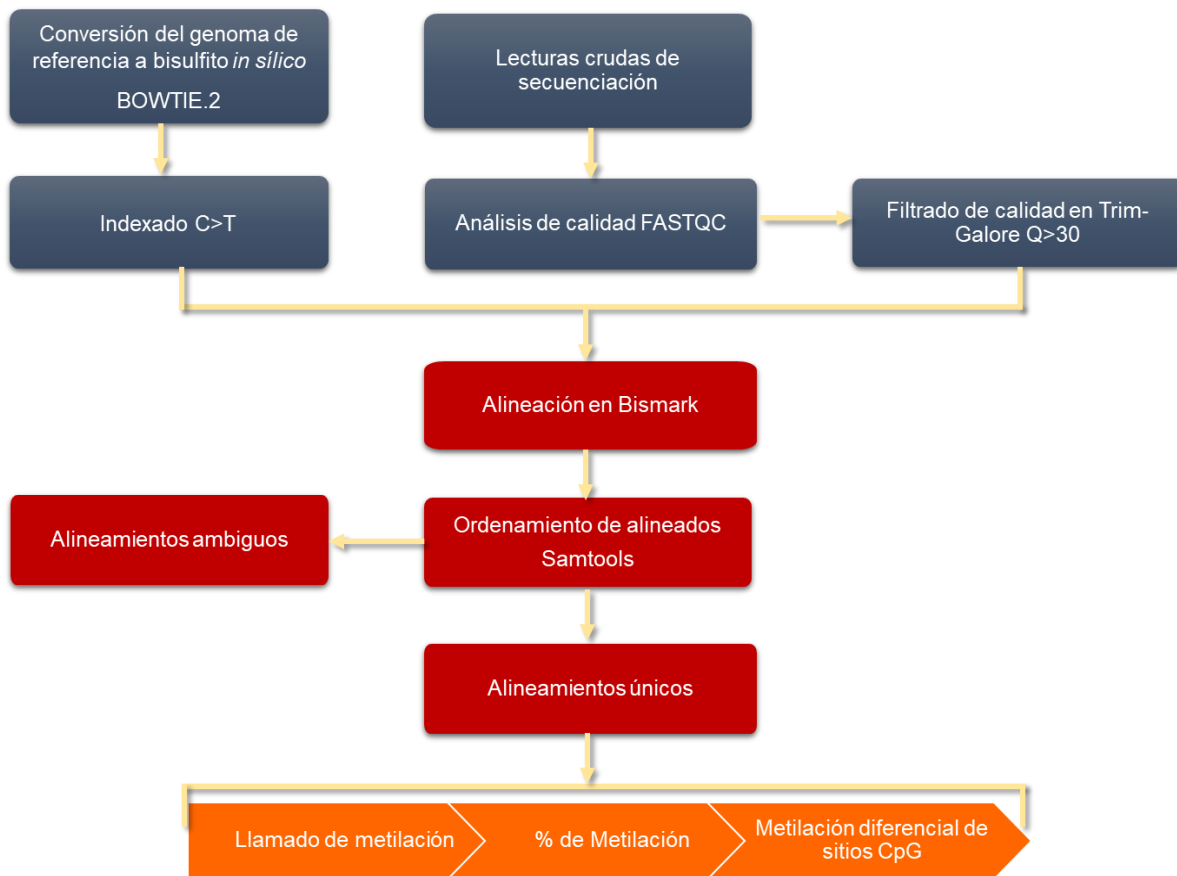


Figura 14. Flujo de análisis bioinformático de los datos de secuenciación obtenidos.

Se analizó la calidad de las secuencias crudas con el programa FastQC, aquellas secuencias que no pasaron los estándares de calidad fueron removidas mediante comandos de programación de *Trim Galore*. A la par se realizó la conversión *in silico* del genoma de referencia GRCh37/Hg19 mediante *Bowtie2*, esta herramienta indexa el genoma con un índice FM (basado en la Transformación Burrows-Wheeler o BWT) para mantener su huella de memoria pequeña, además permite la conversión de citosinas a timinas por una serie de comando dirigidos por el alineador Bismark (151).

Posteriormente se hicieron los alineamientos mediante la herramienta más usado en mapeo de metilación del ADN (152): el alineador Bismark, es un conjunto de herramientas para el análisis eficiente en el tiempo de los datos de Bisulfite-Seq (BS-Seq), realiza alineaciones de lecturas tratadas con bisulfito a un genoma de referencia (convertido *in silico*), y llamadas de metilación de citosina al mismo tiempo. Esta herramienta basa sus algoritmos en alineaciones de tres letras, por lo que, convierte todas las citosinas en timinas tanto en el genoma de referencia como en las lecturas BS-seq, lo que hace es mapear las lecturas,

después verificar para encontrar las citosinas en las lecturas BS-seq, las cuales indicarán los sitios de metilación (153).

Una vez alineados las secuencias BS-Seq con el genoma de referencia se hizo el llamado de metilación, con lo cual se mapean los sitios CpG`s de las lecturas para finalmente, indicar cuales sitios presentan algún grado de metilación porcentual. Los datos se visualizaron mediante el visualizador de datos de Bismark (*char-studio*) y en UCSC *Genome Browser*.

8. RESULTADOS

8.1. Extracción de ADN de sangre periférica total de C1

La extracción de ADN de sangre periférica se realizó por duplicado, se obtuvo un ADN con condiciones óptimas de integridad, visto en gel de agarosa al 0.8% como bandas únicas, bien definidas y de alto peso molecular, en la parte del pozo en la extracción número 1 es posible apreciar, en bajo grado, contaminantes proteicos, la pureza indicada por la relación 260/280 fue de 1.717 (Figura 15.A).

Para el caso de la línea celular MCF-7, como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, el ADN genómico fue tomado del banco de muestras del laboratorio 13 de la UBIMED, para corroborar su calidad se cuantificó y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se puede observar una banda única de alto peso molecular, en el pozo numerado con 1 se aprecian compuestos posiblemente proteicos, sin embargo, se cuantificó su pureza midiendo la absorbancia a 260 nm, indicando una pureza 260/280 de 1.987, lo cual indica una condiciones idóneas (Figura 15. B).

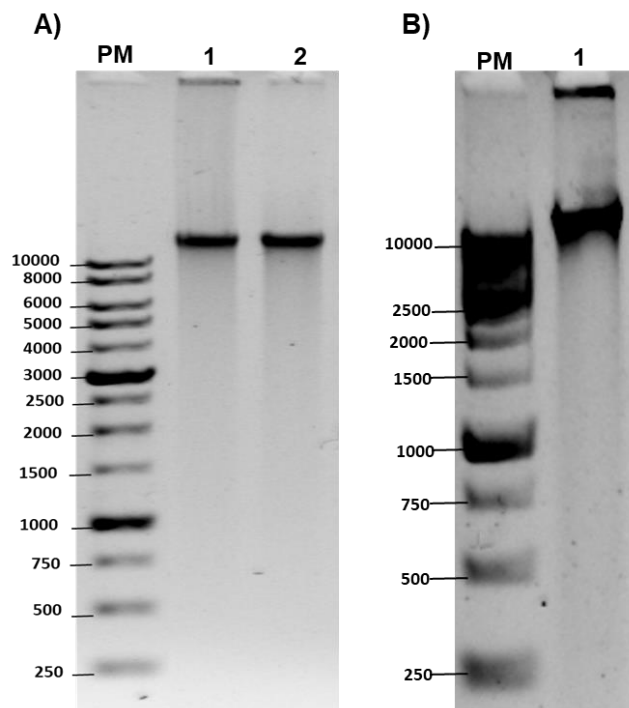


Figura 15. Extracción e Integridad de ADN genómico en electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. A) El primer carril a la izquierda, muestra el marcador de peso molecular de 1 kb, en el segundo y tercer carril se muestran 100 ng de ADN genómico de una persona sana. **B)** Se muestra la integridad del ADN genómico de la línea celular MCF-7, en el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb y en el carril marcado con número 1 se presentan 100 ng de ADN genómico de MCF-7.

8.2. Cuantificación de ADN genómico

El ADN genómico de MCF-7 presentó una concentración alta de 74.5 ng/μL representando un rendimiento de 7450 ng, el ADN genómico extraído por duplicado de sangre total periférica tuvo una concentración con promedio de 22 ng/μL, lo que representa un rendimiento en promedio de 2200 ng (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación por Qubit para ADN de doble cadena. Se presentan las concentraciones de ADN y el rendimiento de la extracción.

Muestra	Lectura	Vol. De elución (μL)	Rendimiento (ng)
MCF7	74.5 ng/μL	100	7450
C1	20 ng/μL	100	2000
C1	24 ng/μL	100	2400

8.3. Análisis bioinformático de regiones promotoras en genes conductores de cáncer de mama

Mediante el análisis de las regiones promotoras en los genes conductores del cáncer de mama *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* y *PTEN*, se identificó que los cinco genes pueden estar regulados por mecanismos epigenéticos. Se identificaron al menos tres islas CpG con tamaños variables, entre 100 y 500 pb dentro de dicha región.

El análisis se realizó mediante los softwares MethPrimer 2.0 y Genome Browser. El gen *BRCA1* ubicado en la cadena negativa del cromosoma 17, tiene 22 exones y nueve islas CpG, las primeras dos islas CpG se ubican dentro de la región promotora. El gen *BRCA2* ubicado en el cromosoma 13 en la cadena positiva, tiene 27 exones y siete islas CpG, una en la región promotora; *CHEK2* está ubicado en la cadena negativa del cromosoma 22, tiene 16 exones y 11 islas CpG, tres de ellas en el promotor; *PALB2* se ubica en la cadena negativa en el cromosoma 16, tiene 13 exones y 5 islas CpG, una en el promotor; y el gen *PTEN* se encuentra en la cadena positiva del cromosoma 10, tiene 9 exones y 7 islas CpG, una de ella en la región promotora. Las características particulares de cada promotor se muestran en la figura 16. Por su parte el gen *MLH1*, utilizado como control de conversión, tiene una región promotora de ≈ 701 pb y abarca desde antes del TSS hasta el primer exón, este gen se ubica en la cadena positiva en el cromosoma 3, tiene 18 exones y 4 islas CpG.

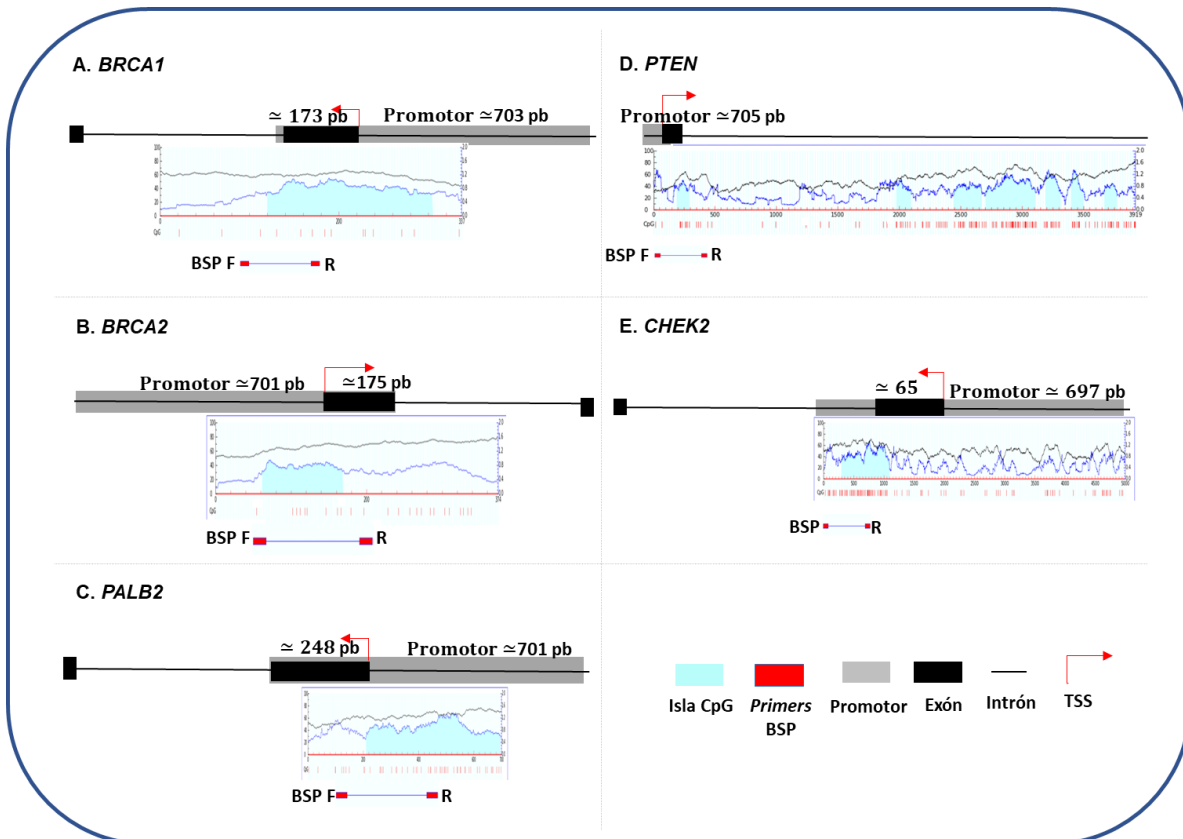


Figura 16. Diseño de primers específicos para secuenciación de Bisulfito. **A.** Gen *BRCA1*. Se observa la región promotora de ≈ 703 pb que abarca desde del TSS hasta el primer exón (≈ 248 pb), la isla sobre la cual se seleccionaron los primers abarca parte del promotor y el primer exón. **B.** Gen *BRCA2*. Presenta una región promotora de ≈ 701 pb, dentro de esta el primer exón de ≈ 175 pb y una isla CpG. **C.** Gen *PALB2*. Se observa la región promotora de ≈ 701 pb que abarca desde antes del TSS hasta el primer exón (≈ 248 pb) y una isla CpG. **D.** Gen *PTEN*. Se observa la región promotora de ≈ 702 pb que abarca desde antes del TSS hasta el primer exón (≈ 1116 pb), con varias islas CpG's. **E.** Gen *CHEK2*. Se observa la región promotora de ≈ 697 pb que abarca desde antes del TSS hasta el primer exón (≈ 65 pb), con dos islas CpG en la región promotora.

Una vez conocidas las regiones promotoras de los genes conductores, se tomó la isla con sitio objetivo ± 300 nucleótidos respecto al TSS, la selección de primers fue de acuerdo con la menor cantidad de Adeninas/Timinas y mapeo mínimo 5 sitios CpG (Tabla 6).

Tabla 6. Conversión *in silico* de las secuencias seleccionadas de la región promotora de genes conductores en cáncer de mama. Se muestran las regiones flanqueadas con los *primers* en cada promotor. Se etiquetan: *primer forward* (verde), *primer reverse* (amarillo), dinucleótidos CpG (azul) y citosinas no metiladas convertidas en uracilos y amplificadas como timina (rojo), respecto al software MethPrimer 2.0 con predicción de islas CpG.

BRCA1 (9 CpG)

A AGGGG AAGTGATG TTGGGTATGG CTGGGAGAGTGGATTTT CAAGTGTATAGATGGGTATTTTGA CGGGGTACGGC GAATTTGAGAGC TAAGG CTTGTGAATT
 TTGGGAGGGGGT AGTTGTAGGT CCGAGGAAAG CTGAGGATAGGAAGGGGATTGA

BRCA2 (5 CpG)

A TTTAAA ATGAG TGGAG TAAAAGAAAG GGATGGGGATTTGGAGTAGGTATAGGGG CGTTTTT TAAGTAGGGTGGTTGGGATTTTAAGGGT TAG CAGAAGAGAATATATA
 TTTAGTTTT CTTTTATT CCGTAGATATTGA CCGTTGGGATGTTGATAAGGAATTTT

CHEK2 (24 CpG)

GTGGG AGAAGAA TGT TTT CTT C GGGTTTTATGGG T C C TAGTTTAAATAG CCGGATAATGTTTT C T T T C C TAGTAT C TAGTTAG C GTTTTTTTTGGG
 AATTTTTGT C G T TAAAATTTTATATT C GAGTAAAGTTT C G T T T T T T C T T A T A T T G G T C C G T T A T T T A G T C G T G G T A T T C G T G G G A A A A G T A A A G A G A G C G T T A
 A T T A G A T T A A T G T T G T T G T T G G G A G T C C A G G G G C G G A T T A T T C A G G G A A T T C C G G T T A A G T T T C G T T T T T T T T A A A T A T A A T T T T A G G A G T A T G A G G

PALB2 (13 CpG)

AAGAGGAGGATA ATAT TGGAT CCGGTAT C TTT C ATGTATTTAGATTTGTTGTAGAGTAGTT C C T T A A T T T A T G G T C C C T T T T T T T T T T A G T T T C G A
 T T T G T T A G A G T A G T C C G T A G T T T T T A G A G A T T C C G T A T T T T C G T C G T T T T T A T T T T C G T T T A G G T G G T T A T T G G G A T

PTEN (8 CpG)

TAGA AGGTAAAGAA TAAGTATga T C G C C G t g g T t T a C C T T t g t a a t T T T a g T a T t t g g g a g g T C t g g C g g T a g a t T a C C a g g t T a g g a g a t C C a g a T t a t T t g a T t a
 a T a t g g t g a a a T T T t

MLH1 (24 CpG)

GGAGTGAAGGAGG A C C G G A A G T C G T T T G A C G T A G A C G T T T A T T A G G G T C C G C G T C C T C G T T C G T T A T A T A T C G T T C T A G T A T T C G T G T T A G T T T C G T A G T G C C T T G A
 C G T C G C T T C C C G G T A G T A C C A T G A G C C G C A T A G A T T A G G T A T A G G G T T T A T C G T T T T T

Las características de los cinco pares de *primers* fueron de una longitud de 20 a 30 nucleótidos, una T_m de 51 °C a 60 °C, el contenido de GC% en el *primer* reverso de *PTEN* fue el más bajo con 14.8%, y el mayor porcentaje fue el reverso de *BRCA1* con 47.6%, los tamaños de productos varían, siendo *PTEN* el más pequeño con 133 pb y *CHEK2* el de mayor tamaño con 352 pb, el número de CpG's flanqueado con cada par de *primers* fue de 5 CpG (*BRCA2*) a 24 CpG's (*CHEK2*) (Tabla 7).

Para el caso de *CHEK2* se probaron dos juegos de *primers* adicionales con el objetivo de disminuir el tamaño del producto a menos de 200 pb, para tener mayor homogeneidad en los tamaños de productos, sin embargo, dichos diseños no funcionaron (ANEXO 3).

Tabla 7. Características de *primers* específicos para secuenciación directa de PCR (BSP) de ADN convertido con bisulfito de sodio.

Gen	Primer	Longitud	Tm	GC%	Producto	CpG's
BRCA1	F	21	54.4	38.1	186	9
	R	21	59.1	47.6		
BRCA2	F	30	58.5	23.3	178	5
	R	24	60	29.2		
CHEK2	F	20	51.0	35.0	352	24
	R	22	52.4	31.8		
PALB2	F	24	53.7	29.2	196	13
	R	21	55.3	33.3		
PTEN	F	26	52.2	26.9	133	8
	R	27	56.0	14.8		

F=Forward; R= Reverse; BSP= Bisulfite sequencing PCR

8.4. Conversión de ADN genómico con bisulfito de sodio

Las condiciones de conversión se optimizaron, para ello, todo el proceso se realizó evitando la exposición a luz visible y después de la desulfonación se mantuvieron las muestras a -20 °C. Después de la conversión se recuperó alrededor de 80% de ADN en las tres muestras en que se realizó el tratamiento. Las muestras tuvieron concentraciones similares entre 9.9 y 11 ng/μL, lo que equivale a un rendimiento de alrededor de 400 ng, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Características de la conversión de ADN con bisulfito de sodio.

Muestra*	Concentración de DNA post-bisulfito (ng/μl)	Rendimiento (ng)	Porcentaje recuperado
MCF-7	11	440	88%
C1	9.9	396	79.2%
C1	10	400	80%

*500 ng de entrada (Input)

8.5. Amplificación de ADN convertido con Bisulfito de Sodio

Para la reacción de PCR se siguió el programa mencionado en materiales y métodos, usando diferentes temperaturas de hibridación para cada juego de *primers* diseñados. Los

productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% y los diferentes fragmentos de PCR se caracterizaron por su peso molecular. Se obtuvo una eficiencia de *primers* variable, por lo que, para homogeneizar las reacciones se optó por usar diferentes cantidades de ADN molde para las PCR's, para el caso del control *MLH1* se usaron 10 ng totales para efectuar las reacciones, para *BRCA1*, *PALB2* y *CHEK2* se emplearon 15 ng totales, y para *BRCA2* y *PTEN* se usaron 20 ng totales (Figura 17).

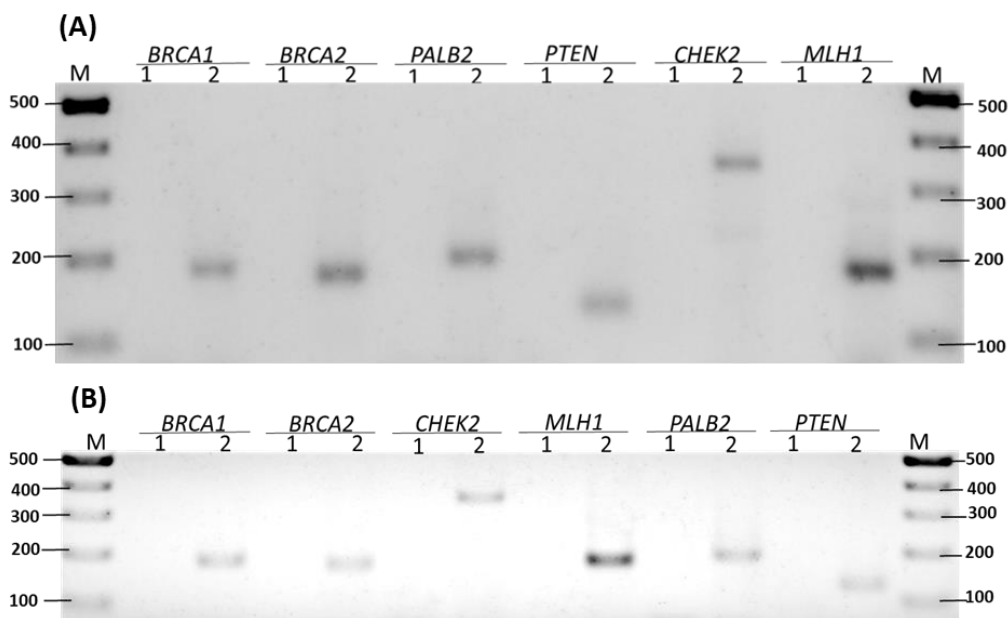


Figura 17. Productos de PCR de MCF-7 y C1 en gel de agarosa 1.5%. A) Se muestran los productos de PCR obtenidos de ADN convertido de la línea celular MCF-7. **B)** Productos de PCR obtenidos de ADN genómico convertido de C1. Los carriles marcados con "M" indican el marcador de peso molecular (100 pb). El carril marcado con 1 indica el control negativo (ausencia de ADN molde) y el carril 2 muestra el producto de PCR obtenido a partir de ADN convertido con bisulfito de sodio.

8.6. Análisis de bibliotecas de secuenciación

Una vez obtenidos los productos de PCR se purificaron, posteriormente se realizó la ligación de adaptadores e indexado por PCR cíclica reducida, con ello se obtuvieron las bibliotecas finales de cada uno de los productos, con un incremento de aproximadamente 134 pb en la biblioteca final. Las bibliotecas fueron analizadas con chip *High Sensitive DNA Kit* en el equipo *Bioanalyzer*, donde se logró verificar los tamaños con los incrementos esperados en cada biblioteca. Sin embargo, se identificaron varios tamaños no correspondientes a las bibliotecas, lo que significa que la amplificación por PCR no fue totalmente específica como lo indicaban los resultados en gel de agarosa al 1.5%, esto es frecuente debido a la alta sensibilidad del *Bioanalyzer*. En el control *MLH1*, la concentración

picomolar correspondiente al tamaño de la biblioteca fue mayor que los productos inespecíficos amplificados, representando el 60% del total de productos, en *BRCA1* la biblioteca específica de acuerdo a su molaridad representó el 59% del total de productos, *BRCA2* representó una especificidad del 50% correspondiente a su molaridad comparado con los productos inespecíficos obtenidos de tamaños variables, el caso de *CHEK2* representó una inespecificidad muy grande, pues únicamente el 16% de todas las bibliotecas que se obtuvieron corresponden al tamaño esperado, lo que sugiere que los *primers* usados para esta región pueden estar hibridando en diferentes regiones en un alto porcentaje (>80%). *PALB2* representó una amplificación específica en 59% de los productos, de acuerdo con sus proporciones picomolares. Por último, *PTEN* fue quien presentó, de acuerdo a este análisis, los *primers* de mayor especificidad con un 77% de bibliotecas con tamaño correspondiente al tamaño de la región de análisis (Tabla 9).

Tabla 9. Molaridad de las bibliotecas esperadas respecto al total de moléculas en cada muestra.

Biblioteca	Tamaño	Concentración [pg/μL]	Molaridad [pmol/L]	Molaridad total	Porcentaje de biblioteca
<i>MLH1</i>	327	505	2340	3889	60%
<i>BRCA1</i>	326	358	1427	2405	59%
<i>BRCA2</i>	314	227	1091	2215	50%
<i>CHEK2</i>	481	181	571	3409	16%
<i>PALB2</i>	337	400	1793	3060	59%
<i>PTEN</i>	283	620	3326	4312	77%

En su forma gráfica los resultados del *Bioanalyzer* se pueden representar en electroferogramas, de acuerdo a las unidades de fluorescencia emitidas y capturadas por el equipo, respecto al tamaño de la biblioteca. En la figura 18 se muestran los gráficos de cada biblioteca, los picos en los extremos corresponden a las referencias de pesos moleculares menor y mayor, al centro se muestran los picos correspondientes a los tamaños detectados por sus fluorescencias emitidas. Para todos los casos se obtuvieron los mayores picos de fluorescencia correspondiente con los tamaños de bibliotecas esperados, en *BRCA1* (B) y *PTEN* (F) se muestran picos de fluorescencia únicos, lo cual indica un solo producto y la especificidad de los *primers* para esas regiones. Por el contrario en *CHEK2* se pueden observar múltiples picos correspondientes a varios tamaños, sin embargo, el mayor pico de

fluorescencia corresponde al tamaño de biblioteca esperado para esta region de *CHEK2* (D). *MLH1* (A), *BRCA2* (C) y *PALB2* (E) presentaron el mayor pico de florescencia en el tamaño de biblioteca esperado para cada una de sus regiones, sin embargo, se pueden observar productos inespecíficos de menores y mayores tamaños.

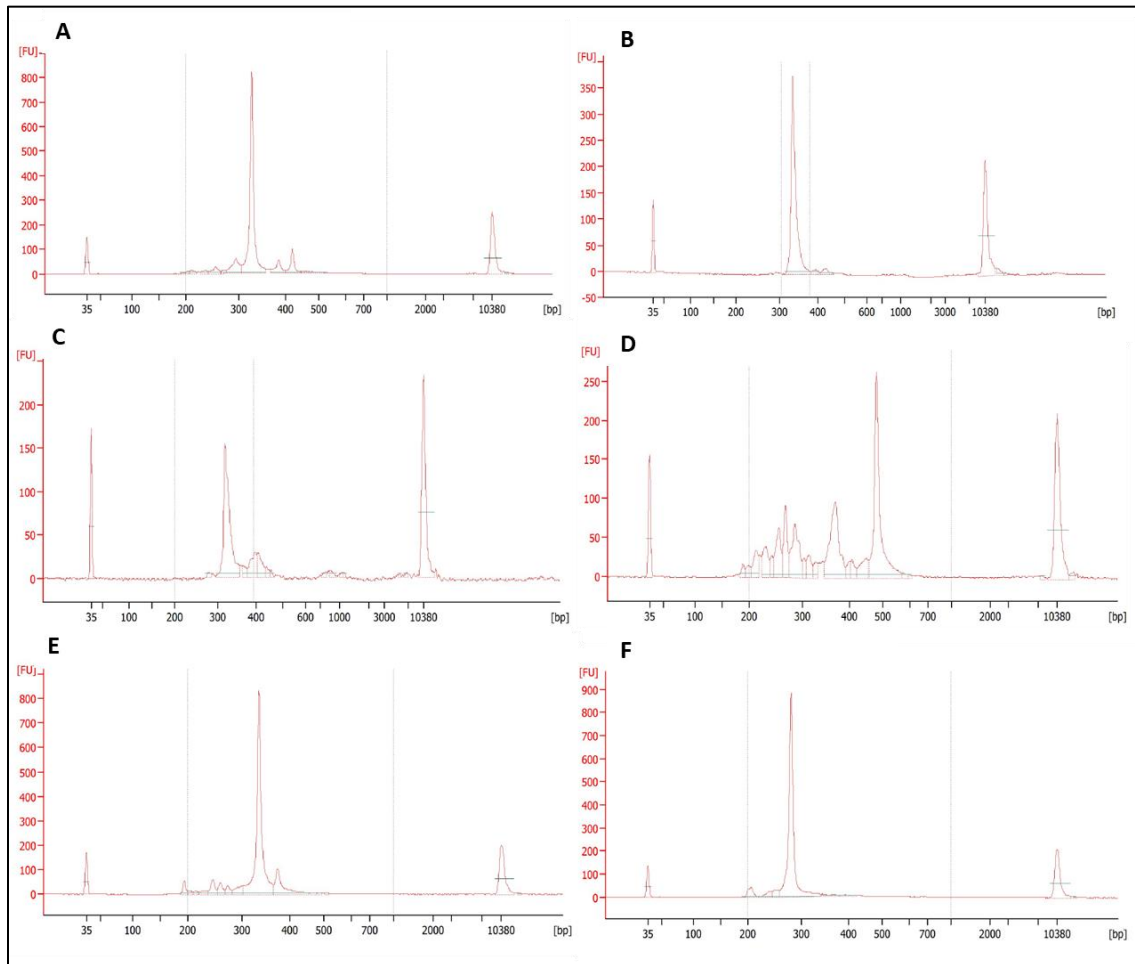


Figura 18. Electroferogramas de una electroforesis de alta resolución (*Bioanalyzer*). A. Biblioteca final de control *MLH1*. **B.** Biblioteca final del amplicón *BRCA1*. **C.** Biblioteca final del producto de *BRCA2*. **D.** Biblioteca final del producto de *CHEK2*. **E.** Biblioteca final del producto de *PALB2*. **F.** Biblioteca final del producto de *PTEN*. En el eje vertical se muestran las unidades de florescencia emitidas al detectarse una molécula, en el eje horizontal se grafican las unidades en pares de bases, los picos de cada electroferograma en los extremos indican la referencia de marcador de peso molecular de menor y mayor tamaño (izquierda y derecha, respectivamente), los picos al centro corresponden a los tamaños de las bibliotecas.

8.7. Análisis de calidad de las lecturas de secuenciación

Para analizar la calidad de secuenciación se evaluaron los porcentajes de lecturas de alta calidad (Q30) y la profundidad. El valor Q30 indica cuantas lecturas tienen una posibilidad de error menor o igual a 0.1%, por lo que todas aquellas lecturas con dicho valor fueron

consideradas como lecturas de alta calidad, dicho de otra forma, tienen 99.9% de seguridad de que fueron llamadas de forma correcta.

Debido a que la secuenciación fue de tipo *pair-end* 2x300 ciclos y la mayoría de las bibliotecas de este trabajo tienen una longitud menor, la calidad de la secuenciación decayó considerablemente cuando se sobrepasaron los tamaños de las bibliotecas, por lo que se hizo un ajuste del control de calidad previo a la alineación de datos. Adicionalmente, los protocolos de análisis de secuenciación de bisulfito indican que es necesario realizar este ajuste del control de calidad, ya que con ello se eliminan nucleótidos de citosina incorporados durante la preparación de bibliotecas lo cual podría generar errores al determinar el estado de metilación. Lo anterior se soluciona mediante los algoritmos de “*Trim Galore*”, al eliminar nucleótidos por reconocimiento del adaptador (153).

La profundidad representa el número de veces que una base es leída por región. La muestra para la región de *MLH1* se realizó en una corrida de secuenciación diferente al resto, por lo que su profundidad calculada fue mayor a la de las otras muestras. En la figura 18, se muestran los análisis de calidad antes y después de hacer los filtrados y ajustes de calidad, en todos los casos el realizar el ajuste de calidad no se vio reflejado en una considerable reducción de la profundidad, lo que indica que la mayoría de las lecturas tuvieron una calidad aceptable, con una profundidad superior a 1,000X, que es la profundidad sugerida en análisis de secuenciación de bisulfito (154,155). En *MLH1* se presentó la mayor profundidad con alrededor de 15,000 lecturas, seguido por *PALB2* y *PTEN* en MCF-7 y *CHEK2* en C1 quienes tuvieron una profundidad de alrededor de 10,000 lecturas. *BRCA2* y *CHEK2* (MCF-7), y *PALB2* y *PTEN* (C1), presentaron una profundidad de alrededor de 7,000 lecturas. Las muestras con menores profundidades fueron *BRCA1* en ambas muestras y *BRCA2* en C1. En todas las muestras se cortaron las lecturas que no cumplieron con la calidad de Q30 y sólo se procedió con lecturas de calidad aceptable (figuras 19 y 20).

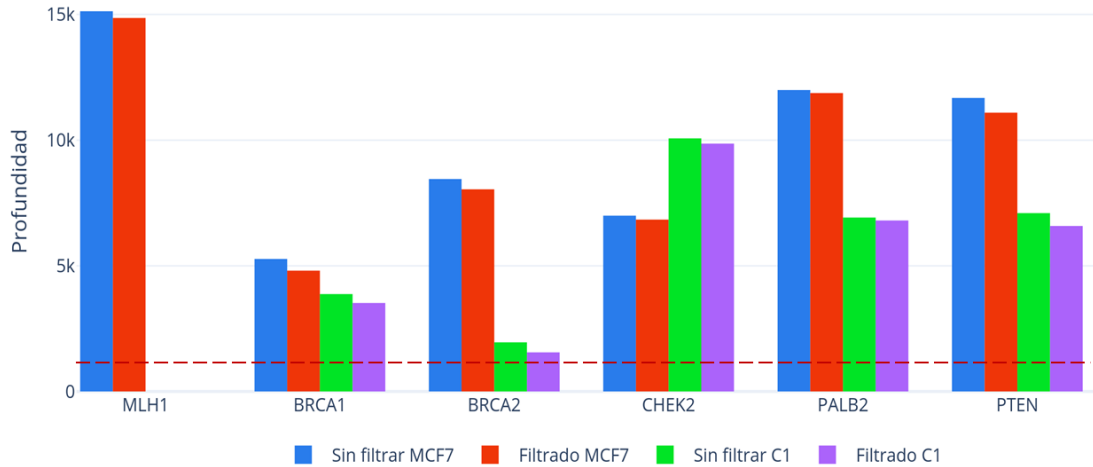


Figura 19. Filtrado de lecturas que no cumplieron con la calidad de Q30. En el eje vertical se muestra la profundidad de la secuenciación para cada región de los genes, en un rango de 0-15,000 lecturas. Las barras en color azul y rojo representan las muestras de la línea celular MCF-7, antes y después del filtrado, respectivamente. Las barras en color verde y morado corresponden a las profundidades obtenidas de las muestras de C1, en verde se indica el análisis de calidad previo al filtrado y en morado la profundidad después del filtrado. La línea roja punteada indica la profundidad óptima sugerida por Masser (154) en análisis de secuenciación de bisulfito.

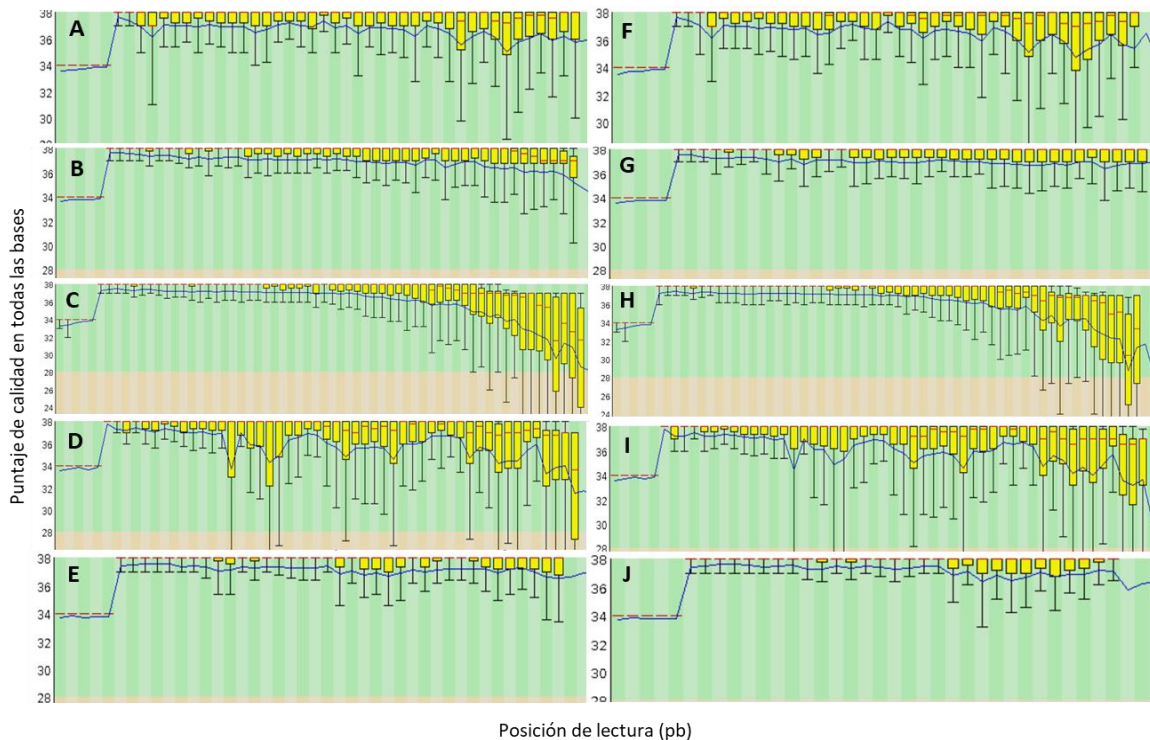


Figura 20. Calidad de las lecturas obtenidas de secuenciación masiva en paralelo. A-E. Muestras de la línea celular MCF7. F-J. Muestras de sangre total periférica de C1. A y F. Calidad de lecturas obtenidas de la región promotora *BRCA1*. B y G. Calidad de lecturas obtenidas de la región promotora *BRCA2*. C y H. Calidad de lecturas obtenidas de la región promotora *CHEK2*. D e I. Calidad de lecturas obtenidas de la región promotora *PALB2*. E y J. Calidad de lecturas obtenidas de la región promotora en *PTEN*. En el eje vertical se grafica el puntaje de calidad por posición de la base en la lectura (eje horizontal).

8.8. Análisis de metilación

Una vez corroborado que las lecturas cumplieron con la calidad de secuenciación aceptable se procedió a realizar el alineado con la herramienta de Bismark y Bowtie2. La eficiencia fue baja principalmente para la región de *CHEK2*, lo cual se relaciona con los resultados obtenidos en la electroforesis de alta resolución, pues el presentar una alta inespecificidad en la amplificación se vio reducido en los alineamientos únicos en el genoma de referencia. El resto de las muestras presentaron un porcentaje de alineamientos únicos de alrededor del 40% (figura 21).

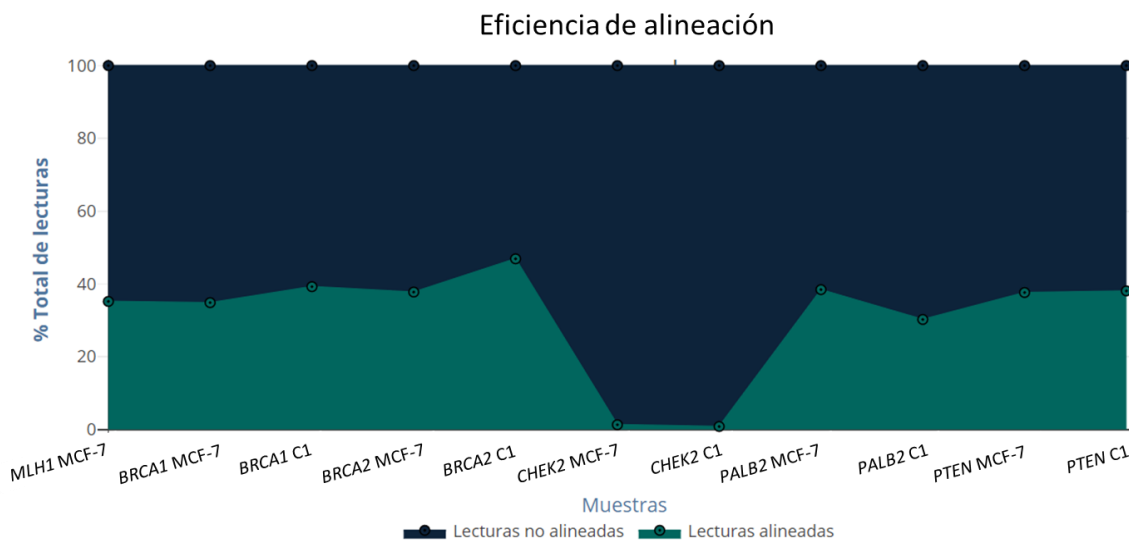


Figura 21. Eficiencia de mapeo de secuenciación directa de bisulfito mediante el alineador Bismark. En el eje vertical se muestran los porcentajes del total de lecturas, en color sombreado oscuro se representan las lecturas no alineadas o con alineamientos ambiguos y en verde las lecturas alineadas al genoma de referencia en la región de interés para cada una de las muestras. Visualización en *chart-studio*.

La región analizada en los cinco genes mostró resultados variables de metilación. En el gen *BRCA1* la región genómica se localiza en chr17:41277080-41277266 (-), esta región sobre la isla CpG mapea 9 sitios CpG los cuales presentaron en promedio en la muestra de MCF-7 1.5% de metilación, mientras que en C1 presentó únicamente 0.7%. En *BRCA2* la región analizada abarca de las posiciones chr13:32889333-32889510 (+), en esta región se abarcan 5 sitios CpG los cuales, en MCF-7 presentaron un promedio de 1.4% y en C1 3.9%. La región analizada en *CHEK2* se localiza en la posición chr22:29137910-29138262 (-), abarca 24 sitios CpG en los cuales se presentó un promedio de 8.4% en MCF-7 y 1.8% en C1. En *PALB2* la región seleccionada se localiza en la posición genómica chr16:23652747-23652943 (-), dicha región abarca 13 sitios CpG, los cuales presentaron un promedio de metilación de 0.5% en MCF-7 y 0.4% en C1. La región seleccionada para analizar la isla CpG en *PTEN* se ubica en la posición genómica chr10:89619479-89619611 (+), dicha

región abarca 8 sitios CpG, los cuales presentaron un promedio de metilación de 60.7% en MCF-7 y 95.6% en C1. El control *MLH1* que corresponde a las posiciones de nucleótidos 804 a 986 del ADN (Nº de acceso de Gene bank: U83845), se analizó únicamente en la línea celular MCF-7, la región abarca 24 sitios CpG los cuales presentaron 8.8% de metilación (figura 22).

Porcentaje de metilación en regiones promotoras de genes conductores de cáncer de mama

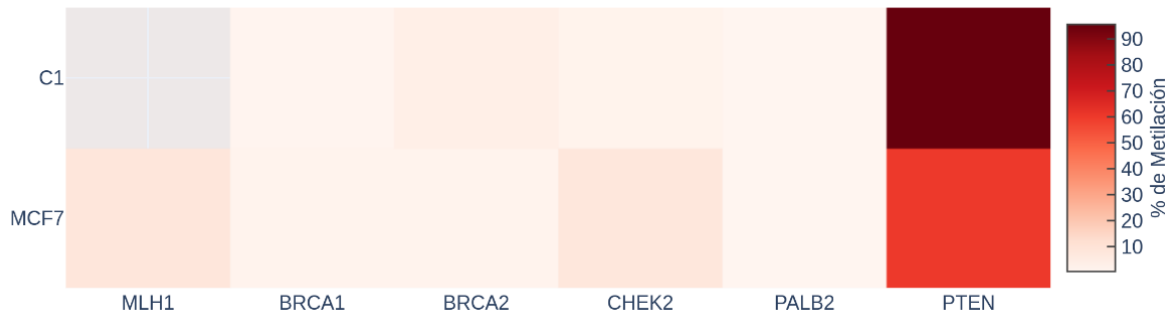


Figura 22. Heat map 1. Representación de porcentaje de metilación en regiones promotoras de genes conductores del cáncer de mama. El promotor de mayor nivel de metilación dentro de su región promotora en la muestra de línea celular MCF-7 fue *PTEN*, así como en C1, presentando un porcentaje de metilación mayor del 90%, mientras que la región analizada de *PALB2* muestra el menor porcentaje de metilación (<0.5%). En el eje horizontal se presentan los genes analizados, en el eje vertical están los dos tipos de muestras, los colores indican el porcentaje de metilación en las regiones evaluadas, siendo directamente correlacionado la intensidad del color rojo con el nivel de metilación presente. En *MLH1* no se evaluó en muestra de C1 debido a que no entró dentro del panel de muestras a secuenciar, se muestra en color gris.

Por último, se realizó un análisis de metilación diferencial de sitios CpG en cada una de las regiones analizadas para identificar patrones de metilación en los dos tipos de muestras. Entre 5 y 24 sitios CpG fueron analizados en cada región de los genes en ADN genómico de la línea celular MCF-7 y de sangre periférica de C1. El número de sitios CpG se identificó por el llamado de metilación de todos los sitios CpG, posteriormente se obtuvieron diferentes niveles. La región control de *MLH1* presentó dos sitios diferencialmente metilados, en *BRCA1* se identificó un sitio diferencialmente metilado, con variaciones entre la línea celular MCF-7 y C1, siendo la línea celular MCF-7 la muestra con un mayor nivel de metilación, en *BRCA2* se detectó un sitio diferencialmente metilado, mostrando un patrón de mayor metilación en C1 que en MCF-7. *CHEK2* presentó un mayor nivel de metilación en la muestra MCF-7 en 9 sitios CpG, mientras que en C1 el nivel fue menor en únicamente 3 sitios CpG, entre ambas muestras sólo un sitio CpG diferencialmente metilado fue compartido. *PTEN* presentó 11 sitios CpG diferencialmente metilados en MCF-7 y en C1, 6 sitios con bajo grado de metilación. En *PTEN* se presentó un alto nivel de metilación en 4

sitios CpG compartidos entre ambas muestras de MCF-7 y C1, en C1 se reportaron los 8 sitios CpG con niveles de metilación altos, lo que se considera hipermetilación (figura 23).

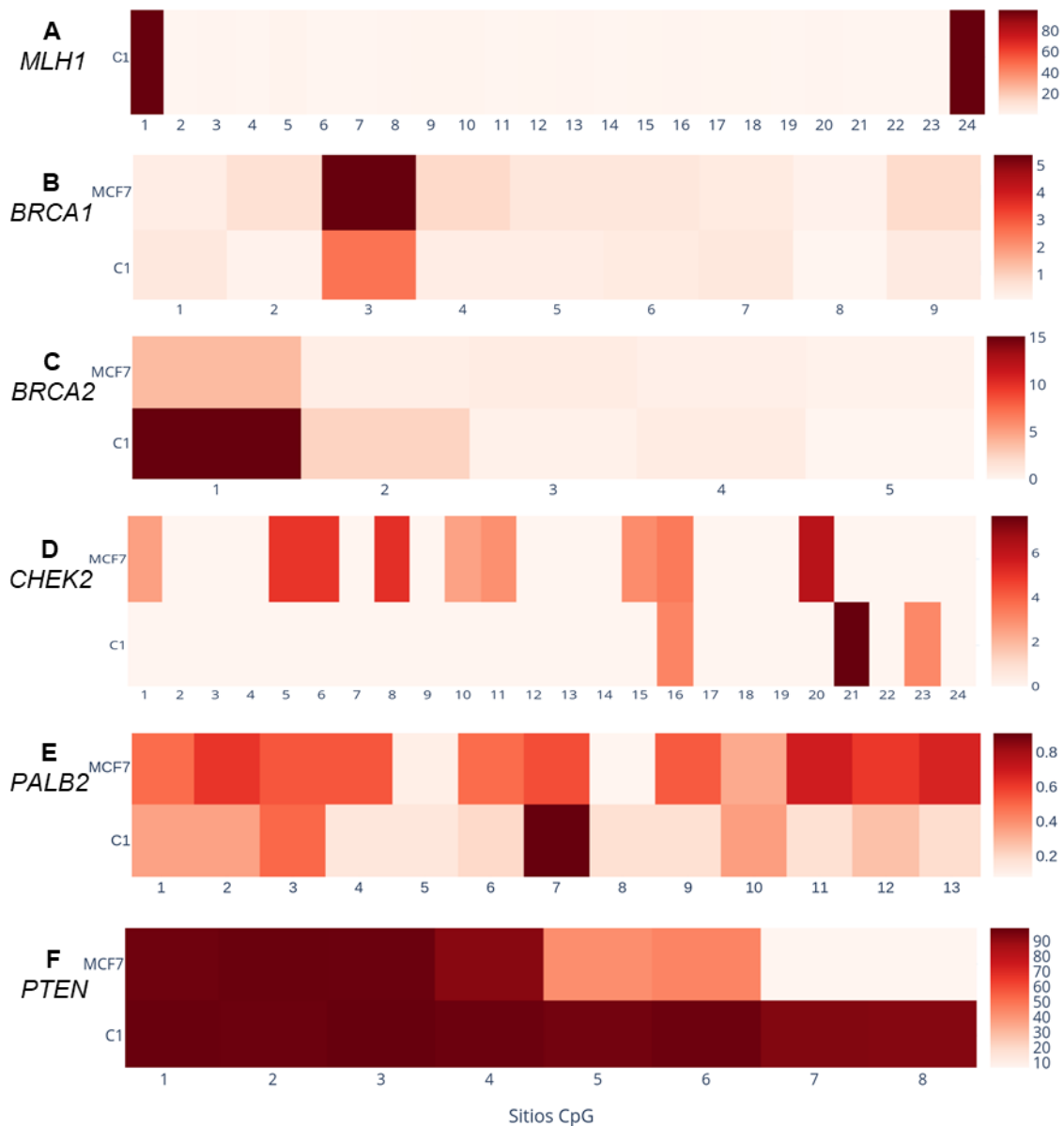


Figura 23. Heat map 2. Análisis de metilación diferencial de sitios CpG en la región promotora de genes conductores del cáncer de mama. A) Metilación en región promotora del control *MLH1*. **B)** Metilación en región promotora del gen *BRCA1*. **C)** Metilación en región promotora del gen *BRCA2*. **D)** Metilación en región promotora del gen *CHEK2*. **E)** Metilación en región promotora del gen *PALB2*. **F)** Metilación en región promotora del gen *PTEN*. En el eje horizontal se muestran los sitios CpG analizados en cada región, en el eje vertical izquierdo se indica el tipo de muestra y del lado derecho el nivel de metilación diferencial por sitio CpG, representado con los indicadores de colores de menor a mayor intensidad proporcional al nivel mayor y menor de metilación, respectivamente.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se integró la conversión por bisulfito de sodio con la secuenciación masiva directa de productos de PCR, en regiones promotoras de genes conductores del cáncer de mama. Tales regiones se caracterizan por posicionarse próximas al sitio de inicio de la transcripción (TSS) y/o cerca de los primeros exones, además, se ha reportado que más del 60% de los genes humanos son regulados por islas CpG (156). Bajo este contexto, las alteraciones en la regulación epigenética pueden ser detonantes en el desarrollo de enfermedades por medio de eventos epigenéticos conductores(157). Específicamente los TSG pueden ser regulados por la metilación del ADN en Islas CpG localizadas dentro de la región promotora, por lo que los genes TSG de susceptibilidad al CM: *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* y *PTEN*, estudiados en este trabajo, podrían ser regulados por dicho mecanismo debido a su alta predicción de secuencias ricas en CpG dentro de la región promotora.

La técnica elegida para medir el estado metilación del ADN en los cinco genes, fue la conversión con bisulfito de sodio. Por medio de esta técnica denominada como estándar de oro, se obtuvo una recuperación óptima >75%, tal y como se ha reportado en tratamientos con bisulfito de sodio mediante el uso de kits de conversión (158,159), esto fue corroborado con dos métodos de cuantificación (Quantus y Nanodrop). Sin embargo, las amplificaciones por PCR presentaron productos inespecíficos detectados mediante el equipo de alta sensibilidad de *Bioanalyzer*, lo cual es común en ADN convertido con bisulfito de sodio, debido a que es un ADN rico en AT, lo que complica la especificidad de amplificación (160).

A pesar de ello, la mayor molaridad correspondió a los productos de interés en casi todas las regiones analizadas, excepto para *CHEK2*, donde los productos inespecíficos en sumatoria tuvieron mayor proporción que los amplicones de interés. Particularmente, esta región de *CHEK2* resultó difícil de tratar previo a la amplificación (durante el diseño de *primers*), debido a que es una región con gran número de dinucleótidos CpG, lo que complicó la selección de *primers* por evitar sitios CpG dentro del mismo y que el tamaño del amplicón fuera menor a 400 pb. Por ello se probaron tres juegos de *primers* adicionales (ver ANEXO 3), siendo el reportado el único que se logró amplificar. Si bien, con métodos bioinformáticos es posible eliminar dichas inespecificidades, para futuros análisis utilizando los *primers* aquí propuestos de la región en *CHEK2*, sugerimos que se haga una purificación del producto de PCR obtenido en gel de agarosa o bien, que se prueben otros diseños de

primers, esto para que los resultados sean de mejor calidad y tengan una mayor profundidad.

Frecuentemente los datos reportados por NGS han mostrado profundidades bajas en análisis confiables sobre los niveles de metilación del ADN, debido a su composición proveniente de una mezcla de diferentes tipos de células, y de estado funcional variable (155), lo cual es congruente con nuestros resultados, en los que en las muestras de sangre periférica de C1 se obtuvieron profundidades inferiores que en la muestra de la línea celular MCF-7 (figura 19). Esto puede deberse a la heterogeneidad de leucocitos en sangre (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos T y B), lo que sugiere que existe un estado funcional variable. En cambio, en una línea celular se tiene la ventaja de ser una muestra homogénea en cuanto a morfología y composición celular (161), por ende, un estado funcional con menor variabilidad.

Usando una profundidad teórica mínima de secuenciación de 5000X y máxima de 15000X, obtuvimos resultados con valores de profundidad desde 1500X a 15000X; una causa de esta variación se debe a que las muestras se secuenciaron en diferentes corridas de secuenciación, aunque también puede atribuirse a variaciones de cuantificación durante el proceso de preparación de bibliotecas. A pesar de la heterogeneidad en los valores de profundidad obtenidos, de acuerdo a lo sugerido por Masser (154) y Lee (155) nuestros resultados presentaron valores por arriba de la profundidad mínima de 1000X, que ellos proponen para la evaluación cuantitativa y precisa sobre los niveles de metilación del ADN.

Con la profundidad presente en todas las muestras, se lograron coberturas de alineación muy altas en un intervalo de 400 a 5000 lecturas alineadas, a pesar de que aproximadamente el 10% de los sitios CpG en el genoma son difíciles de alinear después de la conversión con bisulfito (162). Por lo anterior, sugerimos que en futuros análisis de este tipo se use una profundidad de al menos 5000X, esto debido a las inespecificidades comunes que se presentan y para tener una mayor certeza en los resultados obtenidos, ya que una secuenciación profunda dirigida (>5000X) puede ayudar con la supresión de errores técnicos (163).

Por otro lado, diferentes análisis epigenéticos se han realizado en modelos de estudio de líneas celulares, para evaluar estados de metilación en regiones promotoras (164,165). Específicamente en la línea celular MCF-7, proveniente de adenocarcinoma de mama, caracterizada por ser de baja invasión y sensible a las hormonas, se han realizado varios

estudios sobre la metilación en genes de susceptibilidad al CM, la mayoría de ellos en busca de blancos terapéuticos (166–170). Nuestros resultados en este modelo presentaron mayores niveles de metilación en los sitios CpG de las regiones promotoras en *BRCA1*, *CHEK2* y *PALB2* en comparación con C1, estos resultados se esperaban en todas las regiones analizadas debido al origen tumoral de la línea celular.

El ambiente es un factor importante que modifica los patrones de metilación. En estudios de metilación en líneas celulares, los patrones se han visto fuertemente afectados por la presencia de antibióticos en los medios y por el número de pases de la línea celular (171), generando inconsistencias como niveles altos de metilación (hipermetilación) en las regiones analizadas (169,172). En virtud de que el ADN de la línea celular MCF-7 fue tomado de un banco de ADN genómicos previamente extraídos, no se controlaron características como el número de pases del cultivo, por lo que ese factor pudo influir en los niveles de metilación obtenidos en esta muestra. Los valores de metilación obtenidos en las muestras de MCF-7 y C1 presentaron patrones variables, esto podría ser a causa de que la metilación no ocurre de manera uniforme en todo el genoma, si no en un modelo mosaico (173)

Si bien, los resultados obtenidos fueron variables en cada región analizada, con las dos diferentes muestras de ADN genómico, no es posible concluir sobre los estados de metilación en dichas regiones, debido a que se realizó en una sola muestra, pues el objetivo de este trabajo fue implementar una nueva metodología bajo la perspectiva de llevarlo a cabo en muestras de pacientes mexicanas con síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario, además, puede emplearse para el análisis de otros tipos de neoplasias. Con ello, podemos indicar que la metodología es apta para cuantificar de manera diferencial y específica los estados de metilación en las regiones analizadas, no obstante, se propone que, en próximos análisis de estudios detallados de las regiones, se abarquen regiones adicionales con otros *primers*.

A pesar de las limitantes que se presentaron en el análisis de resultados, existen varios estudios donde se han observado diferentes estados de metilación sobre las regiones promotoras de los genes aquí seleccionados. En *BRCA1* se identificaron mayores porcentajes de metilación en el *loci* analizado de MCF-7 en comparación con C1, con un promedio <2% de metilación. Lo reportado para esta región promotora ha sido un tanto variable, en particular, se ha detectado evidencia de metilación monoalélica en *BRCA1* y *BRCA2* en leucocitos con frecuencias entre participantes libres de cáncer de 21.5% y

18.3%, respectivamente (174). Otros valores reportados varían entre 4,1% y 21%, indicando una hipermetilación parcial (mosaico) del gen *BRCA1* (175), sin embargo, estas estimaciones son inusualmente altas. Otros estudios, han revelado metilación constitucional del promotor *BRCA1* asociada específicamente con la patología de CM de inicio temprano, presentando niveles de metilación del 10% al 5%, nuevamente apuntando a un patrón de metilación heterogéneo (mosaico) (176).

Con respecto a lo reportado en la línea celular MCF-7 para la región promotora del gen *BRCA1*, en la base de datos del “*Human DNA Methylation and Cancer*” (*MethyCancer*), (177,178) se presentan dos sitios CpG con niveles de metilación del 10% y un sitio con 30%, obtenidos de un fragmento de 613 pb con una cobertura de 30 sitios CpG, mediante secuenciación de clones individuales. En contraste con nuestros resultados, para esta región el mayor porcentaje de metilación presente en uno de los 9 sitios CpG analizados fue de $\approx 5\%$, lo cual puede ser indicador de que la región que estamos analizando es suficiente para proporcionar datos de una región de mayor tamaño.

Para *BRCA2*, el estado de metilación de tejido normal (en leucocitos) se ha asociado con el riesgo de cáncer de mama u ovario (179). Nosotros obtuvimos que en *BRCA2* se presentó un nivel de metilación mayor en la muestra de sangre periférica de C1 que en MCF-7, con un porcentaje $<5\%$. En estudios anteriores, se reportaron dos regiones dentro del promotor de *BRCA2* con metilación variable, en las muestras que analizaron de tumor y sangre periférica de pacientes con CM mediante 16 sondas de análisis, presentando valores oscilantes de entre 4.49% y 41.88% (180), esto podría indicar que nuestro método es suficientemente sensible para la detección de patrones de metilación comparados con técnicas de mayor cobertura.

En la región analizada de *CHEK2* obtuvimos mayores niveles de metilación en la muestra de MCF-7 ($>8\%$) comparada con C1 ($<2\%$). En estudios anteriores se han reportado niveles de metilación variables en tres regiones dentro del promotor (180). Contrastando nuestros resultados obtenidos de la línea celular, en MCF-7 no se detectaron alterados los patrones de metilación en un análisis dos islas CpG dentro del promotor de *CHEK2* (181), la diferencia puede deberse a que no se analizó la misma región que en este trabajo.

Los *loci* correspondientes con la región *CHEK2*, presentaron menor porcentaje de lecturas alineadas, con una profundidad de alrededor de 30 lecturas alineadas por base, sin embargo, fue suficiente para el llamado de metilación de sitios CpG individuales, pues se

han reportado cuantificaciones de este tipo de análisis con hasta 10 lecturas por sitio (96,97). Esta región se tomó de una longitud considerablemente grande de 352 pb (recordando que el límite de tamaño es de 400 pb), lo cual fue favorable para el análisis de metilación, pues las lecturas de secuencia más largas se alinean con mayor precisión y aumentan la cobertura en el genoma (72). A pesar de ello, sugerimos que en futuros análisis se realice un rediseño para esta región de *CHEK2*, pues la eficiencia de hibridación fue considerablemente baja comparada con las otras regiones analizadas (ver figura 21).

En el caso de *PALB2*, tres estudios previos han investigado la metilación de una isla CpG ubicada dentro de la región promotora, cada uno dirigido a un sitio diferente dentro de la isla (183–185), los cuales reportaron inconsistencia en sus resultados. La región analizada en este trabajo de *PALB2* no corresponde a ninguna de las anteriores, nuestros resultados indicaron valores de metilación de alrededor del 0.5%. Sin embargo, es necesario ampliar nuestras “n” para concluir sobre el estado de metilación de esta región. Respecto a la línea celular MCF-7, Potapova y colaboradores no observaron metilación de la región promotora de *PALB2*, lo cual corresponde con nuestros resultados, en los que obtuvimos porcentajes bajos de metilación. Lo anterior podría sugerir que la hipermetilación puede ser un mecanismo ausente en la línea celular MCF-7 (183).

Por otra parte, *PTEN* es un importante TSG, la hipermetilación de la isla CpG en el promotor es una ruta para su inactivación, sin embargo, la literatura sobre la hipermetilación de *PTEN* en el cáncer es controversial. Además, la investigación del estado de metilación de la isla CpG es desafiante debido a la homología de secuencia con el pseudogen *PTENP1*. Una característica muy peculiar es que *PTEN* comparte un promotor bidireccional con el gen *KLLN*, al igual que una isla CpG muy grande asociada a dicho promotor (figura 23).

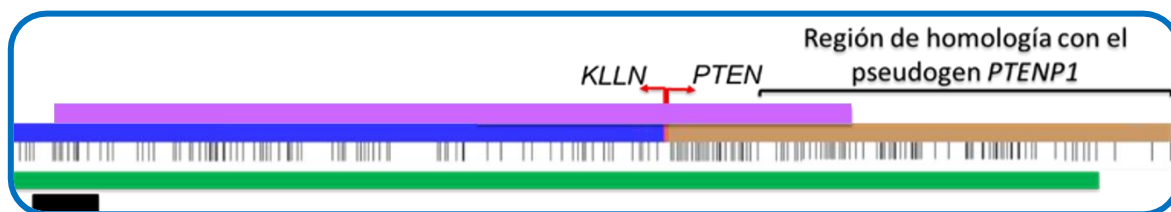


Figura 23. Región promotora en *PTEN*. La caja verde indica la isla CpG, caja morada corresponde al promotor, caja café es *PTEN* y caja azul *KLLN*.

Los resultados obtenidos en la región analizada para *PTEN* llamaron nuestra atención, debido a la hipermetilación que se presentó tanto en la línea celular como en C1, por la ubicación de la región analizada, es posible que presente mayor relación con el gen *KLLN*

que con *PTEN*, y excluya la posibilidad de que la región corresponda al pseudogen *PTENP1*. Se ha reportado que la metilación del promotor bidireccional compartido tiene un impacto diferencial en la transcripción de estos dos genes. Ambos genes están regulados transcripcionalmente por p53, y se ha sugerido que existen dos sitios de unión distintos de este gen, uno para *KLLN* y el otro para *PTEN*. El sitio de unión de p53 para la activación transcripcional de *PTEN*, se encuentra fuera de nuestra región, mientras que el sitio de unión p53 putativo para *KLLN* se encuentra dentro de la región metilada identificada en este estudio (186,187), por lo que sugerimos un rediseño de *primers* considerando las características anteriormente descritas, abarcando otras regiones dentro del promotor.

El gen TSG *KLLN* codifica para la proteína llamada killina y presenta una actividad dependiente de TP53, la metilación del promotor de este gen se ha asociado con características benignas en el Síndrome de Cowden (188), sin embargo, al compartir un promotor bidireccional con *PTEN* presenta una expresión reducida, se sabe que los genes con expresión reducida tienden a ser más probablemente metilados (189), adicionalmente como la función de este gen es inhibir la replicación, esto podría explicar su posible represión transcripcional por el mecanismo de hipermetilación en la muestra analizada de una persona sana (C1), sin embargo, no es posible concluir que la región analizada en *PTEN/KLLN* se encuentra hipermetilada, pues es necesario ampliar la “n” de estudio.

En CM se ha reportado la metilación de la isla CpG ubicada particularmente en el promotor *PTEN* y excluyendo a su pseudogen en 31.1% de casos de muestras tumorales de carcinomas de mama, con pérdida de expresión en un 64.3% (190). Por lo que, sería interesante realizar análisis de expresión de ARN mensajero sobre esta región de la isla CpG del promotor en *PTEN-KLLN*, para conocer el efecto de la posible hipermetilación evidenciada en las dos muestras que se analizaron en este trabajo.

En cuanto a las regiones de los genes de predisposición al cáncer de mama *BRCA2* y *PTEN* estudiados en esta tesis, las investigaciones en la línea celular MCF-7 son reducidas, por lo que no contamos con datos comparativos sobre los patrones de metilación del ADN en esta.

Finalmente, la región analizada en *MLH1* como control (191) fue la que presentó mejor cobertura y exhibió dos sitios CpG hipermetilados, correspondientes a las regiones de hibridación de los *primers*. Biológicamente la región promotora en *MLH1* se ha reportado

con niveles variables de metilación en muestras de CM y otros síndromes como el síndrome de Lynch (180).

Por lo anterior, podemos concluir que nuestros resultados comparados con reportes sobre los análisis de metilación para los promotores de los genes que se evaluaron son correspondientes. Con ello, logramos obtener resultados que indican que nuestra metodología funciona y es idónea para el futuro análisis de lotes de pacientes. En este trabajo nos enfocamos a una enfermedad, el cáncer de mama, pero esta metodología se puede emplear en análisis de otras enfermedades.

10. CONCLUSIONES

El principal enfoque de este trabajo fue la introducción de una nueva metodología sobre regiones promotoras para el desarrollo de estrategias e identificación de causas inductoras a la progresión de enfermedades, como lo es el cáncer de mama. Con las diferentes optimizaciones realizadas, fue posible pulir las técnicas y establecer el flujo de análisis bioinformático de los datos de secuenciación, con ello se logró generar resultados confiables sobre los niveles de metilación en regiones promotoras de cinco genes conductores del cáncer de mama (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* y *PTEN-KLLM*).

Respecto a los objetivos planteados para este trabajo se puede concluir lo siguiente: con los diseños de *primers* específicos de metilación, fue posible la amplificación de las regiones esperadas, mencionando que para *CHEK2* se sugiere rediseñar los *primers* o realizar una limpieza post-secuenciación extra en el análisis bioinformático. Se logró una optimización de la conversión con bisulfito de sodio (porcentaje de recuperación mayor al 60%), con ello, fue posible mapear los estados de metilación de la línea celular MCF-7 y de un individuo sano (C1).

Los resultados obtenidos en la línea celular indicaron porcentajes de metilación coincidentes a lo reportado en la literatura, presentándose niveles mayores de metilación en *BRCA1*, *CHEK2* y *PALB2* en la muestra de MCF-7, en comparación con la muestra de sangre periférica de una persona sana (C1). Además, se logró obtener una sensibilidad metodológica efectiva para detectar patrones de metilación inferiores al 1% y superiores al 90%, por lo cual recomendamos este enfoque y métodos de análisis en futuras investigaciones.

11. PERSPECTIVAS

Este trabajo servirá como base para realizar otras investigaciones sobre las alteraciones epigenéticas en pacientes mexicanas con síndrome hereditario de cáncer de mama y ovario, no obstante, la metodología es aplicable para cualquier otra neoplasia o enfermedad que pueda estar regulada por este mecanismo. Por lo que, adicionalmente se implementará la metodología descrita para el estudio de metilación del ADN de tumores sólidos odontogénicos.

12. REFERENCIAS

1. NIH. ¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. 1980 [citado 16 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
2. Ruddon RW. Cancer Biology [Internet]. Oxford University Press, USA; 2007. 570 p. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/248801/CancerdelaMujer.pdf>
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell [Internet]. 4 de marzo de 2011 [citado 2 de agosto de 2018];144(5):646-74. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>
4. Siddiqui I, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. Ann N Y Acad Sci. 24 de junio de 2015;1348.
5. WHO. Cáncer, un problema a nivel mundial [Internet]. 2018 [citado 16 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.
7. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 1 de marzo de 2015;136(5):E359-386.
8. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods - Ferlay - 2019 - International Journal of Cancer - Wiley Online Library [Internet]. [citado 20 de enero de 2020]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.31937>
9. GLOBOCAN. Cancer today [Internet]. [citado 16 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
10. Breast cancer | Nature Reviews Disease Primers [Internet]. [citado 21 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0111-2>

11. de Santillana-Hernández SP, García-Flores MT, Galván-Oseguera H, Pérez-Rodríguez G, Martínez-Chapaca HD. [Situational diagnosis of cancer care at the Instituto Mexicano del Seguro Social]. *Rev Medica Inst Mex Seguro Soc*. 2017;55(Suppl 3):S222-330.
12. Arguello Y. Cáncer de la Mujer. :17. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/248801/CancerdelaMujer.pdf>
13. Breastcancer.org - Información sobre el cáncer de mama en español [Internet]. Breastcancer.org. 2018 [citado 23 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.breastcancer.org/es>
14. Wu S, Zhu W, Thompson P, Hannun YA. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun* [Internet]. 28 de agosto de 2018 [citado 13 de febrero de 2021];9(1):1-12. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05467-z>
15. breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf [Internet]. [citado 29 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>
16. DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology / [edited by] Vincent T. DeVita, Jr., Theodore S. Lawrence, Steven A. Rosenberg.
17. Modifiers of risk of hereditary breast cancer. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 29 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998497>
18. Ngeow J, Sesock K, Eng C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat*. agosto de 2017;165(1):1-8.
19. Nevanlinna H, Bartek J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene* [Internet]. septiembre de 2006 [citado 17 de noviembre de 2020];25(43):5912-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/1209877>
20. Gallardo-Alvarado LN, Tusié-Luna MT, Tussió-Luna MI, Díaz-Chávez J, Segura YX, Bargallo-Rocha E, et al. Prevalence of germline mutations in the TP53 gene in patients with early-onset breast cancer in the Mexican population. *BMC Cancer* [Internet]. 1 de febrero de 2019 [citado 16 de noviembre de 2020];19(1):118. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5312-2>
21. Quezada Urban R, Díaz Velásquez CE, Gitler R, Rojo Castillo MP, Sirota Toporek M, Figueroa Morales A, et al. Comprehensive Analysis of Germline Variants in Mexican Patients with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Susceptibility. *Cancers*. 27 de septiembre de 2018;10(10).
22. Factores de riesgo: Hormonas - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [citado 30 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/hormonas>
23. Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 30 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023992>

24. WHO. Cáncer [Internet]. 2018 [citado 29 de agosto de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
25. Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 1 de junio de 2006 [citado 1 de septiembre de 2020];13(2):279-92. Disponible en: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/13/2/0130279.xml>
26. Borrego-Soto G, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2015 [citado 17 de noviembre de 2020];38(4):420-32. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4763322/>
27. Factores de riesgo: Radiación - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [citado 30 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/radiacion>
28. Archived Monthly Oncology Tumor Boards: A Multidisciplinary Approach to Individualized Patient Care - Breast Cancer: Advanced Disease | NCCN Continuing Education [Internet]. [citado 22 de enero de 2020]. Disponible en: <https://education.nccn.org/node/49255>
29. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth Edition - WHO - OMS - [Internet]. [citado 28 de enero de 2020]. Disponible en: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4004&content=1>
30. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. octubre de 2012 [citado 17 de noviembre de 2020];490(7418):61-70. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature11412>
31. Kalecky K, Modisette R, Pena S, Cho Y-R, Taube J. Integrative analysis of breast cancer profiles in TCGA by TNBC subgrouping reveals novel microRNA-specific clusters, including miR-17-92a, distinguishing basal-like 1 and basal-like 2 TNBC subtypes. *BMC Cancer* [Internet]. 21 de febrero de 2020 [citado 17 de noviembre de 2020];20(1):141. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6600-6>
32. Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, et al. Multiplatform Analysis of 12 Cancer Types Reveals Molecular Classification within and across Tissues of Origin. *Cell* [Internet]. agosto de 2014 [citado 31 de enero de 2020];158(4):929-44. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414008769>
33. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 22 de enero de 2019;321(3):288-300.
34. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* [Internet]. 22 de enero de 2019 [citado 24 de enero de 2020];321(3):288. Disponible en: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2018.19323>

35. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science* [Internet]. 29 de marzo de 2013 [citado 1 de marzo de 2020];339(6127):1546-58. Disponible en: <https://science.sciencemag.org/content/339/6127/1546>
36. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. Mol Cell Biol 4th Ed* [Internet]. 2000 [citado 13 de septiembre de 2020]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/>
37. Waks Z, Weissbrod O, Carmeli B, Norel R, Utro F, Goldschmidt Y. Driver gene classification reveals a substantial overrepresentation of tumor suppressors among very large chromatin-regulating proteins. *Sci Rep* [Internet]. 23 de diciembre de 2016 [citado 28 de febrero de 2020];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5180091/>
38. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* [Internet]. marzo de 2006 [citado 10 de marzo de 2020];6(3):184-92. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrc1819>
39. Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de febrero de 2011;17(3):401-5.
40. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* noviembre de 2004;95(11):866-71.
41. Buisson R, Dion-Côté A-M, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, et al. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. octubre de 2010 [citado 10 de marzo de 2020];17(10):1247. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4094107/>
42. Hereditary Breast Cancer | Annual Review of Medicine [Internet]. [citado 21 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.49.1.425>
43. Piffer A, Luporsi E, Mathelin C. [PALB2, a major susceptibility gene for breast cancer]. *Gynecol Obstet Fertil Senol.* noviembre de 2018;46(10-11):701-5.
44. Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de febrero de 2016;97:41-55.
45. Foulkes WD. Inherited Susceptibility to Common Cancers. *N Engl J Med* [Internet]. 13 de noviembre de 2008 [citado 27 de agosto de 2018];359(20):2143-53. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0802968>
46. Catana A, Apostu AP, Antemie R-G. Multi gene panel testing for hereditary breast cancer - is it ready to be used? *Med Pharm Rep.* julio de 2019;92(3):220-5.

47. Hesson LB, Hitchins MP, Ward RL. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 1 de junio de 2010 [citado 4 de marzo de 2020];20(3):290-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X10000304>
48. Wolffe AP. Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* [Internet]. 15 de octubre de 1999 [citado 2 de agosto de 2018];286(5439):481-6. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.286.5439.481>
49. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. 2019;571(7766):489-99.
50. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 1 de junio de 2010 [citado 2 de marzo de 2020];20(3):290-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X10000304>
51. Gräff J, Mansuy IM. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behav Brain Res*. 1 de septiembre de 2008;192(1):70-87.
52. Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Ngollo M, Penault-Llorca F, Pajon A, et al. Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics*. 2014;6(6):651-64.
53. Nickel A, Stadler SC. Role of epigenetic mechanisms in epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Transl Res J Lab Clin Med*. enero de 2015;165(1):126-42.
54. Yuqing Yang A, Kim H, Li W, Tony Kong A-N. Natural compound-derived epigenetic regulators targeting epigenetic readers, writers and erasers. *Curr Top Med Chem*. 1 de marzo de 2016;16(7):697-713.
55. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 23 de enero de 2004;116(2):259-72.
56. Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Curr Opin Chem Biol*. 2019;51:11-7.
57. Ak M, Rp N, M B, Tj B, C D, Sd F, et al. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* [Internet]. 1 de julio de 2010 [citado 5 de octubre de 2020];466(7303):253-7. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/20613842>
58. Doerfler W, Böhm P. *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*. Springer Science & Business Media; 2006. 291 p.
59. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 de septiembre de 2016;8(9).
60. Smith KS, Liu LL, Ganesan S, Michor F, De S. Nuclear topology modulates the mutational landscapes of cancer genomes. *Nat Struct Mol Biol*. noviembre de 2017;24(11):1000-6.

61. Morey L, Helin K. Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem Sci.* junio de 2010;35(6):323-32.
62. Kingston RE, Tamkun JW. Transcriptional Regulation by Trithorax-Group Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. octubre de 2014 [citado 7 de octubre de 2020];6(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176006/>
63. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* [Internet]. 23 de febrero de 2007 [citado 7 de octubre de 2020];128(4):693-705. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(07\)00184-5](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(07)00184-5)
64. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* enero de 2009;10(1):32-42.
65. Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstine JR, Wang JK, Chen S, et al. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* 11 de octubre de 2007;449(7163):689-94.
66. Berlowitz L, Pallotta D. Acetylation of nuclear protein in the heterochromatin and euchromatin of mealy bugs. *Exp Cell Res* [Internet]. 1 de marzo de 1972 [citado 7 de octubre de 2020];71(1):45-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482772902613>
67. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, et al. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(21):6823-36.
68. Douvlataniotis K, Bensberg M, Lentini A, Gylemo B, Nestor CE. No evidence for DNA N6-methyladenine in mammals. *Sci Adv.* 2020;6(12):eaay3335.
69. McCleary-Wheeler AL, Lomberk GA, Weiss FU, Schneider G, Fabbri M, Poshusta TL, et al. Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Lett.* 28 de enero de 2013;328(2):212-21.
70. Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and Human Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2 de enero de 2016 [citado 4 de marzo de 2020];8(2):a019497. Disponible en: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/8/2/a019497>
71. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* [Internet]. agosto de 2008 [citado 13 de marzo de 2020];454(7205):766-70. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature07107>
72. Zhang Y, Jeltsch A. The Application of Next Generation Sequencing in DNA Methylation Analysis. *Genes* [Internet]. 4 de junio de 2010 [citado 14 de marzo de 2020];1(1):85-101. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3960863/>
73. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*

- [Internet]. noviembre de 2009 [citado 17 de marzo de 2020];462(7271):315-22. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature08514>
74. Van den Veyver IB. Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:255-82.
 75. Zeisel SH. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health outcomes. *Am J Clin Nutr.* mayo de 2009;89(5):1488S-1493S.
 76. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 29 de octubre de 1999;99(3):247-57.
 77. Yokochi T, Robertson KD. Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J Biol Chem.* 5 de abril de 2002;277(14):11735-45.
 78. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* [Internet]. 1 de enero de 2002 [citado 19 de agosto de 2020];16(1):6-21. Disponible en: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.947102>
 79. Silverman BR, Shi J. Alterations of Epigenetic Regulators in Pancreatic Cancer and Their Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 19 de diciembre de 2016;17(12).
 80. Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet.* octubre de 2012;13(10):705-19.
 81. He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science.* 2 de septiembre de 2011;333(6047):1303-7.
 82. Guo F, Li X, Liang D, Li T, Zhu P, Guo H, et al. Active and Passive Demethylation of Male and Female Pronuclear DNA in the Mammalian Zygote. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2 de octubre de 2014 [citado 10 de marzo de 2020];15(4):447-59. Disponible en: [https://www.cell.com/cell-stem-cell/abstract/S1934-5909\(14\)00341-5](https://www.cell.com/cell-stem-cell/abstract/S1934-5909(14)00341-5)
 83. Zd S, Mm C, Kc H, R K, S M, A R, et al. DNA Methylation Dynamics of the Human Preimplantation Embryo [Internet]. Vol. 511, *Nature.* Nature; 2014 [citado 17 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25079558/>
 84. Sanz LA, Kota SK, Feil R. Genome-wide DNA demethylation in mammals. *Genome Biol* [Internet]. 2010 [citado 8 de octubre de 2020];11(3):110. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2864560/>
 85. Smallwood SA, Tomizawa S-I, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, et al. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet.* 26 de junio de 2011;43(8):811-4.
 86. Huang Y, Liu H, Du H, Zhang W, Kang X, Luo Y, et al. Developmental features of DNA methylation in CpG islands of human gametes and preimplantation embryos. *Exp Ther Med* [Internet]. 1 de junio de 2019 [citado 7 de octubre de 2020];17(6):4447-56.

Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.7523/abstract>

87. McCabe DC, Caudill MA. DNA methylation, genomic silencing, and links to nutrition and cancer. *Nutr Rev.* junio de 2005;63(6 Pt 1):183-95.
88. Wa F, E G, Be B. Epigenetic Plasticity and the Hallmarks of Cancer [Internet]. Vol. 357, *Science* (New York, N.Y.). *Science*; 2017 [citado 18 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28729483/>
89. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* [Internet]. enero de 2006 [citado 4 de marzo de 2020];94(2):179-83. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/6602918>
90. Kim Y-I. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* abril de 2004;13(4):511-9.
91. Morgan AE, Davies TJ, Mc Auley MT. The role of DNA methylation in ageing and cancer. *Proc Nutr Soc.* 2018;77(4):412-22.
92. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol* [Internet]. 31 de enero de 2015 [citado 8 de octubre de 2020];13(1):7. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0118-4>
93. Meehan RR, Thomson JP, Lentini A, Nestor CE, Pennings S. DNA methylation as a genomic marker of exposure to chemical and environmental agents. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 1 de agosto de 2018 [citado 8 de octubre de 2020];45:48-56. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593117302065>
94. Hesson LB, Hitchins MP, Ward RL. Epimutations and cancer predisposition: importance and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev.* junio de 2010;20(3):290-8.
95. Sloane MA, Ward RL, Hesson LB. Defining the criteria for identifying constitutional epimutations. *Clin Epigenetics* [Internet]. 18 de abril de 2016 [citado 17 de septiembre de 2020];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835913/>
96. Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith–Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2 de abril de 2003 [citado 23 de octubre de 2020];12(suppl_1):R61-8. Disponible en: https://academic.oup.com/hmg/article/12/suppl_1/R61/784232
97. Kim Y, Wang SE, Jiang Y. Epigenetic therapy of Prader–Willi syndrome. *Transl Res* [Internet]. 1 de junio de 2019 [citado 23 de octubre de 2020];208:105-18. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931524419300489>
98. Stöger R, Kajimura TM, Brown WT, Laird CD. Epigenetic variation illustrated by DNA methylation patterns of the fragile-X gene FMR1. *Hum Mol Genet.* octubre de 1997;6(11):1791-801.

99. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 9 de noviembre de 2000;343(19):1350-4.
100. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen S-S, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell.* 1 de junio de 2007;129(5):879-90.
101. Westerman K, Sebastiani P, Jacques P, Liu S, DeMeo D, Ordovás JM. DNA methylation modules associate with incident cardiovascular disease and cumulative risk factor exposure. *Clin Epigenetics* [Internet]. diciembre de 2019 [citado 19 de agosto de 2020];11(1):142. Disponible en: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0705-2>
102. Zhong Jia, Agha Golareh, Baccarelli Andrea A. The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease. *Circ Res* [Internet]. 8 de enero de 2016 [citado 19 de agosto de 2020];118(1):119-31. Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/circresaha.115.305206>
103. Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature.* 22 de 2018;555(7697):469-74.
104. Venkataramani V, Tanev DI, Strahle C, Studier-Fischer A, Fankhauser L, Kessler T, et al. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature.* 2019;573(7775):532-8.
105. Suter CM, Martin DIK, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* mayo de 2004;36(5):497-501.
106. Morak M, Schackert HK, Rahner N, Betz B, Ebert M, Walldorf C, et al. Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with MLH1 promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC. *Eur J Hum Genet EJHG.* julio de 2008;16(7):804-11.
107. Chan TL, Yuen ST, Kong CK, Chan YW, Chan ASY, Ng WF, et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet.* octubre de 2006;38(10):1178-83.
108. Sloane MA, Nunez AC, Packham D, Kwok C-T, Suthers G, Hesson LB, et al. Mosaic Epigenetic Inheritance as a Cause of Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* octubre de 2015;1(7):953-7.
109. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* abril de 2003;3(4):253-66.
110. Tang WWC, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, Floros VI, Bradshaw CR, et al. A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell* [Internet]. 4 de junio de 2015 [citado 31 de julio de 2020];161(6):1453-67. Disponible en: [https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(15\)00564-4](https://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(15)00564-4)

111. Yates LR, Gerstung M, Knappskog S, Desmedt C, Gundem G, Van Loo P, et al. Subclonal diversification of primary breast cancer revealed by multiregion sequencing. *Nat Med.* julio de 2015;21(7):751-9.
112. Lønning PE, Eikesdal HP, Løes IM, Knappskog S. Constitutional Mosaic Epimutations - a hidden cause of cancer? *Cell Stress* [Internet]. [citado 4 de marzo de 2020];3(4):118-35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6551830/>
113. Mapping genetic alterations causing chemoresistance in cancer: identifying the roads by tracking the drivers | *Oncogene* [Internet]. [citado 11 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/onc201348>
114. Sloane MA, Ward RL, Hesson LB. Defining the criteria for identifying constitutional epimutations. *Clin Epigenetics* [Internet]. diciembre de 2016 [citado 11 de marzo de 2020];8(1):39. Disponible en: <http://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-016-0207-4>
115. Hernández HG, Tse MY, Pang SC, Arboleda H, Forero DA. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *BioTechniques.* octubre de 2013;55(4):181-97.
116. Rodríguez Dorantes M, Téllez Ascencio N, Cerbón MA, López M, Cervantes A. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Investig Clínica* [Internet]. febrero de 2004 [citado 17 de marzo de 2020];56(1):56-71. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-83762004000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
117. BRCA1 Promoter Methylation in Peripheral Blood DNA of Mutation Negative Familial Breast Cancer Patients With a BRCA1 Tumour Phenotype - PubMed [Internet]. [citado 11 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18269736-brca1-promoter-methylation-in-peripheral-blood-dna-of-mutation-negative-familial-breast-cancer-patients-with-a-brca1-tumour-phenotype/>
118. Dobrovic A, Kristensen LS. DNA methylation, epimutations and cancer predisposition. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. enero de 2009 [citado 11 de marzo de 2020];41(1):34-9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272508003853>
119. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 15 de abril de 2001;61(8):3225-9.
120. Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* [Internet]. 3 de julio de 2008 [citado 26 de febrero de 2020];642(1):1-13. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510708000614>
121. Borchiellini M, Ummarino S, Di Ruscio A. The Bright and Dark Side of DNA Methylation: A Matter of Balance. *Cells.* 12 de 2019;8(10).

122. GUERRERO-PRESTON R, HADAR T, OSTROW KL, SOUDRY E, ECHENIQUE M, ILI-GANGAS C, et al. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol Rep* [Internet]. agosto de 2014 [citado 20 de agosto de 2020];32(2):505-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4091885/>
123. Han L-L, Hou L, Zhou M-J, Ma Z, Lin D-L, Wu L, et al. Aberrant NDRG1 methylation associated with its decreased expression and clinicopathological significance in breast cancer. *J Biomed Sci* [Internet]. 30 de julio de 2013 [citado 20 de agosto de 2020];20(1):52. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3751627/>
124. Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, et al. Constitutional Methylation of the BRCA1 Promoter Is Specifically Associated with BRCA1 Mutation-Associated Pathology in Early-Onset Breast Cancer. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* [Internet]. 1 de enero de 2011 [citado 10 de marzo de 2020];4(1):23-33. Disponible en: <http://cancerpreventionresearch.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0212>
125. Iwamoto T, Yamamoto N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. BRCA1 promoter methylation in peripheral blood cells is associated with increased risk of breast cancer with BRCA1 promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. agosto de 2011 [citado 10 de marzo de 2020];129(1):69-77. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-010-1188-1>
126. Evans DGR, van Veen EM, Byers HJ, Wallace AJ, Ellingford JM, Beaman G, et al. A Dominantly Inherited 5' UTR Variant Causing Methylation-Associated Silencing of BRCA1 as a Cause of Breast and Ovarian Cancer. *Am J Hum Genet*. 02 de 2018;103(2):213-20.
127. Gupta S, Jaworska-Bieniek K, Narod SA, Lubinski J, Wojdacz TK, Jakubowska A. Methylation of the BRCA1 promoter in peripheral blood DNA is associated with triple-negative and medullary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. diciembre de 2014 [citado 10 de marzo de 2020];148(3):615-22. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-014-3179-0>
128. Prajzendanc K, Domagała P, Hybiak J, Ryś J, Huzarski T, Szwiec M, et al. *BRCA1* promoter methylation in peripheral blood is associated with the risk of triple-negative breast cancer. *Int J Cancer* [Internet]. marzo de 2020 [citado 10 de marzo de 2020];146(5):1293-8. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.32655>
129. Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE. Nucleic Acid Reactivity and Conformation II. REACTION OF CYTOSINE AND URACIL WITH SODIUM BISULFITE. *J Biol Chem* [Internet]. 6 de octubre de 1973 [citado 2 de agosto de 2018];248(11):4060-4. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/248/11/4060>
130. Harrison A, Parle-McDermott A. DNA Methylation: A Timeline of Methods and Applications. *Front Genet* [Internet]. 25 de octubre de 2011 [citado 26 de febrero de 2020];2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3268627/>

131. Wreczycka K, Godschan A, Yusuf D, Grüning B, Assenov Y, Akalin A. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. *J Biotechnol* [Internet]. 10 de noviembre de 2017 [citado 2 de marzo de 2020];261:105-15. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617315936>
132. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* [Internet]. agosto de 2005 [citado 2 de marzo de 2020];37(8):853-62. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ng1598>
133. Brinkman AB, Simmer F, Ma K, Kaan A, Zhu J, Stunnenberg HG. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* [Internet]. 1 de noviembre de 2010 [citado 2 de marzo de 2020];52(3):232-6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202310001660>
134. Análisis de metilación de ADN libre de células plasmáticas para la detección temprana del cáncer de mama mediante la secuenciación de bisulfito de próxima generación | SpringerLink [Internet]. [citado 22 de enero de 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-016-5190-z>
135. Serre D, Lee BH, Ting AH. MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1 de enero de 2010 [citado 6 de marzo de 2020];38(2):391-9. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/38/2/391/2409778>
136. Li J, Gao F, Li N, Li S, Yin G, Tian G, et al. An improved method for genome wide DNA methylation profiling correlated to transcription and genomic instability in two breast cancer cell lines. *BMC Genomics* [Internet]. 13 de mayo de 2009 [citado 6 de marzo de 2020];10(1):223. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-223>
137. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, et al. Conserved Role of Intragenic DNA Methylation in Regulating Alternative Promoters. *Nature* [Internet]. 8 de julio de 2010 [citado 6 de marzo de 2020];466(7303):253-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3998662/>
138. pubmeddev, al CS et. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 6 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18278030>
139. Krueger F, Kreck B, Franke A, Andrews SR. DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nat Methods* [Internet]. febrero de 2012 [citado 2 de marzo de 2020];9(2):145-51. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1828>
140. Scott CM, Joo JE, O'Callaghan N, Buchanan DD, Clendenning M, Giles GG, et al. Methylation of Breast Cancer Predisposition Genes in Early-Onset Breast Cancer: Australian Breast Cancer Family Registry. Toland AE, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 30 de noviembre de 2016 [citado 10 de marzo de 2020];11(11):e0165436. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0165436>

141. Dobrovic A. White Blood Cell *BRCA1* Promoter Methylation Status and Ovarian Cancer Risk: A Perspective. *Ann Intern Med* [Internet]. 6 de marzo de 2018 [citado 2 de agosto de 2018];168(5):365. Disponible en: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/M17-3340>
142. Butler GH, Kotani H, Kong L, Frick M, Evancho S, Stanbridge EJ, et al. Identification and characterization of proteinase K-resistant proteins in members of the class Mollicutes. *Infect Immun.* marzo de 1991;59(3):1037-42.
143. Lc L, R D. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs [Internet]. Vol. 18, *Bioinformatics* (Oxford, England). *Bioinformatics*; 2002 [citado 17 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12424112/>
144. Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 21 de octubre de 2011 [citado 2 de agosto de 2018];(56). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3227193/>
145. MethPrimer: Designing Primers for Methylation PCRs - PubMed [Internet]. [citado 24 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12424112-methprimer-designing-primers-for-methylation-pcrs/>
146. Wang RY-H, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 24 de octubre de 1980 [citado 9 de marzo de 2020];8(20):4777-90. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/8/20/4777/2381108>
147. Bermúdez GP. *Biología molecular: ADN recombinante y sus aplicaciones*. Editorial El Manual Moderno Colombia S.A.S.; 2019. 251 p.
148. [quantifluor-dsdna-system-protocol.pdf](https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/quantifluor-dsdna-system-protocol.pdf) [Internet]. [citado 9 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/quantifluor-dsdna-system-protocol.pdf>
149. PhiX Sequencing Control V3 [Internet]. [citado 13 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/phix-control-v3.html>
150. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 6 de noviembre de 2008;456(7218):53-9.
151. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* [Internet]. 4 de marzo de 2009 [citado 1 de marzo de 2020];10(3):R25. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>
152. Objective and Comprehensive Evaluation of Bisulfite Short Read Mapping Tools [Internet]. [citado 2 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/abi/2014/472045/>
153. Krueger F, Andrews SR. Quality Control, trimming and alignment of Bisulfite-Seq data (Prot 57). :13.

154. Dustin R Masser ,Ar. Focused, High Accuracy 5-methylcytosine Quantitation With Base Resolution by Benchtop Next-Generation Sequencing - PubMed [Internet]. 2013 [citado 13 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24279302-focused-high-accuracy-5-methylcytosine-quantitation-with-base-resolution-by-benchtop-next-generation-sequencing/>
155. Suman Lee, Joomyeong Kim. NGS-based deep bisulfite sequencing - ScienceDirect [Internet]. 2015 [citado 11 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215016115000631>
156. Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, Mizushima-Sugano J, Hata H, Ota T, et al. Identification and Characterization of the Potential Promoter Regions of 1031 Kinds of Human Genes. *Genome Res* [Internet]. 1 de mayo de 2001 [citado 11 de febrero de 2020];11(5):677-84. Disponible en: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.1640R>
157. Chatterjee A, Rodger EJ, Eccles MR. Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 1 de agosto de 2018 [citado 18 de noviembre de 2020];51:149-59. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X17300536>
158. Chrysanthia A. Leontiou, 1 Michael D. Hadjidaniel, 1 Petros Mina, 1 Pavlos Antoniou, 2 Marios Ioannides, 1 and Philippos C. Patsalis. Bisulfite Conversion of DNA: Performance Comparison of Different Kits and Methylation Quantitation of Epigenetic Biomarkers that Have the Potential to Be Used in Non-Invasive Prenatal Testing [Internet]. 2015 [citado 12 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527772/>
159. Holmes EE, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, et al. Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine. *PLOS ONE* [Internet]. 3 de abril de 2014 [citado 13 de marzo de 2020];9(4):e93933. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093933>
160. Bisulfite Beginner Guide [Internet]. ZYMO RESEARCH. [citado 13 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.zymoresearch.com/pages/bisulfite-beginner-guide>
161. Kaur G, Dufour JM. Cell lines. *Spermatogenesis* [Internet]. 1 de enero de 2012 [citado 21 de noviembre de 2020];2(1):1-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341241/>
162. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet* [Internet]. marzo de 2010 [citado 16 de marzo de 2020];11(3):191-203. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg2732>
163. Li W, Li Q, Kang S, Same M, Zhou Y, Sun C, et al. CancerDetector: ultrasensitive and non-invasive cancer detection at the resolution of individual reads using cell-free DNA methylation sequencing data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 6 de septiembre de 2018 [citado 21 de noviembre de 2020];46(15):e89-e89. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/46/15/e89/5036349>

164. Serre D, Lee BH, Ting AH. MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1 de enero de 2010 [citado 17 de marzo de 2020];38(2):391-9. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/38/2/391/2409778>
165. Do H, Wong NC, Murone C, John T, Solomon B, Mitchell PL, et al. A critical re-assessment of DNA repair gene promoter methylation in non-small cell lung carcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 26 de febrero de 2014 [citado 17 de marzo de 2020];4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3935198/>
166. Krawczyk B, Rudnicka K, Fabianowska-Majewska K. The Effects of Nucleoside Analogues on Promoter Methylation of Selected Tumor Suppressor Genes in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* [Internet]. 26 de noviembre de 2007 [citado 17 de marzo de 2020];26(8-9):1043-6. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15257770701509594>
167. Singh KP, Treas J, Tyagi T, Gao W. DNA demethylation by 5-aza-2-deoxycytidine treatment abrogates 17 beta-estradiol-induced cell growth and restores expression of DNA repair genes in human breast cancer cells. *Cancer Lett* [Internet]. 1 de marzo de 2012 [citado 17 de marzo de 2020];316(1):62-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383511006392>
168. Papoutsis AJ, Borg JL, Selmin OI, Romagnolo DF. BRCA-1 promoter hypermethylation and silencing induced by the aromatic hydrocarbon receptor-ligand TCDD are prevented by resveratrol in MCF-7 Cells. *J Nutr Biochem* [Internet]. 1 de octubre de 2012 [citado 17 de marzo de 2020];23(10):1324-32. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286311002385>
169. Hamadneh L, Al-Majawleh M, Jarrar Y, Shraim S, Hasan M, Abu-Irmaileh B. Culturing conditions highly affect DNA methylation and gene expression levels in MCF7 breast cancer cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. mayo de 2018;54(5):331-4.
170. Selmin OI, Donovan MG, Skovan B, Paine-Murieta GD, Romagnolo DF. Arsenic-induced BRCA1 CpG promoter methylation is associated with the downregulation of ER α and resistance to tamoxifen in MCF7 breast cancer cells and mouse mammary tumor xenografts. *Int J Oncol* [Internet]. 1 de marzo de 2019 [citado 17 de marzo de 2020];54(3):869-78. Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2019.4687/abstract>
171. Hamadneh L, Al-Majawleh M, Jarrar Y, Shraim S, Hasan M, Abu-Irmaileh B. Culturing conditions highly affect DNA methylation and gene expression levels in MCF7 breast cancer cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. mayo de 2018;54(5):331-4.
172. Kwist K, Bridges WC, Burg KJL. The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology* [Internet]. 1 de agosto de 2016 [citado 17 de marzo de 2020];68(4):1661-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9883-8>

173. Wreczycka K, Godschan A, Yusuf D, Grüning B, Assenov Y, Akalin A. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. *J Biotechnol*. 10 de noviembre de 2017;261:105-15.
174. Peplonska B, Bukowska A, Wieczorek E, Przybek M, Zienolddiny S, Reszka E. Rotating night work, lifestyle factors, obesity and promoter methylation in BRCA1 and BRCA2 genes among nurses and midwives. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178792.
175. Lonning PE. BRCA1 | *Annals of Internal Medicine* | American College of Physicians [Internet]. 2018 [citado 11 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://annals.org/aim/article-abstract/2669848/white-blood-cell-brca1-promoter-methylation-status-ovarian-cancer-risk>
176. Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, et al. Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev Res Phila Pa*. enero de 2011;4(1):23-33.
177. Methylation Report [Internet]. [citado 27 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://methycancer.psych.ac.cn/methylationDetail.do?id=168218>
178. He X, Chang S, Zhang J, Zhao Q, Xiang H, Kusonmano K, et al. MethyCancer: the database of human DNA methylation and cancer. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1 de enero de 2008 [citado 27 de noviembre de 2020];36(suppl_1):D836-41. Disponible en: https://academic.oup.com/nar/article/36/suppl_1/D836/2505857
179. Lønning PE, Eikesdal HP, Løes IM, Knappskog S. Constitutional Mosaic Epimutations - a hidden cause of cancer? *Cell Stress* [Internet]. 2019 [citado 17 de marzo de 2020];3(4):118-35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6551830/>
180. Scott CM, Joo JE, O'Callaghan N, Buchanan DD, Clendenning M, Giles GG, et al. Methylation of Breast Cancer Predisposition Genes in Early-Onset Breast Cancer: Australian Breast Cancer Family Registry. *PLOS ONE* [Internet]. 30 de noviembre de 2016 [citado 9 de marzo de 2020];11(11):e0165436. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0165436>
181. Williams LH, Choong D, Johnson SA, Campbell IG. Genetic and Epigenetic Analysis of CHEK2 in Sporadic Breast, Colon, and Ovarian Cancers. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1 de diciembre de 2006 [citado 31 de diciembre de 2020];12(23):6967-72. Disponible en: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/12/23/6967>
182. Zhang Y, Jeltsch A. The Application of Next Generation Sequencing in DNA Methylation Analysis. *Genes* [Internet]. 4 de junio de 2010 [citado 16 de marzo de 2020];1(1):85-101. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3960863/>
183. Potapova A, Hoffman AM, Godwin AK, Al-Saleem T, Cairns P. Promoter Hypermethylation of the PALB2 Susceptibility Gene in Inherited and Sporadic Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 15 de febrero de 2008 [citado 7 de marzo

de 2020];68(4):998-1002. Disponible en:
<https://cancerres.aacrjournals.org/content/68/4/998>

184. Mikeska T, Alsop K, Australian Ovarian Cancer Study Group, Mitchell G, Bowtell DD, Dobrovic A. No evidence for PALB2 methylation in high-grade serous ovarian cancer. *J Ovarian Res* [Internet]. 2013 [citado 9 de marzo de 2020];6(1):26. Disponible en: <http://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-2215-6-26>
185. Poupouridou N, Acha-Sagredo A, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Chatziioannidou I, Lianidou E, et al. Development and validation of molecular methodologies to assess PALB2 expression in sporadic breast cancer. *Clin Biochem* [Internet]. 1 de febrero de 2016 [citado 9 de marzo de 2020];49(3):253-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912015004750>
186. Bennett KL, Mester J, Eng C. Germline Epigenetic Regulation of KILLIN in Cowden and Cowden-like Syndrome. *JAMA* [Internet]. 22 de diciembre de 2010 [citado 26 de febrero de 2020];304(24):2724-31. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/187115>
187. Jelovac D, Park BH. PTEN Promoter Silencing and Cowden Syndrome: The Role of Epigenetic Regulation of KILLIN. *JAMA* [Internet]. 22 de diciembre de 2010 [citado 17 de marzo de 2020];304(24):2744-5. Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/187097>
188. Nizialek EA, Mester JL, Dhiman VK, Smiraglia DJ, Eng C. KLLN epigenotype–phenotype associations in Cowden syndrome. *Eur J Hum Genet* [Internet]. octubre de 2015 [citado 9 de octubre de 2020];23(11):1538-43. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ejhg20158>
189. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond | *Nature Reviews Genetics* [Internet]. [citado 9 de octubre de 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg3230>
190. Zhang H-Y, Liang F, Jia Z-L, Song S-T, Jiang Z-F. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. *Oncol Lett*. julio de 2013;6(1):161-8.
191. D5015.pdf [Internet]. [citado 17 de marzo de 2020]. Disponible en: <http://www.biocenter.hu/pdf/D5015.PDF>

13. ANEXOS

ANEXO 1. LINEA DEL TIEMPO DE TÉCNICAS PARA EL ANALISIS DE METILACIÓN

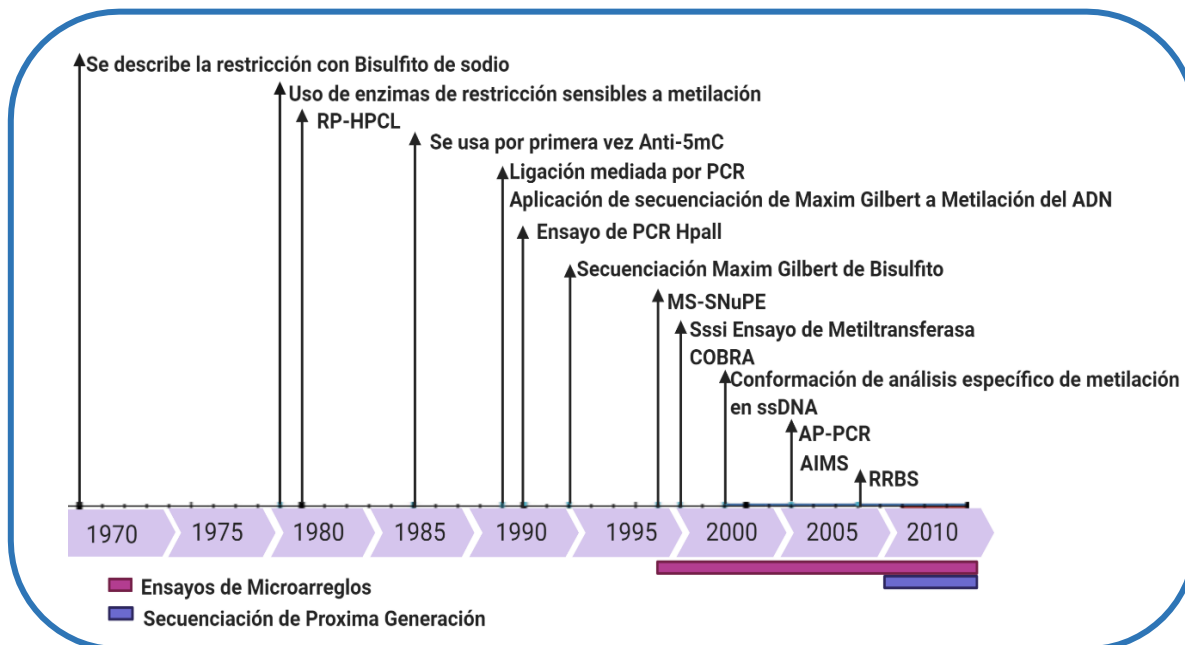


Figura A. Línea del tiempo de las técnicas para análisis de metilación del ADN (Modificada de Harrison y Perle, 2011 (130)).

ANEXO 2. Diseño general de *primers*.

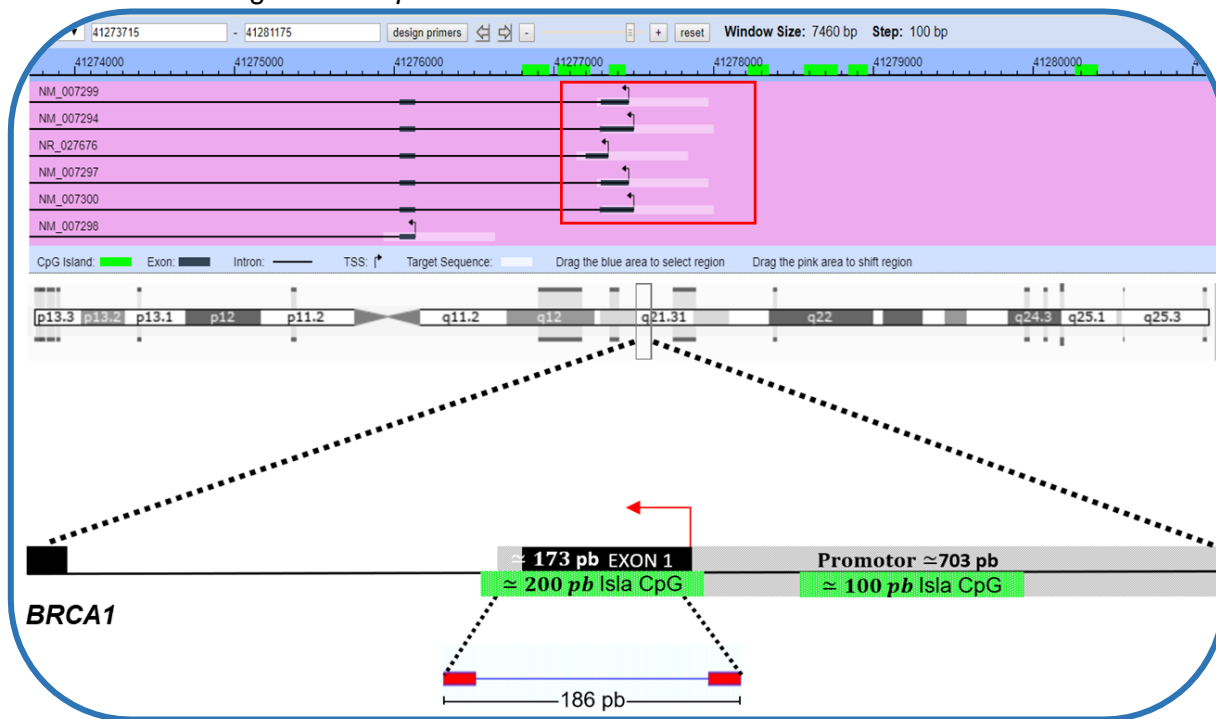


Figura B. Diseño general de cebadores específicos de metilación. Ejemplo de diseño de *primers* para *BRCA1* dentro de la región promotora.

ANEXO 3. Diseños de *primers* para *CHEK2*

NOMBRE	SECUENCIA	Tm	TAMAÑO PRIMER	CpG	TAMAÑO DE PRODUCTO
CHEK2_BSP_FWD_02	GTTTTTTTTTGGGAATTTTTGT	56.5	22	9	159
CHEK2_BSP_REV_02	CCCAACCAATCAACAACATTA	58.3	21		
CHEK2_BSP_FWD_03	TTAGATTAATGTTGTTGATTGGTTG	57.3	25	5	115
CHEK2_BSP_REV_03	CCTCAATACCTCCTAAAAATTA	52.4	22		
CHEK2_BSP_FWD_04	TTTTTTTTTGGGAATTTTTGT	54.1	20	9	157
CHEK2_BSP_REV_04	CCCAACCAATCAACAACATTA	58.3	21		

ANEXO 4. Purificación por perlas Ampure XP.

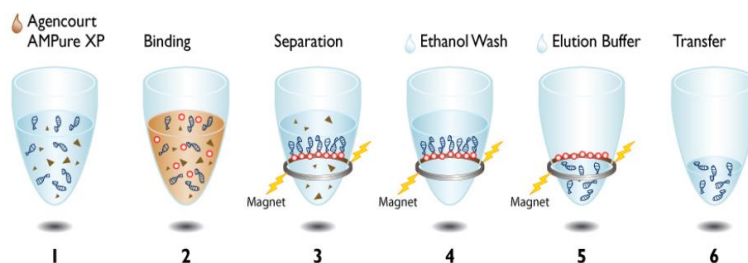


Figura C. Proceso de purificación de productos de PCR mediante perlas magnéticas.

ANEXO 5. Resultados de Secuenciación

Tabla 1. Resultados de análisis diferencial sitio específico CpG dentro de la región promotora en el gen *MLH1*.

<i>MLH1</i> MCF-7			
Sitio CpG	Metilado	Cobertura	Porcentaje
1	5090	5092	99.96
2	22	5082	0.43
3	36	5075	0.71
4	20	5073	0.39
5	67	5093	1.32
6	12	5087	0.24
7	17	5080	0.33
8	33	5097	0.65
9	44	5069	0.87
10	49	5058	0.97
11	18	5066	0.36
12	25	5052	0.49
13	40	5050	0.79
14	21	5044	0.42
15	26	5049	0.51
16	42	5074	0.83
17	26	5048	0.51
18	26	5048	0.52
19	21	5058	0.42
20	34	5038	0.67
21	22	5029	0.44
22	14	5042	0.28
23	14	4778	0.29
24	4877	4878	99.98

Tabla 2. Resultados de análisis diferencial sitio específico CpG dentro de la región promotora en el gen *BRCA1*.

<i>BRCA1</i>	MCF-7			C1		
Sitio CpG	Metilado	Cobertura	Porcentaje	Metilado	Cobertura	Porcentaje
1	5	1559	0.32	6	1256	0.48
2	11	1555	0.71	2	1253	0.16
3	83	1539	5.39	32	1238	2.58
4	13	1521	0.85	4	1220	0.33
5	8	1523	0.53	4	1228	0.33
6	8	1511	0.53	5	1221	0.41
7	6	1481	0.41	6	1204	0.5
8	3	1411	0.2	1	1188	0.08
9	2	1465	0.82	5	1178	0.42

Tabla 3. Resultados de análisis diferencial sitio específico CpG dentro de la región promotora en el gen *BRCA2*.

<i>BRCA2</i>	MCF-7			C1		
	Sitio CpG	Metilado	Cobertura Porcentaje	Metilado	Cobertura Porcentaje	
1	81	2140	3.79	74	489	15.13
2	13	2121	0.61	12	481	2.49
3	18	2225	0.81	2	512	0.39
4	11	2105	0.52	4	479	0.84
5	6	2097	0.29	0	477	0

Tabla 4. Resultados de análisis diferencial sitio específico CpG dentro de la región promotora en el gen *CHEK2*.

<i>CHEK2</i>	MCF-7			C1		
	Sitio CpG	Metilado	Cobertura Porcentaje	Metilado	Cobertura Porcentaje	
1	1	39	2.56	0	43	0
2	0	38	0	0	43	0
3	0	40	0	0	43	0
4	0	39	0	0	43	0
5	2	40	5	0	43	0
6	2	40	5	0	42	0
7	0	39	0	0	41	0
8	2	39	5.13	0	41	0
9	0	39	0	0	41	0
10	1	40	2.5	0	41	0
11	1	34	2.94	0	37	0
12	0	34	0	0	37	0
13	0	34	0	0	35	0
14	0	32	0	0	31	0
15	1	33	3.03	0	30	0
16	1	29	3.45	1	31	3.23
17	0	27	0	0	30	0
18	0	5	0	0	9	0
19	0	20	0	0	30	0
20	1	16	6.25	0	26	0
21	0	9	0	1	13	7.69
22	0	39	0	0	39	0
23	0	33	0	1	32	3.12
24	0	27	0	0	27	0

Tabla 5. Resultados de análisis diferencial sitio específico CpG dentro de la región promotora en el gen *PALB2*.

<i>PALB2</i>	MCF-7			C1		
	Sitio CpG	Metilado	Cobertura Porcentaje	Metilado	Cobertura Porcentaje	
1	22	4505	0.49	7	2011	0.35
2	28	4485	0.62	7	1994	0.35
3	24	4481	0.54	10	1991	0.5
4	24	4480	0.54	3	1986	0.15
5	5	4473	0.11	3	1981	0.15
6	22	4478	0.49	4	1979	0.2
7	25	4467	0.56	8	1974	0.91
8	2	2548	0.08	2	1138	0.18
9	13	2474	0.53	2	1104	0.18
10	8	2458	0.33	4	1098	0.36
11	17	2452	0.69	2	1100	0.18
12	15	2443	0.61	3	1095	0.27
13	16	2372	0.67	2	1076	0.19

Tabla 6. Resultados de análisis diferencial sitio específico CpG dentro de la región promotora en el gen *PTEN*.

<i>PTEN</i>	MCF-7			C1		
	Sitio CpG	Metilado	Cobertura Porcentaje	Metilado	Cobertura Porcentaje	
1	3824	3935	97.18	2298	2335	98.42
2	3878	3953	98.1	2289	2338	97.9
3	3853	3931	98.02	2347	2377	98.74
4	3629	3914	92.72	2274	2323	97.89
5	1667	3913	42.6	2243	2325	96.47
6	1765	3878	45.51	2251	2306	97.61
7	249	3515	6.98	2064	2202	93.73
8	243	3466	7.01	2009	2158	93.1