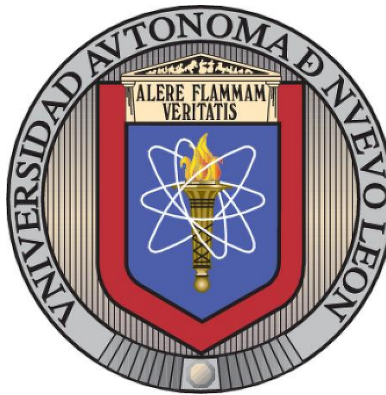


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO DE TESIS

IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN  
DEL GEN *RASSF1A* EN TUMORES DE PACIENTES CON CÁNCER  
DE MAMA

POR

L.B.G. MAURICIO DE LA ROSA GARZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO  
DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

DICIEMBRE 2014

**TÍTULO: "IDENTIFICACIÓN DE PATRONES DE METILACIÓN Y  
EXPRESIÓN DEL GEN RASSF1A EN TUMORES DE PACIENTES  
CON CÁNCER DE MAMA".**

Aprobación de la tesis:



---

**Dra. en C. María de Lourdes Garza Rodríguez**  
Directora de Tesis



---

**Dr. en C. Hugo Alberto Barrera Saldaña**  
Co-Director de Tesis



---

**Dra. en C. Cella Nohemí Sánchez Domínguez**  
Miembro de la Comisión de Tesis



---

**Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## RESUMEN

**Presenta:** L.B.G. Mauricio de la Rosa Garza

**Fecha de graduación:** Enero, 2014

**Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.  
Facultad de Medicina.**

**Título del Estudio:** Identificación de Patrones de Metilación y Expresión del Gen RASSF1A en Tumores de Pacientes con Cáncer de Mama

**Número de páginas:**

**Introducción y objetivo.** El cáncer de mama (CM) es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial. Existe un gran número de factores, tanto ambientales como genéticos, que están implicados en el desarrollo del CM. Algunos de estos factores como el envejecimiento, la inflamación, las infecciones virales, las hormonas sexuales, además están relacionados con alteraciones epigenéticas relacionadas con el CM, siendo la metilación del ADN una de las más estudiadas. La metilación del ADN es un fenómeno que se presenta normalmente durante la diferenciación celular y durante el proceso neoplásico se ve altamente desregulado. A pesar de esto existen ciertas tendencias en cuanto a los patrones de metilación que se presentan en células tumorales, las cuales pueden ser usadas como biomarcadores para ciertos tipos de cáncer o para determinar el pronóstico de los pacientes. La metilación en la región promotora del gen RASSF1A se ha asociado a un mal pronóstico, mayores índices de recaída y tasas de supervivencia baja en pacientes con CM. **Objetivo.** Evaluar el estado de metilación de la región promotora y su efecto con la expresión del gen *RASSF1A* en pacientes con CM. **Material y Métodos.** Se recolectaron muestras de 48 pacientes (34 muestras de sangre y 20 tumores). El ADN extraído de tumores y de sangre de 10 pacientes con CM fue tratado con una solución de bisulfito. Posteriormente se usó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región promotora del gen RASSF1A. Después los amplicones se secuenciaron usando el método de Sanger y los productos se analizaron en un secuenciador de electroforesis capilar para detectar la metilación en la región promotora del gen. A la par de la extracción de ADN se extrajo ARN y este se convirtió a ADNc, el cual posteriormente se usó para realizar los ensayos de PCR en tiempo real para detectar los niveles de expresión del gen RASSF1A en tumores de pacientes con CM. **Resultados.** De los 10 tumores analizados, 9 de ellos presentaron metilación en la región promotora de RASSF1A (90%), mientras que de las 5 muestras de sangre analizadas, ninguna de ellas presentó metilación. En cuanto a los niveles de expresión, de las 7 muestras analizadas, 6 presentaron una sub-expresión en comparación con la muestra de referencia. De los 10 tumores analizados, 7 de ellos presentaron metilación en el sitio de restricción para la enzima *Bst*II, el cual se compone de dos dinucleótidos CpG seguidos uno del otro (CGCG). Al comparar el estado de metilación de las muestras con la expresión, se logró identificar que la metilación en el sitio CGCG mostró cierta correlación con los niveles de expresión que presentaba el gen en la misma muestra. **Conclusiones.** La metilación de la región promotora del gen RASSF1A, y específicamente del sitio de restricción CGCG, afectan en gran medida la expresión del gen RASSF1A, lo que pudiera ser usado como biomarcador realizando estudios de asociación contra datos clínicos del paciente o características del tumor.

---

Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez  
Director de Tesis

## **Agradecimientos**

A mis padres Arnoldo y Sonia por el apoyo incondicional que me otorgaron a mí y a mis hermanos desde siempre y por inculcarme el interés por la ciencia y el conocimiento. Así como a mis hermanos Marcelo y Miguel y a toda mi familia.

A la Dra. Lourdes por confiar en mí y permitirme desarrollar el proyecto que quise desde cero a pesar de las limitantes que se presentarían al empezar a trabajar con una línea de investigación nueva en el laboratorio, así como por tenerme paciencia y apoyarme cuando la necesité

Al Dr. Hugo por estar siempre al pendiente de nuestro progreso y exigirnos el máximo.

A la Dra. Celia por orientarme y asesorarme durante el desarrollo del proyecto.

A todos los colaboradores que estuvieron involucrados directamente en la realización de este proyecto.

A mis amigos y compañeros de la maestría.

A Rolis, Daniela y Mariel por ayudarme a sacar adelante mis experimentos así como a los estudiantes de servicio social, Paola, Antonio, Karen, Mónica, Fany y Sybi, por ayudarme con la recolección y procesamiento de muestras.

A Norma, Ariadna y Juany, que siempre nos daban buenas noticias.

A Don Lalo por siempre estar ahí cuando ocupábamos algo.

A Dany y Amir por ayudarme con mis problemas informáticos y mecánicos respectivamente.

A Erika por haberme acompañado durante la realización de este proyecto.

A CONACyT por el apoyo económico brindado durante estos dos años.

A Vitagenesis por permitirme participar en el proyecto “Farmacogenética de la diabetes tipo 2” y otorgarme una beca por contribuir en el desarrollo experimental del proyecto.

## ÍNDICE

Contenido	Pagina
Lista de figuras	I
Lista de cuadros	II
Abreviaturas	III
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Cáncer de mama	1
1.2 Cáncer de mama en México	2
• 1.3 Diagnóstico	3
• 1.3.1 Exploración física	3
• 1.3.2 Mastografía	3
• 1.3.3 Resonancia magnética nuclear	4
• 1.3.4 Ultrasonido	4
• 1.3.5 Aspiración con aguja fina y biopsia	5
1.4 Tratamiento	6
• 1.4.1 Cirugía	6
• 1.4.2 Radioterapia	6
• 1.4.3 Quimioterapia	6
• 1.4.4 Terapia hormonal	7

• 1.4.5 Terapia dirigida	7
1.5 Factores de riesgo	7
• 1.5.1 Sexo	7
• 1.5.2 Edad	8
• 1.5.3 Obesidad	8
• 1.5.4 Historial familiar	8
• 1.5.5 Genética	9
1.6 Epigenética	9
1.7 Metilación del ADN	9
• 1.7.1 Mecanismos de metilación del ADN	10
• 1.7.2 Factores asociados con la metilación del ADN	11
- 1.7.2.1 Envejecimiento	11
- 1.7.2.2 Inflamación crónica	13
- 1.7.2.3 Infecciones virales	13
- 1.7.2.4 Hormonas sexuales	13
- 1.7.2.5 Hábitos alimenticios	14
• 1.7.3 Metilación aberrante del ADN y cáncer	16
• 1.7.4 Metilación de genes supresores de tumor	18
• 1.7.5 Biomarcadores de metilación del ADN	21
• 1.7.6 Metilación del gen RASSF1A	22

• 1.7.7 Conversión del ADN con bisulfito	23
<b>II. Justificación</b>	<b>24</b>
<b>III. Objetivos</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo General	25
3.2 Objetivos específicos	25
<b>IV. Material y Métodos</b>	<b>26</b>
4.1 Recolección de muestras	26
• 4.1.1 Desarrollo de una red de colaboración para la recolección de muestras	26
• 4.1.2 Reclutamiento de pacientes	26
• 4.1.3 Integración de una colección de tumores y controles para los estudios de secuenciación y expresión	27
4.2 Extracción de ácidos nucleicos	27
• 4.2.1 Extracción de ADN de sangre	27
• 4.2.2 Extracción de ADN y ARN de tejido embebido en parafina	28
• 4.2.3 Extracción de ADN y ARN de tejido fresco	29
4.3 Cuantificación de los ácidos nucleicos	29
4.4 Tratamiento del ADN genómico con bisulfito	30
4.5 Conversión del ARN a ADN complementario (ADNc)	31
4.6 Amplificación de la región promotora de RASSF1A	32
• 4.6.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para ADN	33

convertido con bisulfito	
• 4.6.2 Estandarización de la PCR para la amplificación de la región promotora de RASSF1A	34
• 4.6.3 Amplificación de la región promotora del gen RASSF1A en muestras de pacientes con CM	34
4.7 Secuenciación por bisulfito	35
• 4.7.1 Purificación de los amplicones	35
• 4.7.2 Reacción de secuenciación	35
• 4.7.3 Purificación de la reacción de secuenciación	36
• 4.7.4 Electroforesis capilar	37
• 4.7.5 Procesamiento de las lecturas de secuenciación	37
4.8 Cuantificación de la expresión por qPCR	37
• 4.8.1 Selección del control endógeno	38
• 4.8.2 Estandarización de la qPCR	38
• 4.8.3 Amplificación de las muestras de tumor y tejido normal por qPCR	39
• 4.8.4 Determinación de los niveles de expresión en las muestras de CM	39
<b>V. Resultados</b>	40
5.1 Recolección de muestras	40
5.2 Detección y evaluación de los patrones de metilación presentes en la región promotora del gen RASSF1A	41



• 5.2.1 Amplificación de la región promotora del gen RASSF1A en muestras de pacientes con CM	41
• 5.2.2 Secuenciación por bisulfito	43
5.3 Medición de los niveles de expresión de RASSF1A	46
5.4 Relación de la metilación de RASSF1A con su expresión	49
<b>VI. Discusión</b>	51
<b>VII. Conclusiones</b>	57
<b>VIII. Referencias</b>	58
<b>IX. Anexos</b>	62
Anexo 1. Carta de aprobación del comité de ética	62
Anexo 2. Consentimiento informado	63
Anexo 3. Hoja de recolección de datos.	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Pagina
1	Tasa de mortalidad observada de cáncer de mama en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa, 2012 (por cada 100 mil mujeres de 20 años y mas).	2
2	Factores endógenos y exógenos que promueven la metilación del ADN.	12
3	Representación gráfica de la “región central”.	14
4	Comparación del estado de metilación del ADN de una célula normal contra el de una tumoral	17
5	Representación Gráfica del tratamiento con bisulfito	23
6	Mapa de la región a estudiar del gen <i>RASSF1A</i> .	42
7	Pruebas para la estandarización de la PCR para amplificar la región promotora del gen <i>RASSF1A</i> .	43
8	Amplificación de muestras representativas de la región promotora de <i>RASSF1A</i> a partir de ADN extraído de tumores de pacientes con CM.	43
9	Lecturas y electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación de la región promotora de <i>RASSF1A</i> de los controles positivo y negativo para metilación.	45
10	Representación grafica de los sitios CpG metilados en cada una de las muestras analizadas.	46
11	Curva estándar de <i>RASSF1A</i> y <i>GAPDH</i> usando ADNc de una muestra de tejido mamario normal.	47
12	Amplificación por qPCR de muestras representativas de CM y una de tejido normal.	48
13	Amplificación por qPCR de muestras representativas de CM y una de tejido normal.	49
14	Comparación entre los niveles de expresión y el estado de metilación del gen <i>RASSF1A</i> en tumores de pacientes con CM	49
15	Comparación entre la expresión de <i>RASSF1A</i> y el patrón y el grado de metilación en sitios específicos.	50

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Nombre	Pagina
1	Clasificación de las imágenes de mamografía por la escala BI-RADS	4
2	Clasificación citológica (por aspirado) e histológica (por biopsiado) de las muestras de tejido mamario.	5
3	Ejemplos de genes silenciados por hipermetilación de islas CpGs de promotores de genes asociados al cáncer de mama	19
4	Tiempos y temperaturas de incubación para la conversión del ADN con la solución de bisulfito	30
5	Cantidades de los reactivos empleados en la reacción de retrotranscripción	31
6	Tiempos y temperaturas programadas en el termociclador para la generación del ADNc	32
7	Condiciones del programa "RASSF1A" para la amplificación de la región promotora del gen <i>RASSF1A</i>	34
8	Reactivos y cantidades empleadas en la reacción de qPCR.	38

## ABREVIATURAS

μl: MICROLITROS

ng: nanogramos

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

CM: cáncer de mama

Rpm: revolucione por minuto

Cs: Citosinas

Ts: Timinas

DNMTs: DNA metil transferasas

ADN: Acido Desoxiribonucleico

ARN: Acido Ribonucleico

SAM: S-adenosil metionina

CpG: Dinucleotido (Citosina unida a una Guanina)

HU: Hospital Universitario

HSJ: Hospital San José

UMAE: Unidad Médica de Alta Especialidad

ADNc: ADN complementario

qPCR: PCR en tiempo real

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Cáncer de mama**

El cáncer es un conjunto de enfermedades que involucran un crecimiento celular anormal con el potencial de invadir o diseminarse a otras partes del cuerpo. Algunas de las características compartidas entre los diferentes tipos de cánceres son: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales de bloqueo del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, inducción y mantenimiento de la angiogénesis y activación de la metástasis e invasión a otros tejidos.

Los tipos de cánceres se pueden clasificar en una gran variedad de categorías, siendo las principales: carcinomas, sarcomas y cánceres del sistema nervioso.

La incidencia de cáncer a nivel mundial para el 2012 fue estimada en 14.1 millones de nuevos casos, siendo los tipos más frecuentes los cánceres de pulmón, mama (mujeres) y colorrectal, representando estos tres el 34.6% de todos los casos a nivel mundial [1].

El cáncer de mama (CM) se caracteriza por un crecimiento desregulado de los diferentes tejidos que se encuentran en las mamas, siendo los carcinomas lobulares y ductales, los más frecuentes [2].

En el año 2012, 1.7 millones de mujeres fueron diagnosticadas con CM y se estima que 6.3 millones de mujeres vivas habían sido diagnosticadas con CM en los cinco años previos al 2012. Desde las estimaciones del 2008, la incidencia del CM se ha incrementado en más de un 20%, mientras que la mortalidad se ha incrementado en un 14%. Adicionalmente, el CM es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (522,000 muertes en el 2012) y el cáncer más frecuentemente diagnosticado entre mujeres en 140 de los 184 países alrededor del mundo, representando uno de cada cuatro casos de todos los tipos de cánceres en mujeres [1, 3].

## 1.2 Cáncer de mama en México

En México, el CM es la neoplasia más frecuente, seguida del de próstata y después por el cervicouterino. En cuanto a mortalidad, el CM ocupa el segundo lugar, solamente superado por el cáncer de próstata. En mujeres, esta neoplasia es la más frecuente y de mayor mortalidad [1].

En México, los estados que presentan el mayor número de casos de CM en mujeres mayores de 20 años son: Campeche, Aguascalientes y Jalisco, con 119, 54 y 50 casos por cada 100,000 habitantes, respectivamente; mientras que los estados con menor cantidad de casos son: Hidalgo, Guerrero y México, con 9.9, 8.19 y 8.04 casos, respectivamente. Por el otro lado, los estados con los más altos índices de mortalidad son: Coahuila, Distrito Federal y Sonora, con 28.58, 20.12 y 19.75 fallecimientos, respectivamente, por cada 100,000 habitantes. Los estados con los índices más bajos de mortalidad son: Quintana Roo, Campeche y Oaxaca, con 8.00, 7.60 y 7.13 fallecimientos, respectivamente [4].



**Figura 1.** Tasa de mortalidad de cáncer de mama observada en mujeres de 20 años y más, por entidad federativa, 2012 (por cada 100 mil mujeres de 20 años y mas) [4].

En cuanto a la incidencia del cáncer de mama en México, no existe un patrón o tendencia que pudiera asociarse con la región geográfica, mientras que

para la mortalidad, existe cierta tendencia hacia los estados del norte del país, pues estos son donde se encuentran los índices más altos de mortalidad, como se puede observar en la figura 1.

Es importante resaltar que Nuevo León es el segundo estado en donde se realizaron mayor número de mamografías hasta el 2012. Sin embargo, también es uno de los estados con un mayor índice de mortalidad [4].

### **1.3 Diagnóstico**

Algunas veces el CM es detectado después de que los síntomas aparecen, pero muchas mujeres con CM temprano no tienen síntomas. Es por esto que resulta importante realizarse las pruebas de monitoreo recomendadas antes de que aparezcan los primeros síntomas.

#### **1.3.1 Exploración física**

Este método, al ser relativamente fácil de realizar, es uno de los principales métodos de prevención del CM, ya que al realizarse correctamente, puede ayudar a localizar cualquier bulto o anomalía que se detecte en el seno y la paciente rápidamente puede recibir asesoría médica para determinar qué es ese abultamiento.

#### **1.3.2 Mastografía**

La mastografía es hasta ahora el mejor método de detección. Este método diagnóstico tiene una sensibilidad de entre 80 y 95%. Sin embargo, entre un 10 y 15% de los tumores pueden permanecer ocultos principalmente en mujeres con mamas densas [5].

Esta herramienta es valiosa, particularmente en aquellos casos en los que el médico detecta un signo poco notorio que le haga sospechar de alguna patología mamaria y en donde las condiciones de la mama (obesidad, mamas muy voluminosas, cambios fibronodulares y tumores profundos) impiden la palpación de un tumor de pequeñas dimensiones.

La interpretación de estos estudios se lleva a cabo empleando una herramienta llamada BI-RADS (*Breast Imaging Report and Database System*), la cual se utiliza como garantía de calidad. La escala de esta herramienta se muestra en el Cuadro 1.

<b>Cuadro 1. Clasificación de las imágenes de mamografía por la escala BI-RADS</b>	
<b>Birad</b>	<b>Interpretación</b>
<b>0</b>	Estudio insuficiente, evaluación adicional con otro estudio
<b>1</b>	Sin hallazgos benignos
<b>2</b>	Hallazgos benignos
<b>3</b>	Probable hallazgo benigno
<b>4</b>	Hallazgos sospechosos
<b>5</b>	Hallazgos con gran sospecha de malignidad
<b>6</b>	Confirmación histopatológica de CM

### **1.3.3 Resonancia magnética nuclear (RMN).**

La RMN es un método no invasivo que emplea imágenes y ondas de radio para visualizar órganos y tejidos circundantes sin utilizar radiación (Rayos X).

La RMN se emplea generalmente después de haber realizado una mastografía y estudios con ultrasonido para detectar lesiones con mayor precisión y a veces incluso detectar nuevas lesiones. Es una técnica complementaria para el diagnóstico de casos complejos.

En ocasiones, las pacientes con CM reciben dosis de quimioterapia antes de que el tumor sea removido por cirugía. En estos casos la RMN se usa para monitorear el efecto de la quimioterapia neo-adyuvante para reevaluar la presencia o ausencia del tumor antes de realizar la cirugía [6].

### **1.3.4 Ultrasonido**

A través de las imágenes generadas por ultrasonido, específicamente con equipos de alta resolución (7 – 10MHz), es posible la identificación de tumores de tan solo 0.5 cm. de diámetro. Debido a esto el ultrasonido no es la mejor opción para detectar micro-calcificaciones con diámetros menores a 0.5 cm. y que son frecuentes en tumores malignos. Esta técnica en vez de ser usada como



herramienta diagnóstica se utiliza como complemento para el estudio de tumores sospechosos donde no es recomendable usar la mastografía para evitar exponer el tumor a la radiación [6].

### 1.3.5 Aspiración con aguja fina y biopsia

Si después de haber realizado una exploración física, mamografía o ultrasonido se detecta un abultamiento o un área sospechosa, una pequeña muestra que contenga células o tejido mamario deberá ser tomada de la mama para ayudar a realizar el diagnóstico.

La técnica de aspirado por aguja fina involucra tomar una o varias muestras de células mamarias usando una aguja fina o jeringa. El proceso es un tanto incomodo aunque rara vez se emplea anestesia local. La muestra después se analiza en un laboratorio bajo el microscopio y dependiendo de lo que se encuentre se utiliza una clasificación (Cuadro 2) con la letra C (citología) y un numero el cual indica generalmente la gravedad del evento [7].

<b>Cuadro 2. Clasificación citológica (por aspirado) e histológica (por biopsiado) de las muestras de tejido mamario.</b>		
<b>Características</b>	<b>Aspirado</b>	<b>Biopsiado</b>
<b>Muestra inadecuada</b>	C1	B1
<b>Benigno (sin cáncer)</b>	C2	B2
<b>Inusual, anormal o incierto, pero, probablemente benigno</b>	C3	B3
<b>Sospechoso y posiblemente maligno (cáncer)</b>	C4	B4
<b>Maligno (cáncer)</b>	C5	B5

La toma de biopsia del núcleo utiliza una aguja larga para obtener varias muestras de tejido mamario del área de interés. Al analizar tejido en lugar de células se obtiene información más detallada.

Después de aplicar anestesia local, se hace un pequeño corte en la piel para poder tomar las muestras de tejido las cuales serán enviadas a un laboratorio donde serán analizadas. Para tomar las biopsias a veces se utiliza el equipo de mamografía para generar imágenes en dos diferentes ángulos como guía para la aguja y poder tomar la biopsia específicamente del área de interés [7].

Los resultados del análisis de la biopsia se presentan como en el caso de la citología sólo que en vez de una C se utiliza la letra B. En cualquiera de los casos (citología o tejido) se recomiendan estudios adicionales si los resultados son C3, C4, C5 ó B3, B4, B5 para la citología o el biopsiado, respectivamente.

## **1.4 Tratamiento**

Actualmente existen diferentes formas de tratar el CM y estas van desde intervenciones quirúrgicas para remover tejido mamario, hasta tratamientos moleculares dirigidos.

### **1.4.1 Cirugía**

Dependiendo del estadio y del tipo de tumor es la intervención por la que se optará.

- Tumorectomía: consiste en la remoción únicamente de una masa tumoral benigna o maligna y en algunos casos (dependiendo del tipo y estadio del tumor) es suficiente tratamiento.
- Mastectomía: Remoción completa de la mama donde se encuentra tumor.

### **1.4.2 Radioterapia**

Tratamiento adyuvante para mujeres que han sido sometidas a una tumorectomía y para algunas que hayan sido sujetas a mastectomía, con el fin de evitar una recaída.

### **1.4.3 Quimioterapia**

Uso de fármacos citotóxicos en el tratamiento del CM.

- Quimioterapia Neo-adyuvante: suministrada antes de la cirugía para encoger el tumor.

- Quimioterapia Adyuvante: suministrada después de la cirugía para reducir el riesgo de recaída
- Quimioterapia Paliativa: controlar el cáncer en caso de que este se haya diseminado más allá de la mama o de los ganglios linfáticos (metástasis)

#### **1.4.4 Terapia hormonal**

Consiste en la administración de fármacos que inhiben o bloquean el efecto de los estrógenos y la progesterona.

#### **1.4.5 Terapia dirigida**

Es el uso de moléculas que bloqueen o inactiven otras moléculas implicadas en mecanismos propios del desarrollo tumoral. Algunos ejemplos son los inhibidores de la angiogénesis, los inhibidores de mecanismos de transducción de señales y anticuerpos o antagonistas para otros/as receptores u hormonas [8, 9].

### **1.5 Factores de riesgo**

Los factores de riesgo para el CM pueden dividirse en prevenibles y no prevenibles. El CM, como otros tipos de cáncer, puede resultar de múltiples factores de riesgo tanto hereditarios como ambientales.

#### **1.5.1 Sexo**

El simple hecho de ser mujer es el mayor factor de riesgo para desarrollar CM. El CM en hombres existe, sin embargo estos solo representan alrededor del 1% de todos los casos de CM. Esto se debe principalmente a que el desarrollo de las mamas en las mujeres tarda entre tres y cuatro años y es completado generalmente a los 14 años, mientras que las mamas de los hombres generalmente no se desarrollan totalmente y en la mayoría de los casos las mamas en los hombres están hechas principalmente de tejido adiposo y no de glándulas. Además, las células de las mamas (una vez que estas están totalmente formadas) son muy inmaduras y están activas hasta el primer embarazo completo.

Durante este periodo las células son muy sensibles a estrógenos y otras hormonas. Las células mamarias de los hombres son inactivas y tienen niveles de estrógenos extremadamente bajos [10].

### **1.5.2 Edad**

El riesgo de padecer CM se incrementa al envejecer. Como ejemplo tenemos que la *American Cancer Society* reporta que uno de cada ocho casos de CM invasivo se desarrolla en mujeres menores de 45 años, mientras que dos de cada tres casos de CM invasivo se desarrolla en mujeres mayores de 55 años.

De hecho, el proceso de envejecimiento es el mayor factor de riesgo para CM y esto es debido a que mientras vivamos más tiempo hay más oportunidad de sufrir mutaciones en el cuerpo y mientras envejecemos nuestro cuerpo es menos capaz de reparar éstas.

### **1.5.3 Obesidad**

Las mujeres con sobrepeso y obesidad tienen un mayor riesgo de padecer CM comparadas con las mujeres que presentan un peso saludable, especialmente después de la menopausia. El sobrepeso también incrementa el riesgo de recaída en mujeres que hayan padecido CM.

El riesgo aumentado se debe principalmente a que las células de grasa producen estrógenos, por lo que, al tener más grasa, habrá mayor producción de estrógenos [10].

### **1.5.4 Historial familiar**

Las mujeres con familiares directos diagnosticados con CM tienen un riesgo incrementado de padecer CM.

El tener un familiar mujer de primer grado diagnosticado con CM duplica el riesgo de padecer CM, mientras que el tener dos familiares de primer grado con CM diagnosticado aumenta cinco veces el riesgo de padecer CM. En muchos de

estos casos existen alteraciones en genes como *BRCA1* y *BRCA2*, las cuales están siendo transmitidas dentro de una familia.

### **1.5.5 Genética**

Entre un 5 y un 10% de todos los casos de CM se cree son hereditarios, causados por genes anormales pasados de los padres a los hijos.

El caso más conocido es el de los genes *BRCA1* y *BRCA2* cuya función es la reparación del ADN y mantener a las células creciendo normalmente, pero en el CM estos genes se encuentran alterados y son transmitidos de esta manera a través de las generaciones.

Otros genes frecuentemente alterados e involucrados en el desarrollo de CM hereditario son: *ATM*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1* y *PALB2*, entre otros.

Aparte de los factores de riesgo antes mencionados, existe una gran variedad de factores de riesgo de los cuales podemos mencionar algunos como: radiación, etnia, historial de embarazos, lactancia, menarquia temprana, menopausia tardía, terapia de remplazo hormonal, alcohol, falta de ejercicio, tabaquismo, entre otros [10].

### **1.6 Epigenética**

La epigenética es el estudio de cambios en la expresión génica o el fenotipo celular, causado por diversos mecanismos, como la metilación del ADN o la acetilación de histonas, los cuales generan modificaciones químicas o estructurales transgeneracionales que regulan la actividad génica en ausencia de cambios en la secuencia nucleotídica del genoma[11-14]. Estas alteraciones están altamente influenciadas por el medio ambiente y el estilo de vida, ambos involucrados en más del 90% de los casos de CM.

### **1.7 Metilación del ADN**

La metilación del ADN ocurre en las citosinas del ADN eucariótico, las cuales son convertidas a 5-metilcitosina por las DNA metiltransferasas (DNMTs).

El residuo de citosina alterado generalmente se encuentra inmediatamente después de un nucleótido de guanina. Diferentes miembros de la familia de DNMTs actúan ya sea *de novo*, estableciendo el patrón inicial de grupos metilo en su lugar en una secuencia de ADN, o como DNMTs de mantenimiento, copiando la metilación de una cadena de ADN preexistente a su cadena complementaria justo después de la replicación. Actualmente el mecanismo por el cual las DNMTs *de novo* son dirigidas al sitio el cual desean silenciar, no está bien elucidado. En los mamíferos, la metilación es distribuida, escasa, pero de manera global, en secuencias CpG definidas a través del genoma completo, con excepción de las islas CpG (localizadas dentro o cerca de la región promotora de más del 70% de todos los genes en humanos [13]) o en regiones específicas en la proximidad (una kilobase) donde se encuentran altos contenidos de dinucleótidos CpG [15].

La hipermetilación (adición de grupos metilo a las citosinas de las islas CpG) de la región promotora está normalmente asociada con la represión, mientras que el caso opuesto, la hipometilación (remoción de esta “huella” epigenética de grupos metilo de las islas CpG), se relaciona con la activación o expresión de un gen, por lo que el proceso de metilación de ADN está relacionado con la regulación de la expresión génica[16, 17]. Los niveles de metilación de promotores en particular son similares entre individuos, pero existe una diferencia significativa entre los niveles de metilación específica entre diferentes tipos de tejidos y entre células normales y células tumorales [17].

### **1.7.1 Mecanismos de metilación del ADN**

El genoma humano no está metilado uniformemente e incluye secciones de segmentos metilados distribuidos dentro de regiones sin metilar. Aproximadamente la mitad de todos los genes en humanos tienen islas CpG, tanto en el caso de los genes endógenos, como en el de los genes específicos de tejido.

La metilación del ADN se lleva a cabo por medio de un grupo de enzimas conocidas como DNMTs. Actualmente se conocen ocho de estas enzimas. La metilación puede clasificarse en metilación *de novo*, cuando los dinucleótidos CpG de ambas cadenas apenas van a ser metilados o metilación de mantenimiento, cuando los dinucleótidos CpG están metilados ya en una de las cadenas y se va a metilar la complementaria. La metiltransferasa DNMT1 tiene ambas actividades, mientras que la DNMT3A y la DNMT3B son poderosas metiltransferasas *de novo* [35].

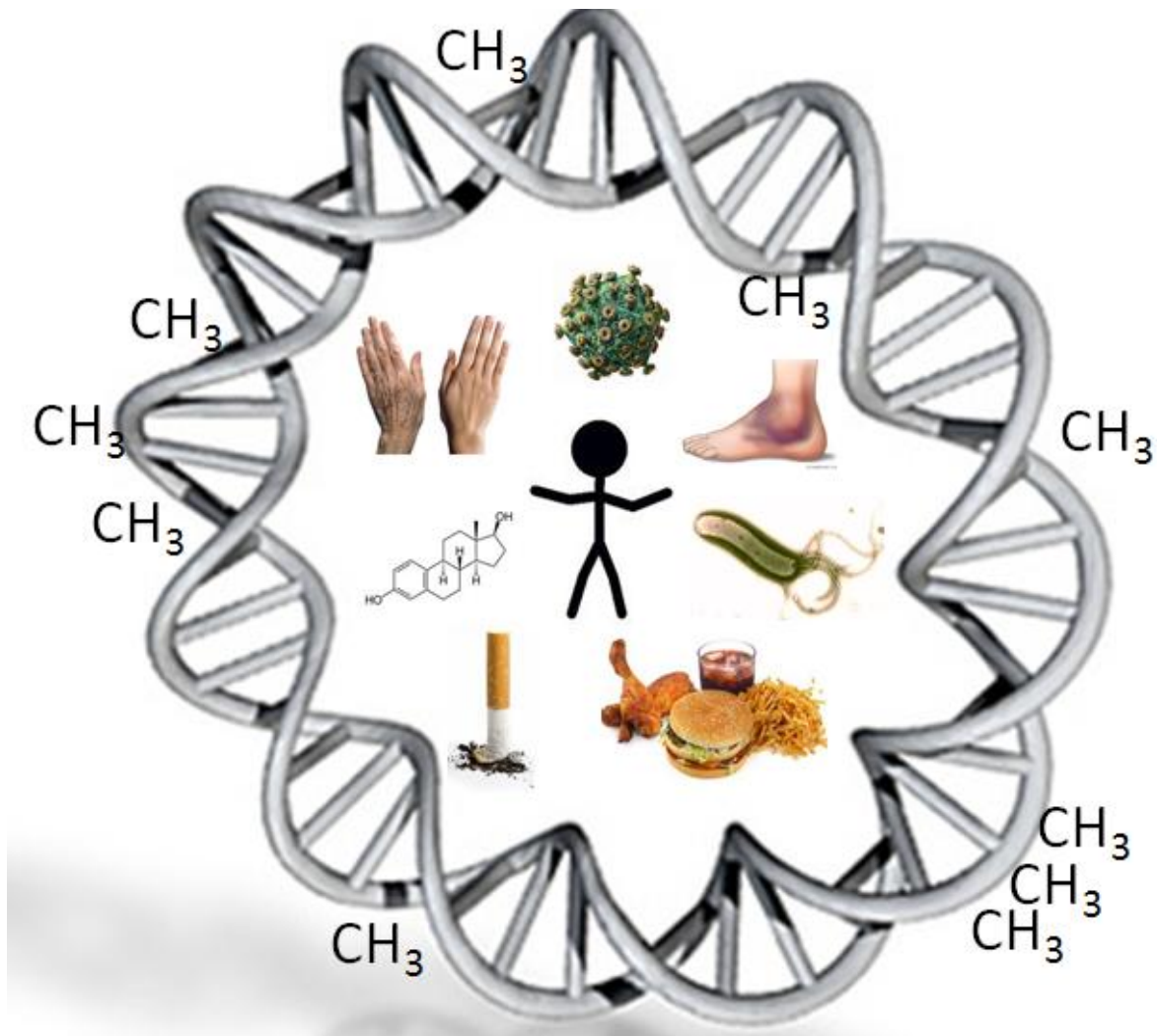
Aparte de las DNMTs, otros miembros de la maquinaria de metilación incluyen a las demetilinasas, cuya función es la remoción de los grupos metilo del ADN [36].

### **1.7.2 Factores asociados con la metilación del ADN**

Como en todas las enfermedades multigénicas, siempre existe una serie de factores que pueden estar relacionados con la etiología de la enfermedad. En el caso de la metilación del ADN existen una gran cantidad de factores que están directa o indirectamente relacionados con este fenómeno, como el envejecimiento, la inflamación crónica, las infecciones virales, las hormonas sexuales y la alimentación, entre otros (Figura 2) [18].

#### **1.7.2.1 Envejecimiento**

Hay una serie de experimentos que demuestran la asociación del envejecimiento con la metilación de genes. Como ejemplo tenemos el caso de la metilación de un sitio de restricción *NotI* en el exón uno del gen del receptor de estrógenos en la mucosa normal del colon, la cual se demostró estaba relacionada con el envejecimiento [19].



**Figura 2.** Factores endógenos y exógenos que promueven la metilación del ADN.

Posteriormente se identificó que el sitio de inicio de transcripción de *N33*, así como el exón I del gen *MYOD*, presentaban metilación en la mucosa normal del colon en asociación con la edad[20]. Es de importancia destacar que los genes supresores de tumor que presentan patrones de metilación en relación con el envejecimiento, tienden a presentar esta modificación en las regiones exónicas de estos genes o en regiones río arriba muy lejanas dentro de una isla CpG del promotor, y que a pesar de esto, en los casos de genes supresores de tumor metilados asociados con el envejecimiento, siempre habrá una pequeña región que cubre el sitio de inicio de la transcripción que siempre estará sin metilar [21-23].



### **1.7.2.2 Inflamación crónica**

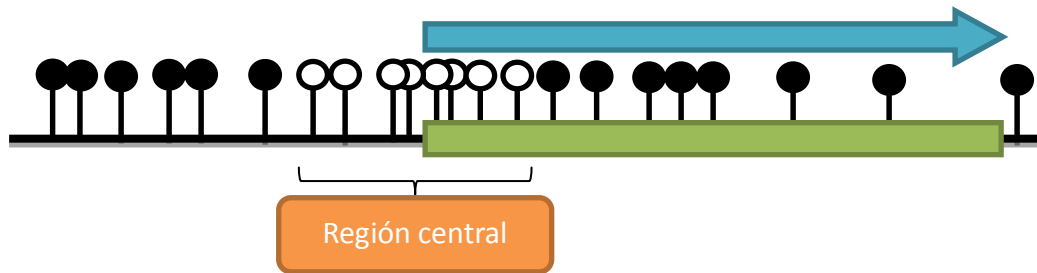
La inflamación crónica también se sabe que está asociada a un incremento en la metilación, como se demostró en estudios de casos de colitis ulcerativa que presentaba una mucosa de colon con apariencia normal, pero en la que se encontró una asociación con un incremento en la metilación del exón I del gen *P16*, en la región lejana frente al gen *MYOD* y en el exón I del gen *CSPG2* [21, 24]. Otro factor importante que a pesar de contener un gran número de carcinógenos entra dentro de esta clasificación, por su capacidad de inducir inflamación, es el humo del tabaco, el cual también está asociado a un incremento en la metilación del exón I del gen *P16* [25].

### **1.7.2.3 Infecciones virales**

Está bien establecido que el ADN viral sufre de metilación luego del proceso de infección en células de mamíferos [26]. Adicionalmente se ha demostrado que el proceso de infección viral no sólo induce metilación del ADN viral, sino también del ADN del huésped [27]. También se ha observado que infecciones con el virus de Epstein Barr, el virus de la hepatitis, y posiblemente otros virus, activan la maquinaria celular para metilar estos virus, pero erróneamente terminan metilando genes endógenos [28]. Dentro de los genes que se encuentran metilados en estas condiciones tenemos el caso de los genes *P16* y *hMLH1*, los cuales tienen una característica similar a la de ciertos genes metilados asociados a inflamación crónica o envejecimiento, y esto es que todos conservan una región específica que no sufre de metilación denominada “región central”, la cual es crítica para la transcripción del gen, mientras que las “regiones no centrales” como el primer exón o regiones lejanas río arriba, presentan metilación [28] (Figura 3).

### **1.7.2.4 Hormonas sexuales**

Existe evidencia que señala a los estrógenos (así como compuestos estrogénicos) como compuestos capaces de alterar los patrones de metilación del ADN en tejidos mamarios [29].



**Figura 3.** Representación gráfica de la “región central”. Se puede observar en color verde al primer exón de un gen. La flecha azul indica la dirección de la transcripción. Las esferas blancas dinucleótidos CpG sin metilar y las negras dinucleótidos CpG metilados. Se puede observar una región que se conserva sin metilación. Esta región es conocida como “región central”, la cual es crítica para la transcripción del gen.

Una alta concentración de  $17\beta$ -estradiol ha mostrado inducir hipermetilación en un modelo humano de células de epitelio mamario y causar la hipermetilación del gen en las glándulas mamarias de ratones expuestos a estrógenos [30, 31].

Se ha sugerido que los estrógenos juegan papeles duales en la etiología del riesgo de padecer cáncer, ya sea estimulando la proliferación celular o silenciando genes supresores de tumor. En un estudio se trataron líneas celulares inmortales no tumorales de tejido mamario, así como líneas celulares mortales de la misma fuente con  $17\beta$ -estradiol o con dietilstilbestrol (DES). Esto con el fin de determinar si estos compuestos eran capaces de inducir la metilación en ciertos genes. Este estudio demostró que la exposición a estrógenos tiene efectos diferentes en líneas celulares mortales e inmortales, como lo es el aumentar la senescencia (a través de un incremento en la metilación del promotor del gen *P16*) y el promover la tumorigénesis (por el silenciamiento del gen de la E-caderina a causa de la metilación), respectivamente [32].

#### 1.7.2.5 Hábitos alimenticios

Los hábitos alimenticios están relacionados indirectamente con la metilación del ADN, ya que existen ciertos factores nutricionales como la deficiencia de folatos y colina, los cuales se sabe inducen una hipometilación

genómica a través de una deficiencia de donadores de grupos metilo, como la S-adenosil metionina (SAM).

Algunos factores nutricionales parecen influir en el suministro de grupos metilo disponibles para la formación de SAM. Además, los factores nutricionales parecen modificar el uso de los grupos metilo por procesos que incluyen cambios en la actividad de las DNA metiltransferasas. Un tercer mecanismo por el cual la dieta pudiese estar relacionada con la metilación aberrante del ADN, son los cambios en la actividad de genes responsables de la desmetilación del ADN. Por último, está la teoría de que los patrones de metilación del ADN pueden influenciar la respuesta a los componentes bioactivos de la comida y por lo tanto generar diferencias en la respuesta en células normales y células neoplásicas [33].

Como se vio en el caso de las regiones críticas que no sufren metilación (envejecimiento, inflamación e infecciones virales), todos estos factores y sus patrones de metilación indican que las islas CpG de las regiones promotoras (regiones frente al gen que regulan el inicio de la transcripción) están de alguna manera protegidas contra la metilación *de novo* [28].

Cuando un gen es silenciado por la metilación de una isla CpG dentro de su promotor, la isla CpG se encuentra densamente metilada, como es el caso de los promotores de los genes *CDH1*, *VHL*, *P16*, *hMLH1* y muchos otros más [28]. Antes de que se genere una metilación densa, dos tipos de precursores de la metilación se deben considerar presentes. Uno es la metilación de regiones no-críticas dentro de una isla CpG y el otro son las “semillas de metilación” o metilación esparcida. La inflamación crónica, el envejecimiento y las infecciones por virus, están involucrados en la inducción de metilación en regiones no-críticas y en la formación de las “semillas de metilación” [28].

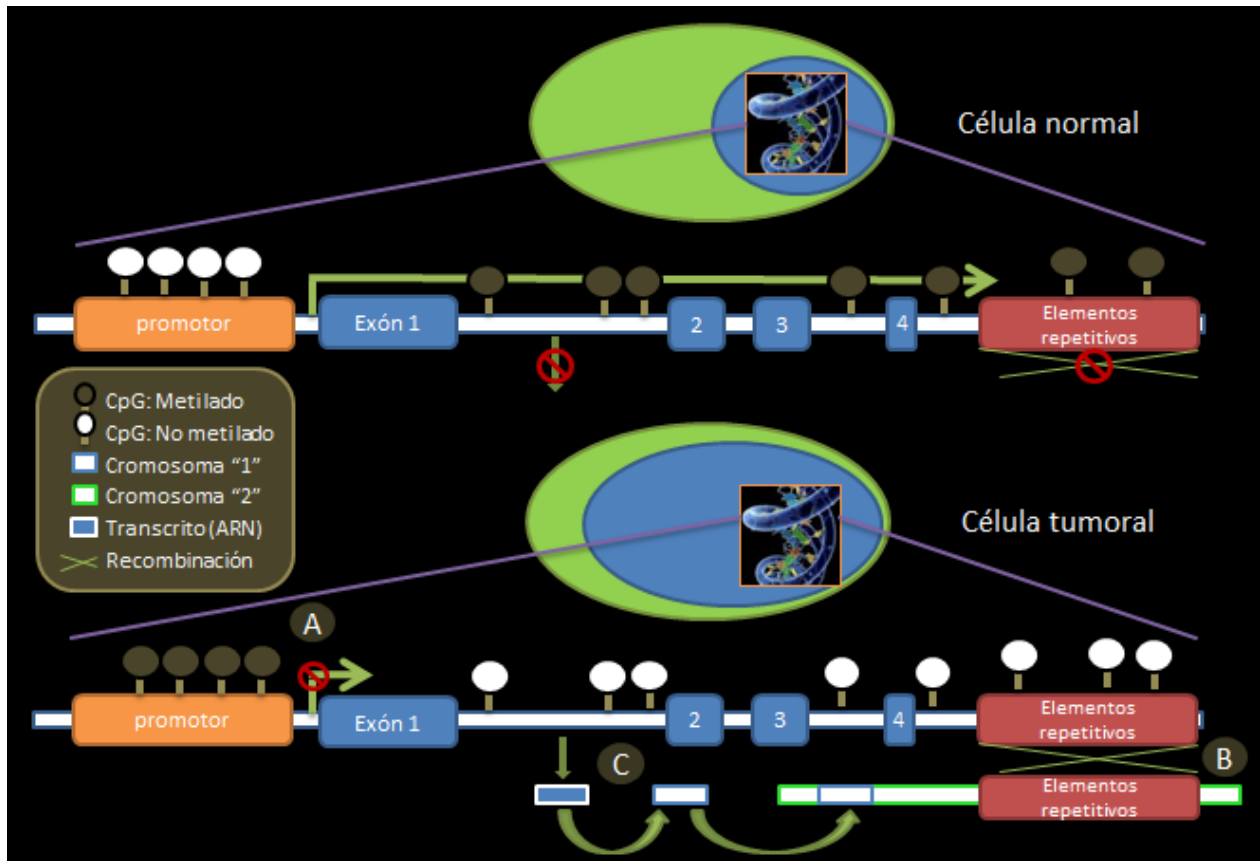
Existe un modelo ampliamente aceptado en el cual la metilación de regiones no-críticas conlleva a una metilación densa. Un estudio reciente pudiera descartar este modelo, tomando como un hecho que lo que se trata de explicar con este modelo es el silenciamiento de genes por la metilación. En este estudio

un grupo de investigadores realizó un experimento en el cual analizaron los patrones de metilación en pacientes con obesidad antes y después de realizarse una operación para bajar de peso (por lo tanto disminuir los niveles de tejido adiposo y por consiguiente los de estrógenos en mujeres postmenopáusicas [29]). El estudio reveló una serie de hallazgos interesantes, dentro de los cuales destaca el hecho de que la metilación de un solo residuo de citosina localizado en un sitio fuera de una isla CpG en el promotor del gen *PDK4*, es suficiente para reducir la actividad del gen, lo que sugiere que la metilación de regiones fuera de las islas CpG pueden jugar un papel clave en la regulación de la expresión génica y que una sola citosina metilada puede ser suficiente para reducir significativamente los niveles de expresión de un gen [34].

### **1.7.3 Metilación aberrante del ADN y cáncer**

Una apropiada metilación del ADN es esencial para el desarrollo y buen funcionamiento celular, por lo tanto cualquier anomalía en este proceso puede desarrollar diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. De hecho, las células tumorales están caracterizadas por tener un metiloma diferente en comparación con las células normales. De manera interesante, ya sea la hipometilación o la hipermetilación pueden ser detectadas en cáncer. Generalmente un decremento global de la metilación en dinucleótidos CpG (hipometilación) puede ser detectado en cáncer. Este fenómeno contribuye con la inestabilidad genómica y, menos frecuente, con la activación de genes silenciados. Por otra parte, está la hipermetilación de islas CpG en la región promotora de genes específicos, la cual se ha mostrado ser un sello distintivo crítico en muchas células cáncerosas [37] (Figura 4).

Es de importancia mencionar que algunas de las hipótesis actuales hacen énfasis en el papel de las modificaciones epigenéticas en estadios tempranos del desarrollo del tumor e incluso en la predisposición a cáncer. Se ha propuesto que las perturbaciones epigenéticas son los eventos iniciales que conllevan a la concurrencia de las “células progenitoras de cáncer” [38].



**Figura 4.** Comparación del estado de metilación del ADN de una célula normal contra el de una tumoral. En la parte superior se observa el estado de metilación en el ADN de una célula normal. Una isla CpG ubicada en la región promotora de un gen X normalmente presentaría un patrón de hipometilación, es decir, principalmente habrían dinucleótidos CpG sin metilación y estas islas generalmente se encuentran cerca de la región promotora de un gen supresor de tumor, regulando su expresión. Aparte de las islas CpG, existen dinucleótidos CpG distribuidos de una manera menos densa en regiones intragénicas, así como en elementos repetitivos. En una célula normal estos generalmente se encontrarían metilados, de esta manera previniendo cualquier forma de activación de estas regiones, ya sea en un evento de recombinación homóloga o de elementos transponibles. En la parte inferior de la imagen se tiene el patrón de metilación del ADN que normalmente presenta una célula tumoral. En este caso, contrario a lo que se presenta en una célula normal, las islas CpG se encuentran hipermetiladas, silenciando genes supresores de tumor (A) y promoviendo el proceso neoplásico, mientras que los dinucleótidos CpG distribuidos a lo largo de las regiones intragénicas y elementos repetidos se encuentran hipometilados, promoviendo la inestabilidad genómica por medio de una recombinación homóloga aberrante (B) y la activación de elementos transponibles (C).

Además, tanto las alteraciones genéticas como las epigenéticas, pueden conllevar a la progresión del tumor. En este contexto, la existencia de anomalías en la metilación del ADN que aparecen antes que las mutaciones y que están involucradas en la tumorigénesis, son una evidencia sólida que soporta esta teoría [37].

En la actualidad existen diversos estudios enfocados a entender el papel de la hipermetilación del ADN en relación con el cáncer. Sin embargo hasta hace unos años al proceso opuesto, la hipometilación del ADN, no se le daba el interés que debería. La hipometilación del ADN en cáncer generalmente afecta una mayor parte del genoma que la hipermetilación, por lo que las pérdidas netas de 5-metilcitosina se observan en muchos tipos cancerosos [39].

No es extraño que la hipermetilación haya recibido más atención que la hipometilación, ya que aunque tal vez no haya sido la causa, la hipermetilación del ADN y su relación con el cáncer es clara debido al consecuente silenciamiento del gen metilado; ello contrario a la hipometilación, donde su significancia biológica con el cáncer no es tan clara.

Un estudio de metilación demostró que los tumores de colon son los que presentan con mayor frecuencia de hipermetilación de islas CpG. Los tumores de cáncer testicular presentaron la menor frecuencia de hipermetilación.

Posteriormente se realizó un estudio de hipermetilación de 12 islas CpG en los extremos 5' de genes supresores de tumor de 600 pacientes. Se encontró una hipermetilación asociada al cáncer en gran parte de los tumores de un tipo específico en por lo menos unas cuantas de estas islas CpG [40].

#### **1.7.4 Metilación de genes supresores de tumor.**

El número de genes reportados que son inactivados por mecanismos de metilación del ADN durante la tumorigénesis, y que principalmente actúan como genes supresores de tumor en tejidos normales, está en aumento [37].

Los genes supresores de tumor, como su nombre lo indica, son genes que protegen a la célula de dar un paso hacia el proceso de carcinogénesis. La presencia de metilación en las islas CpG de la región promotora afecta genes involucrados en el ciclo celular, reparación del ADN, metabolismo de carcinógenos, adherencia celular, apoptosis, etc. El cuadro 1 muestra algunos de los genes hipermetilados en cáncer más relevantes [41].

El primer caso de el silenciamiento de un gen por metilación del ADN en su región promotora, se demostró en estudios de pacientes con retinoblastoma, en los cuales se descubrió que el silenciamiento del gen *RB1* era causado por este proceso epigenético [42]. Desde ese momento han sido identificados un gran número de genes supresores de tumor silenciados por la metilación del ADN de su región promotora en tejido tumoral (Cuadro 3).

<b>Cuadro 3. Ejemplos de genes silenciados por hipermetilación de islas CpGs de promotores de genes asociados al cáncer de mama</b>		
<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<b>APC</b>	Antagonista de la vía de señalización de Wnt involucrada en migración celular y adhesión	Kulis M. <i>et al</i> 2010[37]
<b>ABCB1</b>	Detoxificación	Dejeux E. <i>et al</i> 2010[43]
<b>BRCA1</b>	Reparación de escisión doble en la molécula del ADN, transcripción	Kulis M. <i>et al</i> 2010
<b>CCND2</b>	Regulador de cinasas dependientes de ciclinas (ciclo celular)	Kristiansen <i>et al</i> 2013[44]
<b>CDH1</b>	adhesión celular	Kulis M. <i>et al</i> 2010
<b>CDH13</b>	adhesión celular	Kulis M. <i>et al</i> 2010
<b>CDKN2A</b>	inhibidor de CDK4, control de la progresión del ciclo celular G1	Kulis M. <i>et al</i> 2010
<b>DBC2</b>	Gen supresor de tumores (inhibe proliferación celular)	Han L. <i>et al</i> 2013[45]
<b>DAPK1</b>	Mediador positivo de la apoptosis inducida por el interferón gamma	Kristiansen <i>et al</i> 2013
<b>ESR1</b>	Receptor de estrógenos, regulación de la expresión génica	Kulis M. <i>et al</i> 2010
<b>FOXC1</b>	Desarrollo embrionario	Dejeux E. <i>et al</i> 2010
<b>GSTP1</b>	Detoxificación	Dejeux E. <i>et al</i> 2010
<b>H1C1</b>	Factor de transcripción	Kulis M. <i>et al</i> 2010

<b>MGMT</b>	Reparación del ADN	Kristiansen <i>et al</i> 2013
<b>PYCARD</b>	Vías de señalización apoptótica	Kulis M. <i>et al</i> 2010
<b>RARB</b>	Relacionado con morfogénesis embrionaria, crecimiento celular y diferenciación	Kristiansen <i>et al</i> 2013
<b>RASSF1A</b>	Involucrado en el arresto del ciclo celular en la transición de la fase G1/S y reparación del ADN	Kulis M. <i>et al</i> 2010
<b>TIMP3</b>	Inhibe a un grupo de peptidasas involucradas en la degradación de la matriz extracelular	Kristiansen <i>et al</i> 2013
<b>TWIST1</b>	Implicado en la determinación del linaje celular y diferenciación.	Kristiansen <i>et al</i> 2013

Son varios los genes que metilados en su región reguladora se han visto implicados en una gran variedad de vías de señalización. Por ejemplo tenemos el caso de los genes CDKN2A ( $p16^{INK4\alpha}$ ) y CDKN2B ( $p15^{INK4\alpha}$ ), los cuales están involucrados con el ciclo celular. Se ha evidenciado que dichos genes se silencian por metilación en diferentes tipos de cánceres. Ambos involucrados en el control de la progresión hacia la etapa G1 del ciclo celular, actuando como inhibidores de cinasas dependientes de ciclina y siendo importantes genes supresores de tumores. Por otro lado, se tiene que algunos genes relacionados con la reparación del ADN se encuentran hipermetilados en el tejido tumoral, lo que confirma el hecho de que los eventos epigenéticos pueden promover las alteraciones genéticas clásicas, como las mutaciones [46]. Para esto tenemos el caso de la O-6-Metilguanina-DNMT (MGMT), la cual revierte los efectos negativos de la alquilación del ADN en tejidos normales y se ha mostrado que su gen se encuentra silenciado en varios tipos de carcinomas [47, 48]. La reparación de los errores en el apareamiento de nucleótidos se ha observado en una porción significativa de cánceres gástricos y está asociada con la hipermetilación del gen *MLH1* [49]. Los patrones de metilación de *BRCA1* (el cual está involucrado en la reparación del ADN) también ha sido bien estudiado en CM y ovario [50].

El silenciamiento de genes involucrados en procesos de adhesión celular silenciados por metilación, por ejemplo, el gen *CDH1* (E-caderina) y el gen *CDH13* (H-caderina), puede que conlleven a la invasión de tejido y/o metástasis, y por lo tanto a la progresión del tumor [51].



### **1.7.5 Biomarcadores de metilación del ADN**

A pesar de la cantidad de información que se tiene sobre el proceso de carcinogénesis, aun se requiere de nuevas herramientas poderosas que permitan detectar con tiempo patrones moleculares que pudieran dar indicios de cómo tratar con una mayor probabilidad de éxito a un paciente con cáncer. Los biomarcadores oncogénicos son una de estas herramientas ampliamente usadas y que sigue en constante desarrollo. Los biomarcadores pueden ser moléculas como proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos, siempre y cuando puedan ser usados como indicadores de la tumorogénesis. Estos se usan principalmente, aparte de en el diagnóstico oportuno de algún tipo de padecimiento, para el pronóstico, predicción de la respuesta a una terapia determinada, el monitoreo de la terapia o el asesoramiento del riesgo que se tiene de resurgimiento del cáncer una vez pasado por la remoción del tumor (en caso de tumores sólidos). Los biomarcadores de uso clínico además deben cumplir con los siguientes parámetros: Fácil detección y medición, mínimamente invasivos, selectivos y específicos. Los biomarcadores de ADN tienen ventajas sobre los demás debido a que son relativamente fáciles de aislar a partir de diferentes muestras, el ADN es estable y se requiere en poca cantidad (en comparación con los otros tipos de biomarcadores) para realizarle análisis. Recientemente se ha sugerido que los cambios en los patrones de metilación del ADN pueden que proporcionen una ventaja en el seguimiento de la progresión del cáncer [52].

La hipermetilación del ADN tiene varias ventajas con respecto a su uso como biomarcador tumoral. Esto debido al dinamismo que muestra el metiloma durante la progresión del tumor; es decir, los genes que estarán metilados dependerán del estadio en el que se encuentre el tumor y el tipo de tejido a partir del cual se generó; al menos esto último para ciertos genes. Estos pueden servir para detectar estadios tempranos o pre malignos de una enfermedad o para asesorar sobre el riesgo de progresión hacia el estado maligno del tumor. Esta información puede ser crucial para escoger el tratamiento correcto para un determinado paciente y para evitar el uso innecesario de terapias agresivas. Las

anormalidades de metilación del ADN puede que ocurran en un estadio neoplásico muy temprano o puede que incluso afecten genes que no estén directamente relacionados con la tumorigénesis, pero de igual manera conferirán un fenotipo mutante [53].

Es importante mencionar que algunos genes afectados por la metilación no necesariamente contribuyen explícitamente con la tumorigénesis, de tal manera que estos pudieran considerarse biomarcadores tentativos. Con el propósito de diagnóstico, será suficiente probar que existe una correlación entre los patrones de metilación y el desarrollo tumoral.

### **1.7.6 Metilación del gen *RASSF1A***

La proteína 1 poseedora de un dominio de asociación a RAS, es una proteína que en humanos es codificada por el gen *RASSF1*.

Este gen codifica una proteína similar a las proteínas efectoras de RAS. Una pérdida o alteración en la expresión de ese gen ha sido asociado con la patogénesis de una variedad de cánceres, lo que sugiere la función como supresor de tumores de este gen. La baja en la expresión del gen ha sido correlacionada con la metilación de su región promotora. La proteína codificada por este gen se ha encontrado que interactúa con la proteína de reparación del ADN XPA. La proteína también se ha mostrado que inhibe la acumulación de la ciclina D1, y por lo tanto detiene el ciclo celular. Hasta el momento se han reportado siete variantes por *splicing* alternativo de este gen que codifican diferentes isoformas, dentro de las cuales esta *RASSF1A*.

Existen varios reportes que resaltan el valor predictivo de la metilación de *RASSF1A* como un evento relacionada con un mal pronóstico, así como un mayor riesgo de recaída y tasas de supervivencia bajas en pacientes con CM[54-56]. Sin embargo no existen muchos estudios que relacionen la metilación de *RASSF1A* con su expresión y esto a su vez cómo pudiera estar relacionado, tanto a los diferentes estadios y/o subtipos de CM, como a los sitios específicos que presentan metilación y en qué proporción, ya que existen reportes de que la

metilación de dinucleótidos CpG únicos son capaces de reducir significativamente la expresión de otros genes como *PMP24*, *IL6*, y *ZAP-70* en otras patologías [57-59].

### 1.7.7 Conversión del ADN con bisulfito

El tratamiento con bisulfito es el estándar de oro en cuanto a técnicas empleadas para revelar patrones de metilación. Al tratar el ADN con bisulfito sus citosinas se transforman a uracilos, los cuales, después de una reacción de amplificación, serán cambiados por timinas. Lo anterior se cumple siempre y cuando la eficiencia del tratamiento sea del 100% y que las citosinas no presenten grupos metilos, ya que en estos últimos casos, al estar las citosinas metiladas, estarán protegidas contra el tratamiento con bisulfito y no serán transformadas a uracilos y por consiguiente tampoco a timinas. Este proceso resulta bastante útil en los estudios de metilación del ADN ya que, utilizando técnicas sencillas basadas en una amplificación selectiva de secuencias metiladas o no metiladas o usando técnicas más sofisticadas como la secuenciación, uno puede discernir fácilmente cuáles son las citosinas que presentan metilación y cuáles no. En la figura 5 se muestra una representación gráfica de lo que sucede al tratar el ADN con bisulfito.

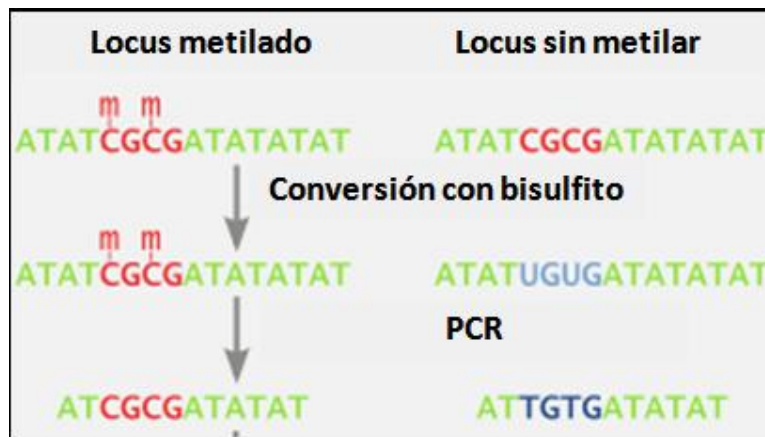


Figura 5. Representación gráfica del tratamiento con bisulfito. Como se puede observar, la metilación previene que las citosinas sean transformadas a uracilos durante el tratamiento con bisulfito.

## Capítulo 2

### 2. Justificación

El CM es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial y el número de casos ha seguido en aumento en comparación con otras neoplasias, como el cáncer cervicouterino.

Es importante encontrar herramientas que nos ayuden a detectar tempranamente los casos de CM, así como el poder evaluar el pronóstico en estas pacientes.

Los biomarcadores, específicamente los de metilación del ADN, resultan de gran interés, ya que nos permiten analizar el dinamismo que muestra el metiloma durante la progresión del tumor. Estos cambios pueden relacionarse con estadios o clasificaciones específicas de los tipos de CM.

Actualmente existen muchos reportes sobre la hipermetilación de la región promotora del gen *RASSF1A* empleando técnicas de baja resolución y sensibilidad que analizan sólo unos cuantos sitio CpG y los resultados mostrados no son lo suficientemente representativos como para poder determinar un estado metilado generalizado del gen.

La secuenciación por bisulfito permite analizar un gran número de sitios CpG en busca de un estado metilado o sin metilar y por lo tanto analizar patrones y proporciones de metilación en la región promotora del gen, los cuales pudieran estar asociados a su silenciamiento, así como a otros aspectos de la enfermedad como el estadio del tumor o datos clínicos propios de las pacientes, lo cual pudiera ayudar a generar un mejor diagnóstico de este padecimiento.

## Capítulo 3

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar el estado de metilación de la región promotora y su efecto con la expresión del gen *RASSF1A* en pacientes con CM.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Integrar un biobanco de muestras de tumores y sangre periférica para obtener ADN genómico y ARN mensajero.
2. Detectar y evaluar los patrones de metilación presentes en la región promotora del gen *RASSF1A*.
3. Medir los niveles de expresión del gen *RASSF1A*.
4. Correlacionar la metilación del promotor de *RASSF1A* con sus niveles de expresión.

## **Capítulo 4**

### **4. Materiales y métodos**

#### **4.1 Recolección de muestras**

##### **4.1.1 Desarrollo de una red de colaboración para la recolección de muestras**

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” bajo el número de registro B113-008. Una vez aprobado el protocolo se inició el reclutamiento de pacientes. En este proyecto participan tres instituciones: El Hospital Universitario (HU) Dr. José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Hospital San José del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (HSJ) y la Unidad Médica de Alta Especialidad 23 del Instituto Mexicano del Seguro Social (UMAE 23 IMSS) con el fin de formar una red de colaboración integrada por instituciones tanto públicas como privadas

##### **4.1.2 Reclutamiento de pacientes**

Una vez establecida la red de colaboración y teniendo el protocolo aprobado por el comité de ética, se realizó la recolección de muestras, invitando a participar en el estudio a pacientes que tuvieran diagnóstico confirmado de CM y que no se les hubiera aplicado algún tipo de tratamiento/terapia. Una vez que las pacientes aceptaban participar, se les solicitó firmar el consentimiento informado, se les entrevistó para recaudar información personal y de relevancia para el estudio y finalmente se les tomó una muestra de sangre (3-4 ml. aprox.) para separar suero, plasma y el paquete de leucos. Todas las muestras de pacientes se codificaron para guardar la confidencialidad de las pacientes y facilitar su identificación en el laboratorio.

### **4.1.3 Integración de una colección de tumores y controles para los estudios de secuenciación y expresión.**

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3200 rpm para separar el suero y plasma, los cuales se almacenaron a -80°C en tubos con códigos de barra para su fácil identificación, mientras que el paquete celular restante se utilizó para extraer el ADN.

La recolección de muestras de tumores incluyó recolección de tejido fresco y/o tejido embebido en parafina.

Los tejidos embebidos en parafina se almacenaron a 4°C hasta el momento de ser procesados para la obtención de ADN y ARN. Los tejidos frescos se colocaron en tubos de 2 ml con RNAlater para evitar la degradación del ARN durante su transporte. Una vez en el laboratorio, los tejidos frescos fueron cortados longitudinalmente y una de las secciones se envió a patología para confirmar la naturaleza del tejido, mientras que la otra mitad se procesó al momento para obtener ADN y ARN lo menos degradados posible.

## **4.2 Extracción de ácidos nucleicos (ADN/ARN)**

### **4.2.1 Extracción de ADN de sangre**

El paquete celular de las muestras de sangre se separaban en alícuotas de 500 µl y se procesaban empleando la técnica llamada TSNT, en la cual se emplea un buffer de lisis de TSNT (1% Tritón, 1% SDS, 100mM NaCl, 10 Mm Tris – HCl Ph 8.0 y 1 Mm EDTA), seguido de una extracción con fenol – SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 v/v). El ADN se resuspendió en buffer TE 1X (10Mm Tris Ph 8.0 y 1 Mm EDTA) y se almacenó a 4°C hasta su uso, el resto de las alícuotas se almacenaron a -80°C en tubos etiquetados con un código de barras para su fácil identificación.

#### **4.2.2 Extracción de ADN y ARN de tejido embebido en parafina**

Para la extracción simultánea de ADN y ARN a partir de tejido embebido en parafina se utilizó el kit AllPrep DNA/RNA FFPE de Qiagen, Venlo, Holanda. Se procesaron cilindros de dos milímetros de diámetro tomados específicamente de la zona tumoral. Con un bisturí se removió el exceso de parafina y se cortó el cilindro lo más fino posible para aumentar el área superficial del tejido. Posteriormente se realizó proceso de desparafinización con 640 µL del reactivo Paraffin Dissolver de la casa comercial MACHEREY – NAGEL, Düren, Alemania.

Una vez que se removió la parafina de los tejidos, estos fueron incubados según las especificaciones del fabricante en un buffer de lisis que contiene proteinasa K (Qiagen, Venlo, Holanda). Bajo estas condiciones, el ARN queda resuspendido en la solución, mientras que el ADN genómico permanece en el fondo de tubo junto con el resto del material insoluble. Los tubos con las muestras fueron centrifugados y se recuperó la fase acuosa para seguir con la extracción de ARN, mientras que la pastilla de los restos del tejido se utilizó para la extracción de ADN.

El sobrenadante que contiene el ARN se incubó a 80°C por 15 minutos y una vez transcurrido este tiempo se agregaron 320 µl del buffer RLT y 720 o 1120 µl de etanol al 70% v/v con el fin de generar las condiciones adecuadas para la fijación del ARN a la columna de extracción Rneasy MinElute spin column. La muestra se paso en series de 700 µl por la columna y una vez que toda la muestra había pasado por la columna esta se trató con el buffer de lavado FRN y posteriormente se incubó la columna con una mezcla de buffer RDD y DNasal (70 y 5 µl respectivamente) a temperatura ambiente por 15 minutos para digiere los restos de ADN genómico contaminante. Después la columna se lavó, primero, con 500 µl de buffer FRN y después dos veces con 500 µl de buffer RPE para remover contaminantes y finalmente el ARN se eluyó con 20 µL de agua libre de ARNasas y se almaceno a -80°C. En caso de obtener una buena cantidad de ARN, [ $>50$  ng/µl] se realizaba una segunda elución con 10µl de agua libre de ARNasas.



La pastilla que contenía los restos del tejido, y el ADN, se resuspendió en una mezcla de 180 µl de buffer ATL y 40 µl de proteinasa K y posteriormente se incubó, primero, a 56°C por una hora y después a 90°C por dos horas. La muestra se mezcló con 200 µl de buffer AL y 200 µl de etanol para optimizar las condiciones de fijación de las moléculas de ADN con la columna QIAamp MinElute spin column. Una vez que la muestra ha pasado por la columna, esta se lavó primero con 700 µl de AW1, después con 700 µl de AW2, y al final con 700 µl de etanol al 100% para remover contaminantes. Después de los lavados el ADN se eluyó con 50 µl de buffer ATE (Se incubó la columna con el buffer ATE un minuto a temperatura ambiente antes de eluir).

#### **4.2.3 Extracción de ADN y ARN de tejido fresco.**

Los tejidos frescos se lisaron y homogenizaron en buffer (RLT plus) que contiene isotiocianato de guanidina, el cual inactiva inmediatamente las ADNasas y ARNasas para asegurar la extracción de ADN y ARN intactos. Posteriormente el lisado se pasó por una columna (AllPrep DNA spin column Qiagen, Venlo, Holanda) que junto con el buffer RLT plus, permite la fijación selectiva del ADN genómico. Después la columna se lavó con 500 µl del buffer AW1 y después con 500 µl del buffer AW2. Finalmente el ADN se eluyó con 100 µl de buffer EB.

El filtrado de la columna de ADN se recolectó y se le agregó un volumen de etanol al 70% para proveer las condiciones óptimas de fijación del ARN a la columna (RNeasy spin column) donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes fueron lavados con 700 y 500 µl de los buffers RW1 y RPE respectivamente. Finalmente el ARN se eluyó con 40 µl de agua libre de ARNasas.

#### **4.3 Cuantificación de los ácidos nucleicos**

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó utilizando el equipo NanoDrop 2000 de Thermo Scientific y midiendo la absorbancia a 260 nm. Se procuró obtener valores de la relación de absorbancia 260/280 de entre 1.8 y 2.0 y de la relación 260 nm / 230 nm mayores a 2.0.

#### 4.4 Tratamiento del ADN genómico con bisulfito.

El tratamiento con bisulfito se realizó usando el kit “EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit” de Qiagen, Venlo, Holanda.

Lo primero que se llevó a cabo fue el tratamiento con la solución de bisulfito. Para esto se preparo una mezcla en tubos de 200  $\mu$ l que contenía: un volumen máximo de 20  $\mu$ l (muestras 1 ng–2  $\mu$ g) o 40  $\mu$ l (muestras 1–500 ng) de ADN de la muestra de interés, siempre y cuando no sobrepasen los 2  $\mu$ g totales de ADN, agua libre de ARNasas (variable), 85  $\mu$ l de la solución de bisulfito y 35  $\mu$ l (si el volumen máximo de ADN y agua es 20  $\mu$ l) o 15  $\mu$ l (si el volumen máximo de ADN y agua es 40  $\mu$ l) del reactivo DNA protect buffer. El volumen final de la reacción fue de 140  $\mu$ l y esta se incubó en el termociclador en las condiciones que se muestran en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Tiempos y temperaturas de incubación para la conversión del ADN con la solución de bisulfito.**

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	10 min	60°C
Desnaturalización	5 min	95°C
Incubación	10 min	60°C

Una vez concluido el periodo de incubación se procedió a realizar el lavado del ADN recién tratado con bisulfito. Primero se pasó todo el contenido de la reacción a tubos de 1.5  $\mu$ l y se les agregaron 310  $\mu$ l del buffer BL y 250  $\mu$ l de etanol al 100% y se mezcló por vortex. Después toda la mezcla se transfirió a las columnas MinElute DNA spin columns y se centrifugó para pasar toda la muestra a través de la membrana de sílica y que todo lo que no fuera ADN fuera filtrado. Después, el ADN adherido a la membrana de sílica se lavó añadiendo 500  $\mu$ l de buffer BW a la columna y centrifugando a máxima velocidad por un minuto. Después de eliminar el filtrado de la columna, se le agregaron 500  $\mu$ l de buffer BD y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente (15 – 25°C). Una vez transcurrido el periodo de incubación la columna se centrifugó y se elimino el

filtrado y se procedió a lavar la columna a través de ciclos de lavado y centrifugado, primero con 500 µl de buffer BW a máxima velocidad por un minuto, después un segundo lavado igual que el anterior y finalmente un último lavado con 250 µl de etanol al 100% centrifugando a máxima velocidad por un minuto. Después de los lavados, la columna se colocó en un tubo nuevo y se centrifugo una vez más para eliminar cualquier resto de etanol que pudiera haberse quedado en la columna y finalmente el ADN adherido en la membrana de sílica se eluyó con un volumen de 15 µl de Buffer EB. La columna con el buffer EB se incubó por un min a temperatura ambiente después se centrifugo un minuto a 12,000 rpm y el ADN obtenido se cuantificó como se describió anteriormente. Cabe mencionar que las lecturas en el nanodrop se realizaron como si fuera ADN de cadena sencilla lo que se está cuantificando. Una vez cuantificado, el ADN convertido con bisulfito se almaceno a -80°C hasta su uso.

#### 4.5 Conversión del ARN a ADN complementario (ADNc).

Para la generación del ADNc se empleó la técnica de transcripción reversa utilizando el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” de Applied Biosystems®, Waltham, EUA.

Lo primero que se llevó a cabo fue una mezcla maestra con todos los reactivos necesarios para la generación del ADNc en el orden y las cantidades indicadas en el Cuadro 5.

<b>Cuadro 5. Cantidades de los reactivos empleados en la reacción de retrotranscripción.</b>		
<b>Componente</b>	<b>Concentración Inicial</b>	<b>Concentración Final</b>
<b>RT Buffer</b>	10X	1X
<b>dNTP Mix (100 mM)</b>	25X	2.5X
<b>RT Random Primers</b>	10X	1X
<b>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</b>	50 U/µL	5 U/µL
<b>RNase Inhibitor</b>	10 U/µL	1 U/µL
<b>Agua libre de nucleasas</b>	-	-
<b>Volumen Final</b>	10	-

Después, los 10 µl de la mezcla de reacción se les agregaron 10 µl de la muestra de ARN para obtener un volumen final de 20 µl por reacción. Posteriormente los tubos con la mezcla se introdujeron al termociclador. Las temperaturas y tiempos del termociclador se muestran en el Cuadro 6.

<b>Cuadro 6. Tiempos y temperaturas programadas en el termociclador para la generación del ADNc</b>		
<b>Paso</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>1</b>	10	25
<b>2</b>	120	37
<b>3</b>	5	85

Una vez que concluyó el programa del termociclador las muestras se cuantificaron en el nanodrop utilizando la opción de ADN de cadena sencilla y después se guardaron a -20 °C hasta su uso en los ensayos de expresión.

#### **4.6 Amplificación de la región promotora de *RASSF1A*.**

Para poder realizar la amplificación de la región promotora del gen *RASSF1A* primero se determinó la secuencia que se iba a analizar. Para esto lo primero que se realizó fue la obtención de la secuencia genómica del gen *RASSF1A* en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés). Una vez que se había localizado la secuencia (numero de acceso: NC\_000003), se utilizó una herramienta de la misma página del NCBI que permite resaltar los exones del gen que se está analizando. Se seleccionaron 1391 bases de la secuencia, la cual incluía todo el exón uno así como 709 bases río arriba del inicio del exón uno y 301 bases río abajo del final del exón 1.

Una vez que se localizó la secuencia de trabajo, lo siguiente fue encontrar la isla CpG más cercana al exón uno del gen *RASSF1A*. Para esto se utilizó el navegador genómico de la base de datos de la Universidad de California, Santa Cruz (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>) y se detectó una isla

CpG de 737 bases de largo que incluye todo el exón 1. Una vez encontrada la isla CpG y el exón uno se decidió trabajar específicamente sobre una región que se encuentra 300 bases río arriba del codón de inicio de la traducción la cual está reportada como la región de mayor actividad promotora.

#### **4.6.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para ADN convertido con bisulfito.**

Una vez que se había determinado la región que se iba a analizar, se procedió a realizar el diseño de los oligonucleótidos, los cuales fueron empleados para amplificar la región a estudiar y posteriormente se realizaron los estudios de metilación pertinentes.

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el programa Oligo7 y nuestra secuencia de trabajo seleccionada previamente. Debido a que se trabajó con ADN tratado con bisulfito, la secuencia que se usó fue una secuencia que simuló haber sido tratada con bisulfito, por lo que todas las citosinas de la secuencia se cambiaron por timinas, asumiendo un estado totalmente ausente de metilación. En el diseño de oligonucleótidos existen una serie de parámetros que se deben tomar en cuenta para asegurar que nuestros oligonucleótidos serán capaces de amplificar sin mayor complicación la secuencia a estudiar y al trabajar con ADN tratado bisulfito se debe considerar aparte que los oligonucleótidos tengan un tamaño por encima de los 24 pares de bases (pb) y, específicamente en el caso de la secuenciación con bisulfito, que los oligonucleótidos no contengan ningún dinucleótido CpG. Adicionalmente, para este estudio se trabajó con ADN extraído de muestras de tejido embebido en parafina, por lo que para el diseño de oligonucleótidos también se consideró estudiar una región que no sobrepasara los 200 pb para evitar problemas en la amplificación causados por una degradación excesiva del material genético. Después de considerar los parámetros para el diseño de oligonucleótidos, para este estudio específicamente, se obtuvieron un par de oligonucleótidos los cuales flanquean la región de interés.

#### 4.6.2 Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la región promotora de *RASSF1A*.

Una vez que teníamos los oligonucleótidos y el ADN, procedimos a realizar las primeras pruebas para determinar las condiciones óptimas para la amplificación de la región promotora de *RASSF1A*. Primero, se tomó el programa de amplificación que viene pre-programado en el termociclador como base y a partir de este se le hicieron ciertas modificaciones según lo que se reporta al trabajar con ADN convertido con bisulfito. El Cuadro 7 muestra los pasos y las temperaturas que se utilizaron en el programa para amplificar la región promotora de *RASSF1A*. Después se realizó una prueba con una PCR con gradiente de temperatura (56°C – 61°C) para encontrar la temperatura óptima de alineamiento para nuestro par de oligonucleótidos. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un reactivo comercial llamado GoTaq Master Mix, Promega, Madison, EUA, el cual incluye todo lo necesario para llevar a cabo una PCR, solo hace falta agregar el ADN, los oligonucleótidos y el agua miliQ. Adicionalmente se realizó una prueba con diferentes concentraciones de oligonucleótidos (0.08, 0.16, 0.24, 0.32 y 0.4µM) para determinar la concentración óptima para nuestra reacción.

<b>Cuadro 7. Condiciones del programa “RASSF1A” para la amplificación de la región promotora del gen <i>RASSF1A</i></b>						
	<b>Etapa 1</b>		<b>Etapa 2</b>		<b>Etapa 3</b>	<b>Etapa 4</b>
<b>°C</b>	<b>95.0</b>	95.0	57.0	72.0	72.0	14.0
<b>Minutos</b>	<b>5:00</b>	0:30	0:30	1:00	10:00	∞
	<b>Paso 1</b>	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 1	Paso 1

#### 4.6.3 Amplificación de la región promotora del gen *RASSF1A* en muestras de pacientes con CM.

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas para amplificar la región promotora de *RASSF1A* se procedió a realizar la amplificación del promotor en las muestras de pacientes con CM. Para esto se utilizaron entre 5, 10 o 20 ng de ADN convertido por muestra así como 12.5 µl de la solución Master Mix GoTaq y 1 µl

de cada uno de los dos oligonucleótidos y una cantidad variable de agua milliQ que dependió de la cantidad de muestra de ADN empleada. Una vez concluido el programa del termociclador, se tomaron 5 µl de muestra y se mezclaron con 2 µl de jugo azul 1X y se cargaron en un gel de agarosa al 3% y se corrieron por 30 minutos a 90V en una cámara de electroforesis. Una vez transcurrido el tiempo de corrida el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio a 0.5 µg/ml por 15 min. Después el gel se enjuagó en un contenedor con buffer TAE 1X por 10 minutos y una vez transcurrido el tiempo, se colocó en el fotodocumentador para analizar los resultados.

#### **4.7 Secuenciación por bisulfito**

Al tener los amplicones generados por la PCR a partir del ADN convertido con bisulfito, lo siguiente que se realizó fue la secuenciación de estos.

##### **4.7.1 Purificación de los amplicones**

Como primer paso dentro del proceso de secuenciación de los amplicones esta la purificación de estos ya que en la reacción de PCR aparte de tener productos amplificados (amplicones), también hay oligonucleótidos y nucleótidos libres que, de no eliminarse, podrían generar problemas a la hora de la reacción de secuenciación. Por lo anterior se utilizó el reactivo ExoSAP-IT de Affymetrix, Santa Clara, EUA, para la eliminación de estos agentes. Para esto se tomaron 7 µl de la reacción de PCR y se mezclaron con 3 µl de ExoSAP-IT. Después los 10 µl de reacción se incubaron 15 minutos a 37°C y después 30 minutos a 80°C. Una vez concluidos los periodos de incubación los amplicones estuvieron listos para realizar la reacción de secuenciación.

##### **4.7.2 Reacción de secuenciación**

Después de haber purificado los amplicones el siguiente paso fue llevar a cabo la reacción de secuenciación. La técnica de secuenciación por bisulfito se basa en la secuenciación Sanger por lo que para poder realizarla se requieren los

reactivos necesarios en una reacción de secuenciación Sanger convencional y además trabajar con ADN convertido con bisulfito.

Los 10  $\mu\text{l}$  de amplicones purificados que se obtuvieron después del tratamiento con ExoSAP-IT, se separaron en fracciones de 5  $\mu\text{l}$  a las cuales se les agregó, a una de ellas, 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido delantero (Forward), 1  $\mu\text{l}$  de solución BigDye® (Solución comercial de Life Technologies cuyo reactivo principal son los dideoxinucleotidos marcados con fluorescencia los cuales funcionan como terminadores de la polimerización) y 3  $\mu\text{l}$  de agua milliQ, para la otra fracción de 5  $\mu\text{l}$  se le agregaron las mismas cantidades de reactivos solo que en vez del oligonucleótido delantero se puso 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido reverso. Al final se tuvieron dos reacciones de 10  $\mu\text{l}$  por muestra, una para el oligonucleótido delantero y otra para el reverso. Después los tubos con las reacciones se introdujeron al termociclador y se corrió el programa de secuenciación cuyos parámetros se muestran en el Cuadro X. Una vez concluido el programa de secuenciación las muestras se sometieron a un último tratamiento de purificación antes de poder ser analizadas por electroforesis capilar.

#### **4.7.3 Purificación de la reacción de secuenciación.**

Una vez que concluida la reacción de secuenciación el siguiente paso fue eliminar todos los terminadores sin incorporar, así como el exceso de sales. Para esto se uso el reactivo comercial, BigDye Xterminator de Life Technologies.

A los 10  $\mu\text{l}$  de la reacción de secuenciación se le agregaron 45  $\mu\text{l}$  de SAM (solución estabilizadora que viene con la solución del Xterminator) y 10  $\mu\text{l}$  de Xterminator para obtener un volumen final de 65  $\mu\text{l}$  por reacción. Hay que resaltar que al manipular la solución Xterminator es necesario estar mezclando con vortex constantemente para evitar que se asiente. Una vez que a todas las muestras estuvieron listas, estas se pusieron en agitación en vortex por 30 minutos y una vez concluidos los 30 minutos las muestras se centrifugaron a 1000 x g por dos minutos para asegurar que todas las perlas de la solución de Xterminator se separan de la fase acuosa.



#### **4.7.4 Electroforesis capilar**

Una vez concluida la purificación de la reacción de secuenciación, el último paso consistió en tomar 30  $\mu$ l de la fase acuosa, procurando dejar siempre algo de volumen de la fase acuosa para evitar pipetear perlas de la solución Xterminator, y pasarlos a una placa ABI, la cual posteriormente se colocó en el equipo de electroforesis capilar 3130 Genetic Analyzer.

#### **4.7.5 Procesamiento de las lecturas de secuenciación.**

Una vez concluida la corrida en el equipo de electroforesis capilar, los archivos (.ab1) de las lecturas obtenidas se procesaron y analizaron en el programa Gene Studio. Al abrir el programa primeramente se importaron los archivos a analizar y se procedió a realizar el análisis del electroferograma para “curar” las lecturas al corrigiendo cualquier error que el equipo pudiera haber generado por un empalme de picos o por estar muy próximos uno del otro y se determinó cuál era la región que contenía una mejor calidad en la lectura. Además se realizó el alineamiento de las lecturas obtenidas con nuestra secuencia de referencia para determinar si lo que se obtuvo en las lecturas de secuenciación correspondía a lo esperado. Para realizar los alineamientos se utilizó la herramienta informática Clustal  $\Omega$ . Para estos ensayos se utilizaron ADN de: sangre, como control negativo para metilación y un ADN genómico humano completamente metilado (Cells-to-CpG<sup>TM</sup> Methylated gDNA control, Life Technologies, Carlsbad, EUA).

#### **4.8 Cuantificación de la expresión por qPCR**

Para los ensayos de expresión se utilizó el ADNc obtenido a partir de las muestras de ARN extraído de los tejidos embebidos en parafina empleando la técnica de PCR en tiempo real. Sin embargo antes de realizar los ensayos de expresión se realizaron algunas pruebas para determinar las cantidades de ADNc que se emplearían por reacción, así como el control endógeno que se utilizaría para determinar la expresión por el método de  $\Delta\Delta$ Ct. Todos los ensayos de expresión se realizaron en el equipo StepOnePlus<sup>TM</sup> (Life Technologies, Carlsbad,

EUA) y los resultados se analizaron con el programa StepOne software versión 2.2.2 de Life Technologies. Las condiciones de la reacción de tiempo real se muestran en el cuadro 8.

#### 4.8.1 Selección del control endógeno.

Uno de los pasos cruciales en la determinación de los niveles de expresión por qPCR es la selección de un control endógeno apropiado. Para esto se realizó como prueba una curva estándar de seis puntos de una muestra de tejido fresco normal amplificando tres genes: ARN ribosomal 18S, GAPDH y  $\beta$ -actina. Los reactivos y cantidades de la qPCR se muestran en el Cuadro X. Se incluyeron dos controles negativos por cada sonda (agua milliQ en lugar de ADNc) Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado en placas de 96 pozos. Para la curva se prepararon seis estándares de la muestra de ADNc de tejido normal diluidos secuencialmente en una proporción de 1:2. Después de haber realizado la curva se decidió utilizar a *GAPDH* como control endógeno debido a que presentó patrones de expresión similares a *RASSF1A*.

<b>Cuadro 8. Reactivos y cantidades empleadas en la reacción de qPCR.</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (<math>\mu</math>l/rxn)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	variable
<b>Sonda</b>	1
<b>Master Mix (2X)</b>	10
<b>ADNc</b>	variable
<b>Total</b>	20

#### 4.8.2 Estandarización de la qPCR.

Una vez que se determinó que control endógeno se iba a utilizar, lo siguiente fue determinar la cantidad de ADNc que se utilizaría por reacción. Para esto se realizó una curva estándar a cinco puntos por triplicado con cada una de las dos sondas que se utilizarían: *GAPDH* (control endógeno) y *RASSF1A*. Las reacciones se prepararon como se describió anteriormente y se incluyeron dos controles negativos para cada una de las sondas. Una vez concluida la qPCR, se observó que la cantidad óptima de ADNc era de 800ng por reacción.

#### **4.8.3 Amplificación de las muestras de tumor y tejido normal por qPCR.**

Se realizaron los ensayos de expresión en las muestras de ADNc obtenido a partir de ARN extraído de tejidos tumorales y normales embebidos en parafina. Para esto se prepararon las reacciones como se mencionó anteriormente pero en este caso por duplicado para cada una de las sondas.

#### **4.8.4 Determinación de los niveles de expresión en las muestras de CM**

Una vez que se obtuvieron los resultados de expresión de las muestras problema, se tomó únicamente el valor de Ct para cada uno de los dos genes estudiados, el cual indica el ciclo al cual la muestra estaba en la fase logarítmica de la qPCR, y estos se compararon contra el Ct del gen endógeno para obtener el primer  $\Delta$ Ct, y a su vez, el resultado se comparo contra el  $\Delta$ Ct obtenido entre el gen problema y el endógeno pero en una muestra de tejido normal para obtener el  $\Delta\Delta$ Ct. La muestra de tejido normal fue nuestra referencia y presentó un valor de uno, mientras que las demás muestras presentan valores por encima o por debajo de uno, representando un aumento o un decremento en la expresión del gen problema.

## Capítulo V. Resultados.

### 5.1 Recolección de muestras.

Entre enero y junio del 2014 se reclutaron un total de 48 pacientes. De estas se obtuvieron un total de 20 tumores y 34 muestras de sangre. En 12 pacientes se pudieron obtener muestras pareadas de tumor y sangre.

De todas las pacientes reclutadas el 43.75% de estas fueron reclutadas en el HSJ, el 31.25% en la UMAE #23 del IMSS y el 25% se reclutaron en el HU de la UANL.

A todas las pacientes reclutadas se les entrevistó para obtener información personal y clínica relevante para el estudio. A partir de la información obtenida de la hoja de recolección de datos se hizo un análisis de frecuencias y medias y se encontró lo siguiente:

- La media de edad para las paciente incluidas en el estudio, y que por consiguiente tenían diagnóstico confirmado de CM, fue de 56 años, en donde la paciente más joven tenía 26 años y la más longeva 88 años.
- En cuanto al Índice de Masa Corporal, el 3% de las pacientes presentó un valor por debajo de lo normal, el 29% de las pacientes presento uno normal, el 39% uno dentro de la categoría de sobrepeso y el 29% presento uno dentro de la categoría de obesidad
- En cuanto a los antecedentes heredofamiliares, se encontró que el 29% de las pacientes tenían antecedentes de cáncer en su familia, mientras que el 10% tenían algún familiar directo afectado por este padecimiento.
- De todas las pacientes, el 65% eran postmenopáusicas, mientras que el resto fueron pre-menopáusicas.

Todos los tumores y muestras de sangre recolectadas se procesaron como se mencionó anteriormente en la sección de materiales y métodos para los estudios de metilación y expresión pertinentes.

Para los estudios de metilación se analizaron cinco muestras pareadas (sangre y tumor del mismo paciente) y además otros cinco tumores independientemente de si tenían una muestra de sangre correspondiente. Para el caso de los estudios de expresión, se analizaron siete tumores y un tejido normal, el cual fue usado como control.

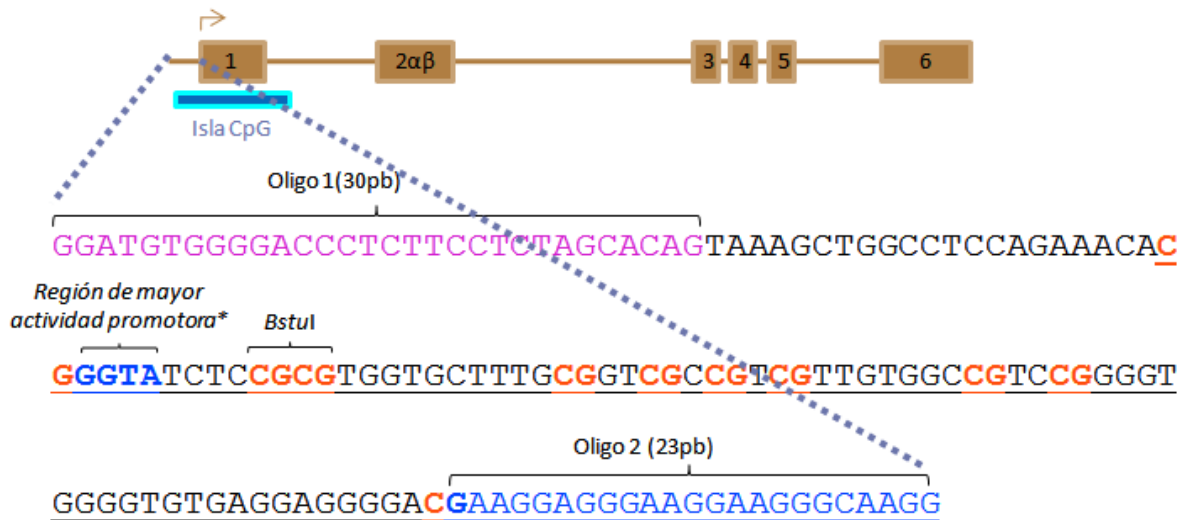
## **5.2 Detección y evaluación de los patrones de metilación presentes en la región promotora del gen *RASSF1A*.**

### **5.2.1 Amplificación de la región promotora del gen *RASSF1A* en muestras de pacientes con CM.**

Para la amplificación de la región promotora de *RASSF1A*, lo primero que se realizó fue el diseño de los oligonucleótidos que flanquearían la región de interés.

El oligonucleótido 5' tuvo un tamaño de 30 pb (5'-GGATGTGGGGATTTTTTTTTTTTAGTATAG-3'), mientras que el 3' sólo de 23 pb (5'-GAAGGAGGGAAGGAAGGGTAAGG-3'). Las temperaturas de alineamiento ( $T_m$ ) predichas con el programa Oligo7 para el oligonucleótido 5' y el 3' fueron de 57.7°C y 60.9°C, respectivamente, por lo que hipotéticamente la  $T_m$  óptima de nuestra reacción de amplificación es de 59 °C. En la figura 6 podemos observar un mapa de la región a estudiar del gen *RASSF1A*.

Después de haber obtenido los oligos, se determinó que la región a analizar tendría una longitud de 145 nucleótidos y esta cubriría un total de 10 dinucleótidos CpG, así como la región promotora del gen *RASSF1A*, tal y como se muestra en la figura 6.



**Figura 6. Mapa de la región a estudiar del gen *RASSF1A*.** En la parte superior, en color café, se puede observar la estructura del gen *RASSF1A* donde se destacan los seis exones que lo componen así como una isla CpG que abarca todo el exón 1. En la parte inferior se muestra la secuencia que se analizó. En color rosado se observa el oligonucleótido delantero, mientras que el oligonucleótido reverso está en color azul. En rojo se observan los dinucleótidos CpG y en azul intenso la región de mayor actividad promotora. En la parte central de la secuencia también se puede contemplar un sitio de corte para la enzima *Bstul*.

Los gels correspondientes a la estandarización (detección de la  $T_m$  óptima de los oligonucleótidos y cantidad de oligonucleótidos por reacción) se muestran en la figura 7. La temperatura óptima de alineamiento para los oligonucleótidos que se diseñaron fue de 57°C y es fácil apreciar que los amplicones generados en la PCR en la que se usó una  $T_m$  de 57°C, es donde se observa una mejor señal. Por otro lado, se muestra el gel correspondiente a la prueba con diferentes cantidades de oligonucleótidos, donde después de analizarla, se detectó que de las concentraciones finales utilizadas, la que presentó un mejor resultado fue la de 0.4μM (1μl de oligonucleótidos al 10μM por reacción).

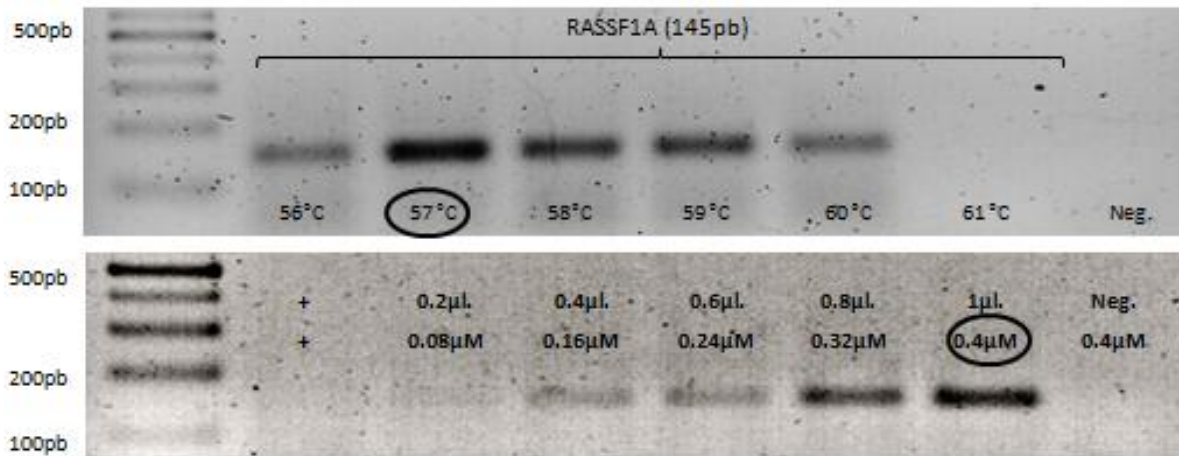


Figura 7. Pruebas para la estandarización de la PCR para amplificar la región promotora del gen *RASSF1A*.

Una vez realizada la estandarización de la PCR para amplificar la región promotora del gen *RASSF1A*, se procedió a llevar a cabo la PCR pero esta vez con el ADN que había sido tratado con bisulfito y extraído a partir de los tumores de pacientes con CM como se muestra en la figura 8.

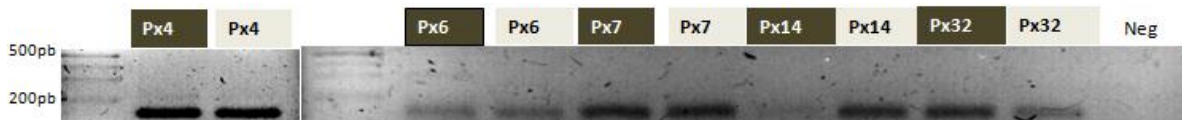


Figura 8. Amplificación de muestras representativas de la región promotora de *RASSF1A* a partir de ADN extraído de tumores de pacientes con CM

### 5.2.2 Secuenciación por bisulfito

Después de haber llevado a cabo la secuenciación y de analizar lo evidenciado por la electroforesis capilar, se analizaron y procesaron las lecturas obtenidas. Durante el procesamiento lo primero que se realizó fue la evaluación de nuestros controles de metilación para verificar que la conversión con bisulfito de ADN hubiera sido eficiente y para confirmar que la reacción de secuenciación diera los resultados esperados. Como se había mencionado anteriormente, en la sección de materiales y métodos, como controles positivos de metilación de utilizó un ADN genómico humano completamente metilado y como control negativo para metilación se utilizaron las muestras de sangre, ya que está reportado que estas pueden ser usadas de tal manera en este tipo de ensayos. En la figura 9 se

pueden observar los electroferogramas correspondientes a estos controles y constatar que, como se esperaba, el control positivo para metilación efectivamente mostró metilación en todos los sitios CpG que se alcanzaron a analizar con las lecturas obtenidas (6/10) en todas las muestras, mientras que la sangre (control negativo) presentó una ausencia total de metilación. Esto se confirma al realizar un alineamiento de las lecturas obtenidas con la secuencia de referencia (secuencia de nuestro amplicón convertida con bisulfito asumiendo ausencia de metilación) en donde se observa claramente que los sitios donde no hay similitud, en el caso del control de metilación contra la secuencia de referencia, es donde los dinucleótidos CpG presentan metilación. Las Citosinas (Cs) son protegidas contra el tratamiento con bisulfito por estar metiladas y en la lectura aparecen como Cs y no como Ts (en caso de no haber presentado metilación). Para el control negativo se realizó el mismo alineamiento y en este caso se observa una homología del 100% en todos los dinucleótidos analizados ya que ninguno de ellos presentó metilación y por lo tanto todas las Cs de los dinucleótidos CpG fueron cambiadas a Timinas (Ts). Otra forma más precisa de confirmar la veracidad de nuestros ensayos, es analizar los electroferogramas de los controles y como se puede observar en la figura 9, cada pico del electroferograma tiene un color diferente dependiendo del nucleótido que se esté leyendo. En el caso de las Cs, éstas se representan con picos de color azul, mientras que las Ts con picos de color rojo. En el electroferograma del control negativo para metilación se puede observar que en todos los sitios donde hay dinucleótidos CpG, sólo se encuentran picos de color rojo, lo que representa una T (ya que las Cs fueron cambiadas a Ts por el tratamiento con bisulfito) Mientras que en el electroferograma del control positivo para metilación, se pueden observar solamente picos de color azul, lo que corresponde a Cs de los dinucleótidos CpG que fueron protegidas contra el tratamiento con bisulfito, debido a que, efectivamente, presentaban metilación. Otro aspecto a considerar es sí la conversión con bisulfito se llevó a cabo correctamente y como se puede ver en los electroferogramas de ambos controles, los picos correspondientes a las Ts que



anteriormente eran Cs (antes de la conversión con bisulfito) se ven claramente como un sólo pico. Mientras que en el caso de que la conversión con bisulfito no hubiera sido eficiente, se hubieran observado dos picos traslapados, uno de color azul, correspondiente a las Cs que no fueron convertidas y otro pico rojo, correspondiente a las Cs que si fueron cambiadas a Ts. Como en el caso de ambos controles no se observa este evento podemos aseverar que la conversión con bisulfito fue eficiente.

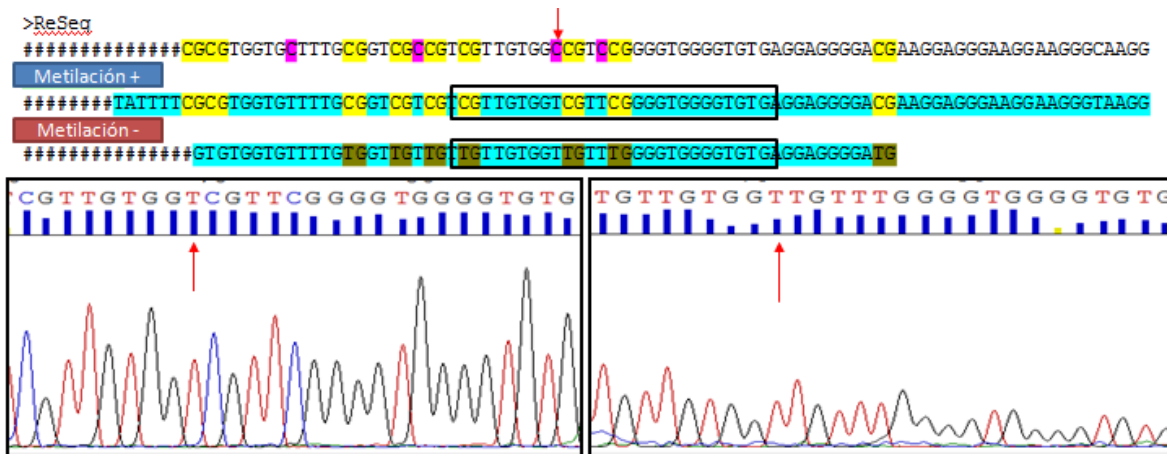


Figura 9. Lecturas y electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación de la región promotora de *RASSF1A* de los controles positivo (izquierda) y negativo (derecha) para metilación.

Una vez que se aseguró que la reacción de secuenciación fue exitosa y que la conversión con bisulfito fue cercana al 100%, se procedió a procesar las lecturas de la secuenciación correspondiente a las muestras de tumor y sangre. En la figura 10 se pueden observar los resultados obtenidos de la secuenciación de las 10 muestras de tumor y cinco de sangre. De las cinco muestras de sangre ninguna presentó metilación y de las 10 muestras de tumor, nueve presentaron metilación al menos en uno de los dinucleótidos CpG analizados que se cubrieron en las lecturas de secuenciación de todas las muestras, lo que correspondería a una frecuencia del 90% para este evento. De las 10 muestras de tumor, siete (70%) de ellas presentaron metilación en todos los dinucleótidos en común y de las 10 muestras de tumor analizadas, la lectura de siete de ellas alcanzó a cubrir

el sitio de restricción para *Bst*I, el cual consta de dos dinucleótidos CpG seguidos (CGCG), y de estas 7, seis (88%) presentaron metilación en estos dinucleótidos.

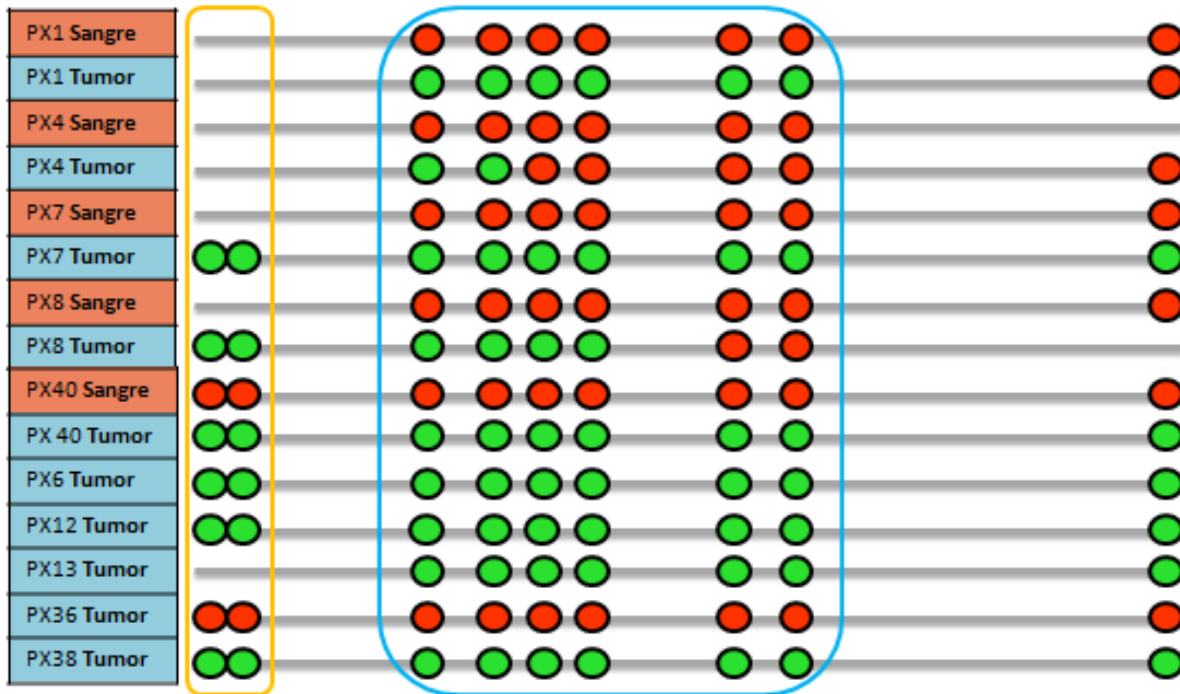


Figura 10. Representación grafica de los sitios CpG metilados en cada una de las muestras analizadas. Los círculos verdes representan dinucleótidos CpG metilados y los círculos rojos dinucleótidos CpG sin metilación.

### 5.3 Medición de los niveles de expresión de *RASSF1A*.

Para realizar los ensayos de expresión se realizó una curva estándar de *RASSF1A* con el control endógeno que se seleccionó (*GAPDH*), con el fin de determinar cuál sería la cantidad de ADNc necesaria para realizar los estudios de expresión en las muestras de pacientes. En la figura 11 se muestra en la parte superior la curva estándar para *RASSF1A* y *GAPDH*, usando ADNc que se generó a partir de ARN extraído de un tejido normal fijado en parafina. La curva se realizó a cinco puntos (4000, 2000, 1000, 500 y 250 ng de ADNc) por triplicado. En base a lo que se observa en la curva, se decidió trabajar con una cantidad de 2000ng (2µg) de ADNc por reacción. Mientras que en la parte inferior de la imagen se

muestra la grafica que demuestra que existe una linealidad en la curva estándar que se realizó y cómo se puede constatar, los valores de  $R^2$  son superiores a 0.99 y la eficiencia está por encima del 90% en el caso de *GAPDH* pero para *RASSF1A* fue de 82%

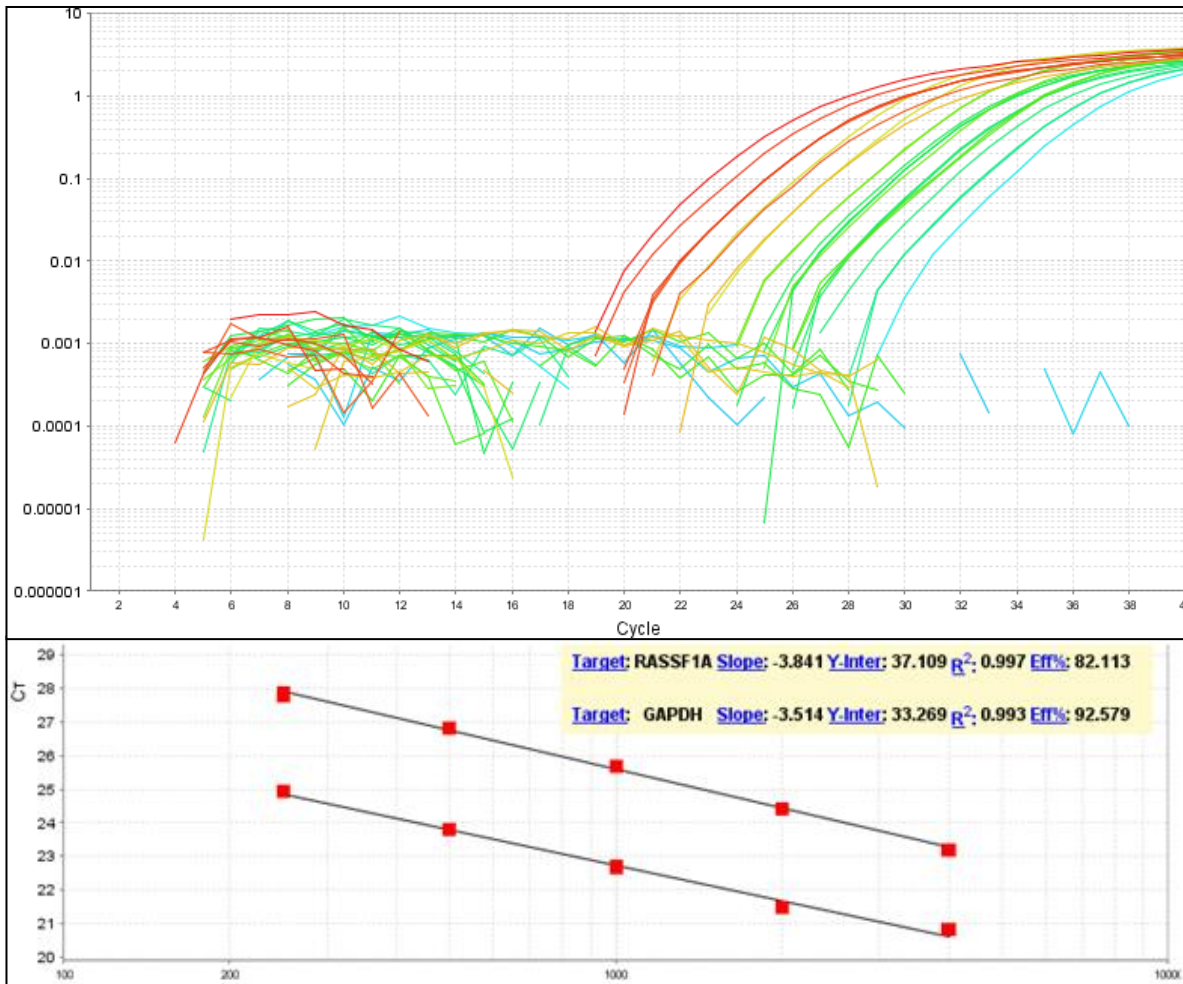


Figura 11. Curva estándar de *RASSF1A* y *GAPDH* usando ADNc de una muestra de tejido mamario normal.

Una vez que se determinó la cantidad de ADNc que se utilizaría para los ensayos de expresión en las muestras de CM, se procedió a realizar el análisis del ADNc obtenido a partir de tumores embebidos en parafina y una muestra de tejido normal para obtener el  $\Delta\Delta C_t$ . En la figura 12 se muestra la amplificación por qPCR de las muestras de tumor y utilizando el programa StepOne Software V2.2.2 se procedió a obtener los  $C_t$ s para cada una de las muestras con lo que se logró

calcular el  $\Delta Ct$  (diferencia entre el valor de Ct del gen problema y el gen endógeno en el tumor) y posteriormente el  $\Delta\Delta Ct$  (diferencia entre el  $\Delta Ct$  obtenido del gen problema y el endógeno en el tumor y el  $\Delta Ct$  obtenido del gen problema y el endógeno en una muestra de tejido normal). Una vez obtenidos estos valores, se realizaron los cálculos necesarios para obtener los valores de expresión relativa, donde el valor uno representa expresión normal (expresión del gen problema en el tejido normal) y los valores por encima de este representan sobreexpresión y los valores por debajo de estos representan una baja en la expresión. Después, los valores de expresión relativa se graficaron y los resultados se muestran en la figura 13.

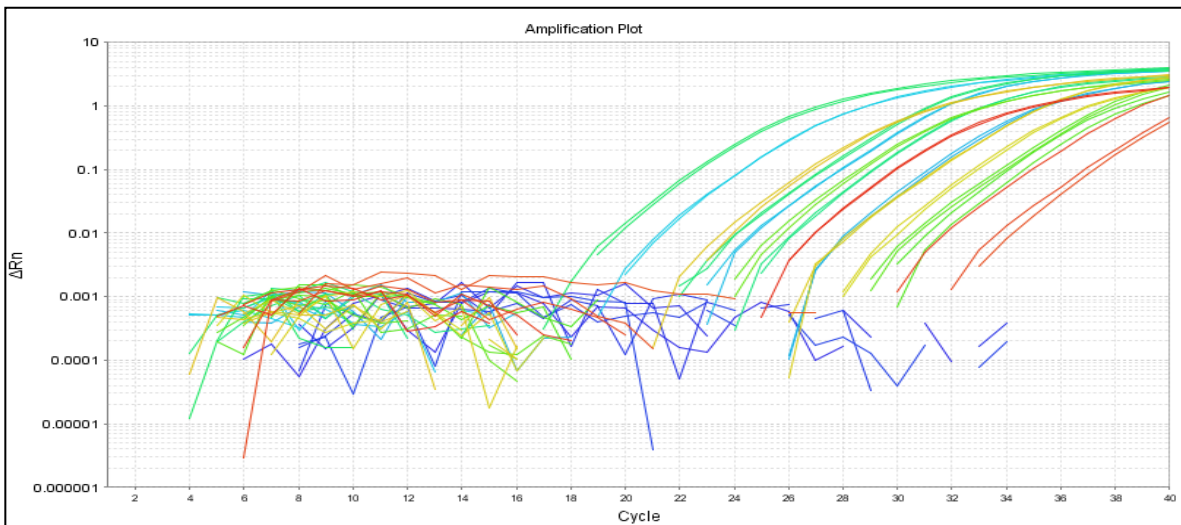


Figura 12. Amplificación por qPCR de muestras representativas de CM y una de tejido normal.

En la grafica de expresión de *RASSF1A* se puede observar que con excepción de la muestra del paciente 36, todas las demás presentaron una sub-expresión de *RASSF1A* en comparación con el tejido normal.

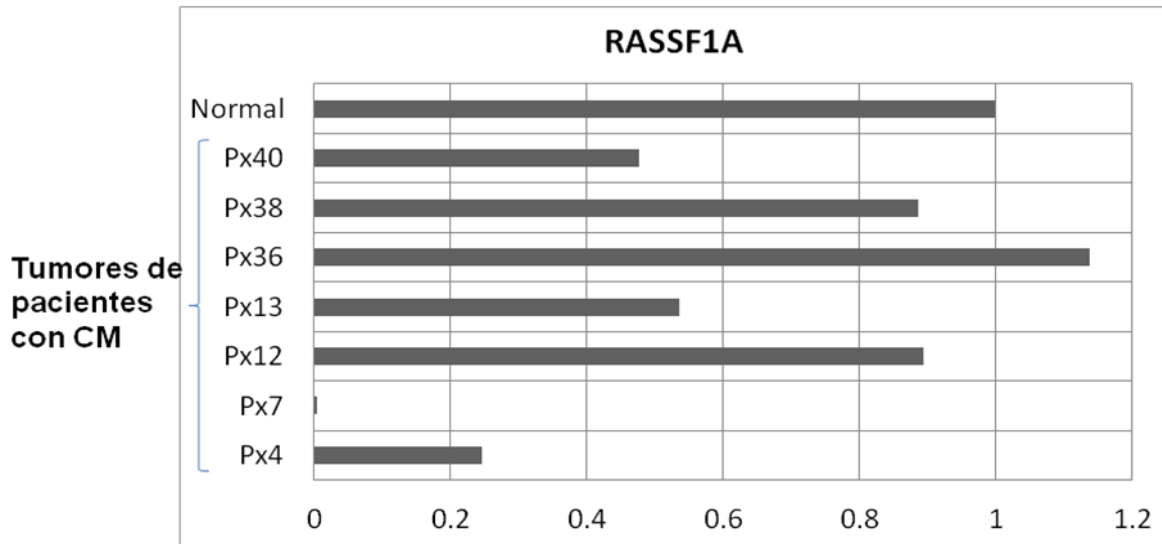


Figura 13. Amplificación por qPCR de muestras representativas de CM y una de tejido normal.

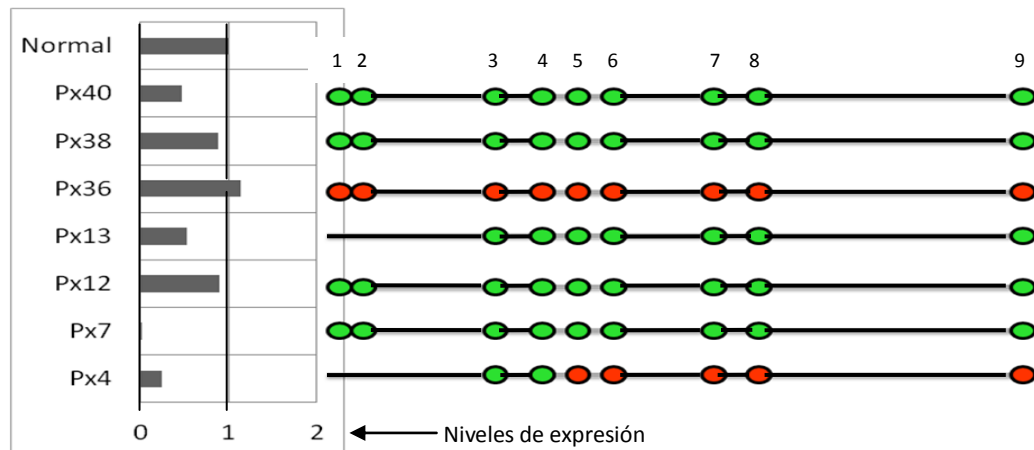


Figura 14. Comparación entre los niveles de expresión y el estado de metilación del gen *RASSF1A* en tumores de pacientes con CM

#### 5.4 Relación de la metilación de *RASSF1A* con su expresión.

Una vez que se tuvieron los resultados de los ensayos de metilación y expresión, lo siguiente fue comparar los resultados en busca de patrones específicos de metilación que pudieran estar relacionados con los patrones de expresión. Como se puede observar en la figura 14, de las muestras a las que se les realizaron los ensayos de expresión, la gran mayoría presentaba metilación en

todos los sitios CpG en común para todas las muestras, con excepción de la muestra 36, en la cual no se pudo detectar metilación, así como de la muestra cuatro, la cual presentó metilación sólo en dos sitios CpG. Las muestras que presentaron metilación en todos los sitios también mostraron una sub-expresión en comparación con la referencia (tejido normal). Sin embargo, no todas presentaron los mismos niveles de expresión. La muestra 36 presentó una sobre-expresión y la cuatro una sub-expresión. En la figura 15 se muestra la comparación entre los niveles de expresión y los electroferogramas algunas de las muestras analizadas.

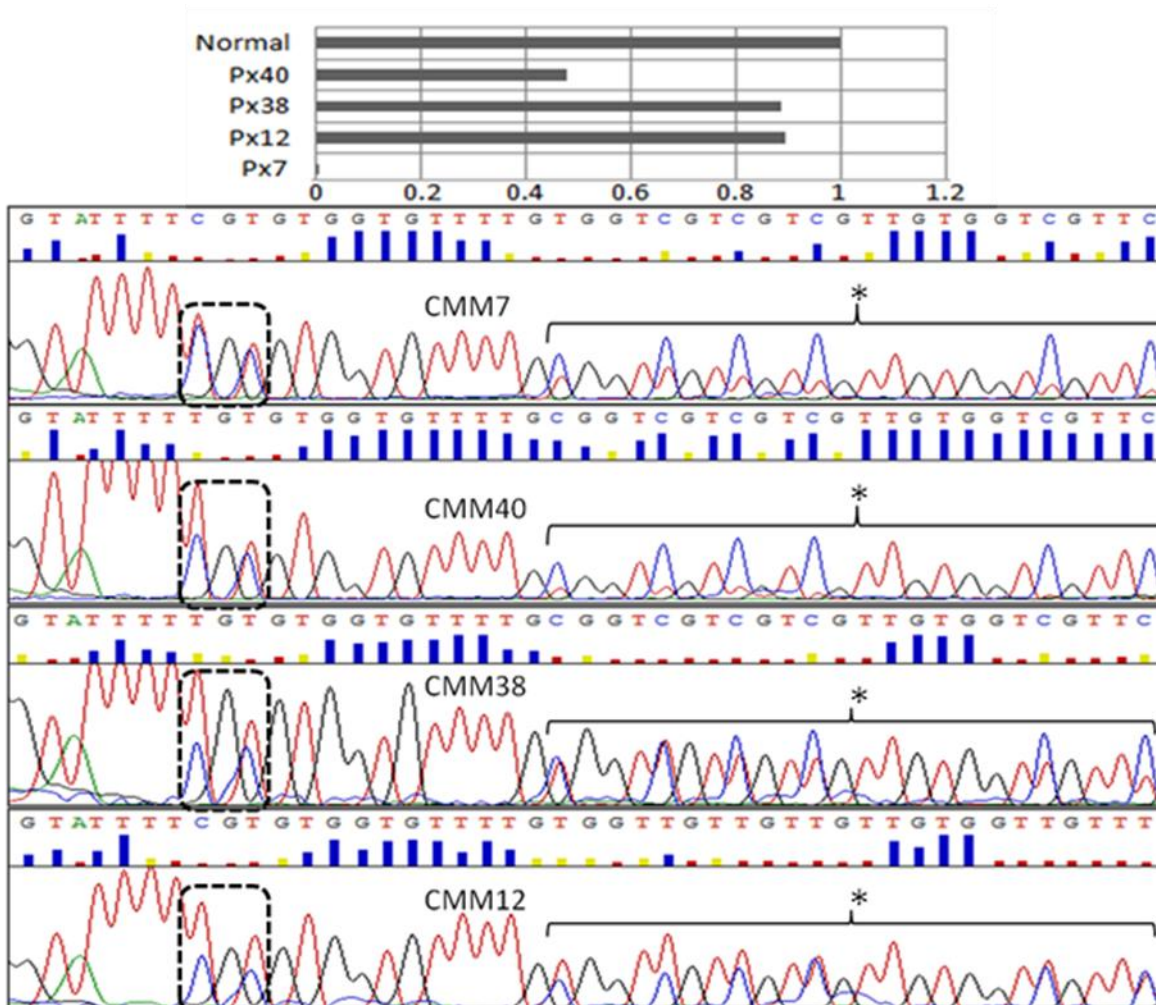


Figura 15. Comparación entre la expresión de *RASSF1A* y el patrón y el grado de metilación en sitios específicos. El recuadro en línea punteada encuadra los dos sitios CpG (CGCG) más próximos a la región promotora.

## Capítulo VI. Discusión.

En este estudio, a pesar de tener un tamaño de muestra reducida, se encontró que la media para la edad de las pacientes reclutadas al estudio con diagnóstico confirmado de CM fue de 56 años, donde los extremos fueron determinados por una paciente con 26 años de edad y otra de 88 años de edad, similar a lo reportado por otro estudio realizado un par de años atrás en este mismo laboratorio, donde la media fue de 53 años [6].

En cuanto al IMC, en este estudio se encontró que de todas las pacientes reclutadas, el 68% de ellas tenían sobre peso u obesidad, mientras que el 29% presentaron un peso normal y un 3% un peso por debajo de lo normal. A partir de estos datos se puede observar que existe una clara tendencia a que el CM sea más frecuente en pacientes con sobrepeso u obesidad como ya se ha reportado en otros estudios recientes que incluso afirman que la obesidad ha surgido como un factor de mal pronóstico independiente para CM, independientemente del estado de menopausia [60, 61].

En lo que respecta a los antecedentes heredofamiliares. En los resultados obtenidos se pudo observar que 29% de los casos tenían algún familiar afectado por algún tipo de cáncer, mientras que el 10% de los casos contaba con al menos un familiar directo afectador. Tomando estos datos y comparándolos con otros estudios como el de Anand en el 2008 [62], se puede ver que en este porcentaje de casos con familiares directos afectados por algún tipo de cáncer, es muy probable que exista algún gen alterado en la familia que estuviese contribuyendo a la aparición del tumor, como lo reportado por Anand donde refieren que entre el 5 y 10% de todos los casos de CM son atribuidos a alteraciones genéticas, principalmente.

En cuanto a la paridad, se observó que el 87% de las pacientes habían tenido hijos y el 65% de las pacientes eran mujeres en etapa post-menopáusica, lo que pareciera correlacionarse con la edad media de las pacientes dentro del estudio que fue de 55 años, ya que se encuentra en el límite superior del rango de

edad en el que las mujeres entran en la menopausia que es entre 45 y 55 años [63].

Durante la amplificación de la región promotora del gen *RASSF1A* en las muestras de las pacientes con CM, se observó cierta variabilidad en la eficiencia de amplificación, aun y cuando se había realizado una estandarización previa. Esto puede deberse en parte a que la estandarización de la PCR se realizó empleando una sola muestra de ADN convertido, por lo que la variabilidad en la amplificación entre las muestras pudiera deberse en parte a la calidad de la muestra por un lado, y por otro a la degradación que pudo haber sufrido el ADN durante el tratamiento con bisulfito, ya que una de las desventajas de trabajar con este método es que puede haber pérdida de material genético adicional por este tratamiento [64].

Durante la amplificación de la región promotora de *RASSF1A* en las muestras de los pacientes con CM, se observó que en casi todos los casos al aumentar la cantidad de ADN convertido que se utilizaba por reacción de PCR, se podía resolver el problema de la pobre amplificación, lo que estaría apoyando la hipótesis del problema de la degradación de las muestras de ADN por el tratamiento con bisulfito.

En el caso de la secuenciación por bisulfito, después de haber analizado las secuencias, se identificaron las muestras que habían presentado metilación y en qué sitios específicos se daba esta.

En este estudio encontramos metilación en el 90% de las muestras de tumor (9/10) en al menos uno de los sitios analizados, por lo que la frecuencia de este evento en pacientes con CM es bastante alta, similar a lo encontrado en otros estudios [54, 65]. En las muestras analizadas se detectó metilación en al menos uno de los sitios CpG analizados. Existen estudios similares que emplean técnicas que analizan solo un nucleótido (o de unos cuantos) y sin embargo se reporta como metilación en la región promotora de los genes [54, 65-67].



Debido a lo anterior, y probablemente a qué tan representativa haya sido la muestra analizada, existe cierta variación entre lo reportado en diversos estudios, ya que muestran frecuencias de este evento de entre 9 y 99% [68]. En este caso la base de datos de donde se obtuvo esta información ([www.pubmeth.org](http://www.pubmeth.org)) indica que todos estos estudios emplearon una técnica que detecta sitios CpG únicos, por lo que dependiendo de qué región específica se esté abarcando, y más aun, qué dinucleótido CpG se esté analizando, los resultados pudieran variar dentro de una misma muestra (dependiendo que dinucleótido CpG específico se esté analizando). Además, en estos las técnicas empleadas se basan únicamente en la amplificación selectiva de alelos metilados y sin metilar. Es por esto que la sensibilidad no es la más adecuada. Aunado a lo anterior, otro factor a considerar es la naturaleza de las muestras, ya que en muchos casos se pudiera estar analizando tejido adyacente al tumor. En caso de que no se realicen los estudios patológicos pertinentes, se podría conducir a la posibilidad de obtener falsos negativos. Por todo lo anterior es necesario resaltar la importancia de emplear técnicas basadas en secuenciación para obtener una idea más clara del estado de metilación de una región específica.

Si en vez de considerar como un estado metilado a todas aquellas muestras que tengan al menos un sitio CpG con metilación detectable, se considerara un estado metilado sólo a aquellas muestras que presentaran metilación en todos los sitios CpG analizados, la frecuencia de este evento, para este estudio, cambiaría de un 90% a un 70%, similar a lo que sería el promedio de las frecuencias reportadas en la base de datos mencionada anteriormente, que sería 61.3% [68].

De las muestras de tumor analizadas, las lecturas de siete de ellas fueron capaces de cubrir el sitio de restricción para la enzima *Bst*II (CGCG) y de éstas, siete muestras seis de ellas presentaron metilación en este sitio, el cual está muy próximo a la región de mayor actividad promotora [69] y por los resultados de los ensayos de expresión pareciera que la metilación de este sitio específico es de gran importancia en el silenciamiento de *RASSF1A*.

En los ensayos de expresión, de las siete muestras analizadas se observó que, con excepción de la muestra 36, todas presentaron una expresión por debajo de lo normal (expresión de *RASSF1A* en tejido normal). De las muestras que presentaron este patrón, se puede observar claramente que la muestra siete es la que presentaba el decremento en la expresión más claro, ya que prácticamente no hubo señal, lo que sugeriría que la metilación en la muestra siete prácticamente redujo en su totalidad la expresión de *RASSF1A*. Resulta de interés analizar a detalle el patrón de metilación de esta muestra. Además de la muestra 7, la muestra cuatro también mostró claramente que estaba sub expresada en comparación con el tejido normal. Además de estas muestras, las muestras 40 y 13 mostraron una baja notable en su expresión, mientras que la 38 y la 12 mostraron sub-expresión, pero en menor nivel. En general, se observó un decremento en la expresión en casi todas las muestras donde se detectó metilación en la región promotora, como ya se ha reportado en otros estudios en diferentes tipos de cáncer así como en CM [54, 70-72].

Al comparar los resultados obtenidos por la secuenciación y en los ensayos de expresión, se detectó cierto patrón en cuanto a la metilación de sitios específicos y los niveles de expresión en las muestras. Sin embargo, primeramente se comparó el estado de metilación de los sitios contra la expresión del gen y se encontró a grandes rasgos que la muestra 36, la cual presentó una ausencia de metilación en todos los sitios CpG (en común con las demás secuencias), presenta una expresión por arriba de la referencia, que en este caso es el tejido normal.

Todas las demás muestras analizadas presentaban una sub-expresión al compararlas con la referencia y si se comparan individualmente, la expresión de cada muestra contra su estado de metilación, se pudiera decir que todas presentaron el mismo patrón; esto es, que todas con excepción de la muestra cuatro, presentaron cierto grado de metilación en todos los sitios CpG analizados, lo que corresponde con el decremento en los niveles de expresión al ser comparadas con la referencia. Sin embargo, cada muestra presenta diferentes

niveles de expresión, por lo que un análisis más detallado de los electroferogramas pudiera proporcionar pistas respecto al efecto de la metilación en sitios específicos hacia la expresión del gen.

Al analizar los electroferogramas observamos que en dos sitios CpG que se encuentran consecutivos río arriba de la secuencia analizada, uno inmediatamente después del otro, y al tener esta organización forman un sitio de reconocimiento para la enzima *Bstul* (CGCG). Debido a que estos sitios se encuentran muy cerca de uno de los oligonucleótidos que se emplearon para amplificar la región de interés, las lecturas no son muy buenas en esta región y no todas las muestras alcanzaron a cubrir estos sitios. Sin embargo, las cuatro muestras que se presentan en la figura 15 sí los abarcan y, en los cuatro casos, estos sitios presentan cierto grado de metilación. Cabe resaltar que estos dos sitios CpG, de todos los analizados, son los que se encuentran más próximos a la región promotora [75].

Al analizar el estado de metilación de estos sitios y de compararlos entre las muestras, podemos observar cierto patrón o tendencia. En estos dos sitios específicos se observó cierta tendencia en donde las muestras que presentaban mayor proporción de metilación en estos sitios, eran las que presentaban los menores niveles de expresión. Para estos dos sitios específicos, si hubo una correlación entre los niveles de metilación y la expresión.

Lo anteriormente mencionado pudiera sugerir que estos dos sitios CpG, al estar tan próximos del promotor, y en base a los resultados que se obtuvieron, pudieran tener un papel clave en la expresión del gen *RASSF1A*, ya que se ha reportado que la metilación en sitios CpG únicos es capaz de disminuir significativamente la expresión de algunos genes [76].

En este estudio se encontraron patrones de metilación en sitios específicos CpG de la región promotora del gen *RASSF1A*, que al parecer están directamente relacionados con la expresión del gen. Al tratarse de una región tan pequeña y tan localizada, se pudiera pensar que, de los dos mecanismos principales por los

cuales la metilación de las citosinas del ADN conlleva al silenciamiento (impedimento estérico o silenciamiento por re-arreglos de la cromatina [77, 78]) el silenciamiento por bloqueo físico de la unión de factores de transcripción al ADN resulta el más factible, aunque pudiera ser una mezcla de ambos.

Al tratarse de un gen supresor de tumores [79] y dado el hecho de que el grado de metilación de este gen se ha relacionado con un aumento en los niveles de expresión del gen del receptor de estrógenos (ESR1) en CM [65], resulta de interés analizar más a detalle estos sitios específicos, ya que como se mencionó anteriormente, el grado de metilación de estos sitios específicos pareciera tener un gran impacto en la expresión del gen, lo que favorecería la aparición o el desarrollo del CM, así como de otros tipos de cáncer. Para poder realizar esto se pretende aumentar el tamaño de muestra y emplear una técnica más práctica y sensible, como lo es la PCR en tiempo real para detectar proporciones de metilación en estos sitios específicos. Así como comparar los resultados obtenidos con los datos clínicos de las pacientes para tratar de encontrar una asociación entre el grado de metilación en estos sitios específicos y, probablemente, el estadio o el sub tipo de CM que se presenta.

## Capítulo VII. Conclusión

- En base a lo encontrado en este estudio, en referencia a la frecuencia de la metilación en la región promotora de *RASSF1A*, se puede concluir que la técnica de secuenciación con bisulfito proporcionó buenos y claros resultados al poder analizar un mayor número de dinucleótidos CpG, así como mostrar una mayor sensibilidad (al comparar lo encontrado en este estudio con otros estudios similares pero empleando técnicas de menor resolución).
- La técnica de secuenciación por bisulfito nos permitió detectar diferentes patrones de metilación en las muestras de tumores con CM.
- De los 10 tumores analizados, nueve de ellos presentaron metilación en al menos uno de los seis sitios analizados en todas las muestras, lo que sugiere una frecuencia de este evento del 90%.
- Ninguna de las muestras de sangre presentó metilación, corroborando lo reportado en otros trabajos donde resaltan el uso del ADN leucocitario como control negativo en los ensayos de metilación
- La expresión de *RASSF1A* es regulada en gran medida por el grado de metilación presente en la región promotora del gen *RASSF1A*
- La metilación de la región promotora del gen *RASSF1A* es capaz de disminuir los niveles de expresión al mínimo, dependiendo de los dinucleótidos CpG afectados.
- La metilación del sitio de restricción CGCG parece estar correlacionada con la expresión del gen *RASSF1A*.

## Capítulo VIII. Referencias

1. Ferlay, J., et al., *Cáncer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. International Journal of Cáncer, 2014: p. n/a-n/a.
2. NCI, *Breast Cáncer Treatment*. 2014.
3. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cáncer in 2008: GLOBOCAN 2008*. International Journal of Cáncer, 2010. **127**(12): p. 2893-2917.
4. INEGI *Estadísticas a Propósito del Día Internacional Contra el Cáncer de Mama*. Boletín de Información Estadística, 2013.
5. C., A. *Cáncer de Mama*. Onco guía, 2011.
6. G., G., *Detección de SNPs en genes asociados a obesidad y cáncer de mama en pacientes del noreste de México*, in *Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular*. 2013, Universidad Autónoma de Nuevo León.
7. *Mammogram, ultrasound scan, core biopsy and fine needle aspiration (FNA)*. 2014 29/09/2014 [cited 2014 19/11/2014]; Available from: <https://www.breastcancer.org.uk/breast-cancer-information/breast-awareness/referral-breast-clinic/mammogram-ultrasound-scan-core-biopsy-fna>.
8. Roche, *A Guide for Journalists on Breast Cáncer and its Treatment*. Roche.
9. Organization, W.H., *Guidelines for management of breast cáncer*, in *EMRO Technical Publications Series*, W.H. Organization, Editor. 2008.
10. BreastCáncer.Org. *Breast Cáncer Risk Factors*. 2014; Available from: <http://www.breastcancer.org/risk/factors>.
11. Anand, P., et al., *Cáncer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(9): p. 2097-2116.
12. Ferlay J., S.H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin DM., *Cáncer incidence and mortality worldwide: IARC CáncerBase*, 2008.
13. Dworkin, A.M., T.H.M. Huang, and A.E. Toland, *Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cáncer detection, prognosis and treatment*. Seminars in Cáncer Biology, 2009. **19**(3): p. 165-171.
14. Foley, D.L., et al., *Prospects for Epigenetic Epidemiology*. American Journal of Epidemiology, 2009. **169**(4): p. 389-400.
15. Phillips, T., *The role of methylation in gene expression*. Nature Education, 2008. **1**(1).
16. Ball, M.P., et al., *Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells*. Nat Biotech, 2009. **27**(4): p. 361-368.
17. Paz, M.F., et al., *Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cáncer cells deficient in DNA methyltransferases*. Human Molecular Genetics, 2003. **12**(17): p. 2209-2219.
18. Ushijima, T., et al., *Decreased Fidelity in Replicating CpG Methylation Patterns in Cáncer Cells*. Cáncer Research, 2005. **65**(1): p. 11-17.
19. Issa JP, O.Y., Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB., *Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon*. Nature Genetics, 1994. **7**(4).
20. Ahuja, N., et al., *Aging and DNA Methylation in Colorectal Mucosa and Cáncer*. Cáncer Research, 1998. **58**(23): p. 5489-5494.
21. Issa, J.-P.J., et al., *Accelerated Age-related CpG Island Methylation in Ulcerative Colitis*. Cáncer Research, 2001. **61**(9): p. 3573-3577.

22. Abe M, O.E., Kuramoto T, Kaneda A, Takato T, Sugimura T, Ushijima T., *Cloning of the 5' upstream region of the rat p16 gene and its role in silencing*. Jpn J Cáncer Res, 2002. **93**(10).
23. Graff, J.R., et al., *Mapping Patterns of CpG Island Methylation in Normal and Neoplastic Cells Implicates Both Upstream and Downstream Regions in de Novo Methylation*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(35): p. 22322-22329.
24. Hsieh, C.-J., et al., *Hypermethylation of the p16INK4a Promoter in Colectomy Specimens of Patients with Long-standing and Extensive Ulcerative Colitis*. Cáncer Research, 1998. **58**(17): p. 3942-3945.
25. Kim, D.-H., et al., *p16INK4a and Histology-specific Methylation of CpG Islands by Exposure to Tobacco Smoke in Non-Small Cell Lung Cáncer*. Cáncer Research, 2001. **61**(8): p. 3419-3424.
26. W., D., *Uptake of foreign DNA by mammalian cells via the gastrointestinal tract in mice: methylation of foreign DNA--a cellular defense mechanism*. Curr Top Microbiol Immunol., 1995. **197**.
27. Müller, K., H. Heller, and W. Doerfler, *Foreign DNA Integration: GENOME-WIDE PERTURBATIONS OF METHYLATION AND TRANSCRIPTION IN THE RECIPIENT GENOMES*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(17): p. 14271-14278.
28. Ushijima, T. and E. Okochi-Takada, *Aberrant methylations in cáncer cells: where do they come from?* Cáncer Sci, 2005. **96**(4): p. 206-11.
29. Tao, M.-H., et al., *Body mass and DNA promoter methylation in breast tumors in the Western New York Exposures and Breast Cáncer Study*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011. **94**(3): p. 831-838.
30. Fernandez, S.V. and J. Russo, *Estrogen and Xenoestrogens in Breast Cáncer*. Toxicologic Pathology, 2010. **38**(1): p. 110-122.
31. Starlard-Davenport, A., et al., *Mechanisms of epigenetic silencing of the Rassf1a gene during estrogen-induced breast carcinogenesis in ACl rats*. Carcinogenesis, 2010. **31**(3): p. 376-381.
32. Klein, C.B. and J. Leszczynska, *Estrogen-induced DNA methylation of E-cadherin and p16 in non-tumor breast cells*. AACR Meeting Abstracts, 2005. **2005**(1): p. 646-a-.
33. Trujillo, E., C. Davis, and J. Milner, *Nutrigenomics, Proteomics, Metabolomics, and the Practice of Dietetics*. Journal of the American Dietetic Association, 2006. **106**(3): p. 403-413.
34. Barres, R., et al., *Weight Loss after Gastric Bypass Surgery in Human Obesity Remodels Promoter Methylation*. Cell Reports, 2013. **3**(4): p. 1020-1027.
35. Akhavan-Niaki, H. and A. Samadani, *DNA Methylation and Cáncer Development: Molecular Mechanism*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2013: p. 1-13.
36. Cooper, D.N.K., M., *Human Genetics*. 1990. 181-188.
37. Kulis, M. and M. Esteller, *2 - DNA Methylation and Cáncer*, in *Advances in Genetics*, H. Zdenko and U. Toshikazu, Editors. 2010, Academic Press. p. 27-56.
38. Feinberg, A.P., *The epigenetic progenitor origin of human cáncer*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(1).
39. M A Gama-Sosa, V.A.S., R W Trewyn, R Oxenhandler, K C Kuo, C W Gehrke, M Ehrlich, *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic Acids Res., 1983. **11**(19): p. 6883-6894.
40. Esteller, M., et al., *A Gene Hypermethylation Profile of Human Cáncer*. Cáncer Research, 2001. **61**(8): p. 3225-3229.

41. Esteller, M., *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. *Oncogene*, 2002. **21**(35): p. 5427-5440.
42. Greger V, P.E., Höpping W, Messmer E, Horsthemke B., *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. *Hum Genet.*, 1989. **83**(2).
43. Dejeux, E., et al., *DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response*. *Molecular Cáncer*, 2010. **9**(1): p. 68.
44. Kristiansen S., J.M., Guldborg P., Sölétormos G., *Aberrantly methylated DNA as a biomarker in breast cáncer*. *Int J Biol Markers*, 2013. **28**(2): p. 141 - 150.
45. Han, L., et al., *Decreased expression of the DBC2 gene and its clinicopathological significance in breast cáncer: correlation with aberrant DNA methylation*. *Biotechnology Letters*, 2013: p. 1-7.
46. HG., D., *Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells*. *Leukemia*, 2007. **12**(6).
47. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia*. *Cáncer Research*, 1999. **59**(4): p. 793-797.
48. Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W., Hegi, M.E., *MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?* *Nat Rev Neurol*, 2010. **6**(1).
49. Fleisher AS, E.M., Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Nishizuka S, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ., *Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia*. *Oncogene*, 2001. **20**(3).
50. Catteau, A. and J.R. Morris, *BRCA1 methylation: a significant role in tumour development?* *Semin Cáncer Biol*, 2002. **12**(5): p. 359-371.
51. Seuk Kim, J., et al., *Aberrant methylation of H-cadherin (CDH13) promoter is associated with tumor progression in primary nonsmall cell lung carcinoma*. *Cáncer*, 2005. **104**(9): p. 1825-1833.
52. Caballero, O.L. and Y.-T. Chen, *Cáncer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy*. *Cáncer Sci*, 2009. **100**(11): p. 2014-2021.
53. Mulero-Navarro, S. and M. Esteller, *Epigenetic biomarkers for human cáncer: The time is now*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2008. **68**(1): p. 1-11.
54. Hagrass, H., et al., *Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cáncer patients*. *Molecular Biology Reports*, 2014. **41**(1): p. 57-65.
55. A., B., *RASSF1A Methylation is Predictive of Poor Prognosis in Female Breast Cáncer in a Background of Overall Low Methylation Frequency*. *Anticáncer Research*, 2011. **31**(9): p. 2975-2981.
56. Jiang Y, C.L., Chen W-d, Shen S-h, Ding L-d, *The Prognostic Role of RASSF1A Promoter Methylation in Breast Cáncer: A Meta-Analysis of Published Data*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(5).
57. Zhang, X., et al., *Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the PMP24 gene in prostate cáncer*. *The Prostate*, 2010. **70**(7): p. 765-776.
58. Claus, R., et al., *Quantitative DNA Methylation Analysis Identifies a Single CpG Dinucleotide Important for ZAP-70 Expression and Predictive of Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia*. *Journal of Clinical Oncology*, 2012. **30**(20): p. 2483-2491.
59. Nile, C.J., et al., *Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis*. *Arthritis & Rheumatism*, 2008. **58**(9): p. 2686-2693.



60. Dirat, B., et al., *Unraveling the obesity and breast cancer links: a role for cancer-associated adipocytes?* *Endocr Dev*, 2010. **19**: p. 45-52.
61. Ligibel, J., *Obesity and breast cancer*. *Oncology (Williston Park)*, 2011. **25**(11): p. 994-1000.
62. Anand, P., et al., *Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*. *Pharmaceutical Research*, 2008. **25**(9): p. 2097-2116.
63. Health, P. *Menopause*. 2013.
64. Grunau, C., S.J. Clark, and A. Rosenthal, *Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters*. *Nucleic Acids Research*, 2001. **29**(13): p. e65-e65.
65. Kajabova, V., et al., *RASSF1A Promoter Methylation Levels Positively Correlate with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer Patients*. *Translational Oncology*, 2013. **6**(3): p. 297-304.
66. Agathangelou, A., et al., *Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours*. *Oncogene*, 2001. **20**(12): p. 1509-18.
67. Widschwendter, M., et al., *Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen*. *Cancer Res*, 2004. **64**(11): p. 3807-13.
68. Ongenaert, M., et al., *PubMeth: a cancer methylation database combining text-mining and expert annotation*. *Nucleic Acids Research*, 2008. **36**(suppl 1): p. D842-D846.
69. Zhang, H., et al., *Methylation of RASSF1A gene promoter is regulated by p53 and DAXX*. *Faseb j*, 2013. **27**(1): p. 232-42.
70. Mao, W.-m., et al., *Hypermethylation-modulated Downregulation of RASSF1A Expression Is Associated with the Progression of Esophageal Cancer*. *Archives of Medical Research*. **42**(3): p. 182-188.
71. Cao, D., et al., *Loss of RASSF1A Expression in Colorectal Cancer and Its Association with K-ras Status*. *BioMed Research International*, 2013. **2013**: p. 7.
72. Li, Y., et al., *Expression and promoter methylation of the RASSF1A gene in sporadic breast cancers in Chinese women*. *Oncol Rep*, 2008. **19**(5): p. 1149-53.
73. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
74. Suzuki, M.M. and A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(6): p. 465-76.
75. Tian, Y., et al., *Tumor suppressor RASSF1A promoter: p53 binding and methylation*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e17017.
76. Mamrut S, H.H., Sood R, Shahar-Gold H, Gainer H, et al., *DNA Methylation of Specific CpG Sites in the Promoter Region Regulates the Transcription of the Mouse Oxytocin Receptor*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(2).
77. Choy, M., et al., *Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated*. *BMC Genomics*, 2010. **11**: p. 519.
78. Roloff, T.C., H.H. Ropers, and U.A. Nuber, *Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins*. *BMC Genomics*, 2003. **4**: p. 1-1.
79. Hesson, L.B., W.N. Cooper, and F. Latif, *The role of RASSF1A methylation in cancer*. *Dis Markers*, 2007. **23**(1-2): p. 73-87.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Carta de aprobación del comité de ética.



**UANL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DRA. en C. MARIA DE LOURDES GARZA RODRIGUEZ**  
Investigador Principal  
Departamento de Bioquímica  
Presente.-

Estimada Dra. Garza:

Le informo que nuestro **Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León**, ha **evaluado y aprobado** el siguiente protocolo titulado **"Identificación de patrones de metilación en genes asociados a pronóstico en pacientes con cáncer de mama"**, participando además el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, Dra. Celia Nahemí Sánchez Domínguez, T.L.C. Daniela Monsiváis Ovalle, Q.F.B. Erick Pereira Zavala, L.B.G. Mauricio de la Rosa Garza, Q.F.B. Mariel Araceli Oyervides Muñoz, Dr. Servando Cardona Huerta, Dra. med. Raquel Garza Guajardo y el Dr. med. Marco Antonio Ponce Camacho como Co-Investigador.

De igual forma el siguiente documento:

- Consentimiento Informado, versión 27 de noviembre de 2013.

Su proyecto quedó registrado en esta Subdirección con la clave **B113-008**. Este número es necesario para la autorización de los servicios de apoyo a la investigación

Le pedimos mantenemos informados del avance o terminación de su proyecto.

Sin más por el momento, me despido de usted.

Atentamente,  
"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey N.L., 16 de Diciembre de 2013



**DR. JOSÉ GERARDO GARZA LEAL**  
Secretario de Investigación Clínica  
Presidente del Comité de Ética en Investigación

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN





BICENTENARIO  
100 años NATALECIO  
**DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ**  
2013

**Comité de Ética en Investigación**  
**Comité de Investigación**  
Av. Francisco I. Madero Plaz. 3ra y Av. Gonzalitos, Col. Miras Centro, 64460 Monterrey, N.L.  
México Apartado Postal 1-4409 Teléfono: (+52) 8329 4050 Ext. 2670 al 2674.  
Correo Electrónico: [investigacionclinica@meduanel.com](mailto:investigacionclinica@meduanel.com)



**80**  
ANIVERSARIO  
• 1933 - 2013 •  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

## ANEXO 2. Consentimiento informado



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN** **FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO**

---

**CONSENTIMIENTO PARA SER UNA SUJETO EN LA INVESTIGACIÓN**

*Este documento se presenta de conformidad con el artículo 100 Sección IV de la Ley General de Salud en vigor con la última modificación del mismo, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de junio del 2005. El consentimiento informado por escrito debe ser obtenido de la sujeto en quien se llevará a cabo la investigación, o de su representante legal en el caso de incapacidad legal de la sujeto, una vez que hayan sido informados de los objetivos de la investigación y de las posibles consecuencias positivas o negativas que podría tener para su salud.*

*Esta forma de consentimiento describe el estudio de investigación y su papel como participante. Por favor lea este formulario cuidadosamente. No dude en hacer cualquier pregunta con respecto a la información proporcionada. Esto debería estimular sus preguntas. Su médico, enfermera, o una persona del equipo le describirá el estudio y responderá a sus preguntas.*

---

**1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**Nombre del Estudio: Estudios genético y metabólico del cáncer de mama**

Se le pide participar en un estudio de investigación. Antes de dar su consentimiento para ser voluntario, es importante que lea la siguiente información y hacer tantas preguntas como sea necesario para asegurarse de que entiende lo que se le pide que haga.

Este es un proyecto de investigación en cáncer de mama que se está llevando a cabo en este centro y al que se le invita a participar. Es importante que conozca que este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la UANL. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

**2.- LOS INVESTIGADORES**


Investigador Principal:

- Dra. en C. María de Lourdes Garza Rodríguez. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL. Av. Madero y E. Aguirre Pequeño S/N. Mitras Centro, Monterrey N.L. México. C.P. 64460. Tel: 83-29-41-74.

---

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación  
27 de noviembre de 2013

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**Co-Investigadores:**

- Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.
- Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.
- Dr. Servando Cardona Huerta. Servicio de Cirugía. Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la UANL.
- Dra. Raquel Garza Guajardo. Departamento de Patología. Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la UANL.
- Dr. Marco Antonio Ponce Camacho. Departamento de Patología. Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la UANL.
- L.B.G. Mauricio de la Rosa Garza. Estudiante de Maestría en Ciencias. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL. Nombre del tutor: María de Lourdes Garza Rodríguez.
- T.L.C. Daniela Estefanía Monsivais Ovalle. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.
- Q.F.B. Mariel Araceli Oyervidez Muñoz. Estudiante de Maestría en Ciencias. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL. Nombre del Tutor: Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez.
- Q.F.B. Erick Pereira Zavala. Estudiante de Maestría en Ciencias. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL. Nombre del tutor: Hugo Alberto Barrera Saldaña.

**Dirección y teléfonos de contacto del sitio:**

- Dra. en C. María de Lourdes Garza Rodríguez. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL. Av. Madero y E. Aguirre Pequeño S/N. Mitras Centro, Monterrey N.L. México. C.P. 64460. Tel: 83-29-41-74.

### 3.- INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el crecimiento acelerado, anormal y desorganizado de las células que constituyen el tejido mamario. El cáncer de mama es más frecuente en los estados del norte de México y en el Distrito Federal. Este estudio está diseñado para descubrir cambios genéticos asociados al desarrollo del cáncer. Los datos de esta investigación serán utilizados para desarrollar en el futuro mejores formas para prevenir, detectar y tratar esta enfermedad en México. Este proyecto se está llevando a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Los tejidos y órganos del cuerpo están hechos de células. Cada una de estas contienen DNA (en español ADN), que constituye la información genética que contiene las

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del  
cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

instrucciones para que su cuerpo se desarrolle y funcione adecuadamente. Por ello, la información del ADN proporciona muchas de las características únicas que lo definen físicamente y por lo tanto constituye una marca única para cada persona.

Sabemos que las células cancerosas se originan por fallas en los genes, los cuales tienen la información que determina nuestras características, por ejemplo el color de nuestros ojos. En ocasiones estos genes no funcionan adecuadamente y pueden causar enfermedades como el cáncer. En esta enfermedad, las células se multiplican sin control y en algunas ocasiones, viajan a otras partes del cuerpo. Los investigadores y los médicos conocen algunas de las alteraciones genéticas que pueden causar cáncer, pero proyectos como al que le invitamos a participar permitirán obtener un mayor conocimiento acerca de las causas genéticas del cáncer de mama en pacientes mexicanas.

El estudio está diseñado para estudiar su ADN y encontrar la mayoría de las alteraciones genéticas que pueden causar cáncer. Por lo tanto, se realizarán estudios genéticos a partir de muestras de sangre, saliva, orina y tejido (este último en caso de que se cuente con una biopsia). Aparte de los estudios genéticos también se realizarán estudios metabólicos para medir moléculas de relevancia clínica en las muestras de sangre, saliva y orina, y como es que estas están relacionados con el desarrollo del cáncer. Este mismo procedimiento se llevará a cabo en muchas otras muestras de otras personas con y sin cáncer que estén de acuerdo en participar en el estudio. De esta forma, analizando una gran cantidad de muestras como la suya, esperamos encontrar alteraciones genéticas involucradas en el cáncer.

Posiblemente el estudio también generará nuevo conocimiento acerca de cómo responden diferentes pacientes mexicanas a los tratamientos de cáncer de mama, lo que ayudará eventualmente a mejorarlos. También se evaluarán factores ambientales para entender si están influyendo en las mujeres con cáncer de mama de nuestra región.

#### 4.- OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio está diseñado para identificar factores genéticos y moléculas que influyan en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama y en la respuesta al tratamiento. También se evaluará como es que ciertas hormonas propician el desarrollo del cáncer.

Los datos de esta investigación serán utilizados para realizar pruebas genéticas que en un futuro sean de utilidad diagnóstica en personas con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama así como para predecir la respuesta al tratamiento farmacológico.

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del  
cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Los resultados de estos estudios serán expuestos en congresos científicos y serán publicados en revistas científicas nacionales e internacionales. En ninguna de las exposiciones o publicaciones aparecerán nombres o datos personales de los participantes.

### 5.- PROCEDIMIENTOS

En este proyecto de investigación se incluirán tres grupos de mujeres.

- **Grupo A:** Este grupo incluye mujeres con diagnóstico confirmado de cáncer de mama. Su participación en este estudio tendrá una duración aproximada de 45 minutos y será una sola visita.
- **Grupo B:** Este grupo incluirá mujeres con alguna patología mamaria que no sea cáncer de mama. Es importante analizar las muestras de estas mujeres para estudiar la progresión del tejido normal hacia el tumoral. Su participación en este estudio tendrá una duración aproximada de 45 minutos y será una sola visita.
- **Grupo C:** Este grupo incluye mujeres sin cáncer de mama. Es importante analizar las muestras de mujeres sin cáncer para hacer una comparación de la genética entre mujeres sin cáncer y mujeres con cáncer de mama. Su participación en este estudio tendrá una duración aproximada de 45 minutos y será una sola visita.

#### Procedimientos a seguir para los tres grupos (A, B y C)

Si usted se ofrece como voluntario para participar en este estudio, se le pedirá que acepte donar una muestra de sangre y otra de orina, así como parte de la biopsia que se le tomó para realizar el diagnóstico (en caso de que aplique). A continuación se detallan los procedimientos que se plantean seguir en este protocolo.

#### Colecta de muestras y de información médica

- Se le tomará una muestra de sangre de una vena de su brazo. Se utilizará un tubo de 4 ml de tapa roja para los ensayos genéticos y otro tubo de 6 ml de tapa lila para los ensayos bioquímicos, dando como total 10 ml de sangre.
- Se le pedirán muestras de orina (100 ml) y una de saliva (1-2 ml), las cuales deberán recolectarse en recipientes especiales (proporcionados por el grupo de investigación).
- También se coleccionará información de su expediente clínico, que incluirá su edad, datos epidemiológicos, diagnóstico, historial de enfermedades, tratamientos médicos y respuesta a tratamientos.

#### ¿Cómo se manejarán mis muestras y mis registros médicos?

- Las muestras de sangre, las biopsias y los registros médicos serán marcados con

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

un código (codificados) para su seguimiento y con el fin de mantener su confidencialidad.

- Todos sus datos serán depositados en una base de datos segura, donde nadie que no esté autorizado podrá tener acceso a su información.
- Solamente un reducido grupo de investigadores y médicos autorizados, que se han comprometido a proteger los datos de los participantes en el estudio, tendrán acceso a la base de datos.

**¿En dónde se depositarán los resultados de los análisis del estudio?**

- Los resultados del estudio serán depositados en una base de datos segura.
- Los datos codificados de su expediente clínico estarán disponibles solamente para los investigadores que hayan recibido aprobación por parte de los responsables del estudio y nunca con fines comerciales.

**¿Seré contactada de nuevo en el futuro?**

- Su participación será única y no se le tomarán más muestras.
- Si se requiere obtener información adicional acerca de su estado de salud una persona de la Facultad de Medicina o del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la UANL lo contactará para preguntarle acerca de su estado de salud.

Para poder participar en el estudio, debe usted estar de acuerdo con **todos** los siguientes puntos:

- Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mi muestra de sangre y biopsia de tejido para este estudio de investigación en cáncer de mama.
- Estoy de acuerdo en que se colecte información de mi expediente médico para ser utilizado en este estudio de investigación.
- Estoy de acuerdo en que los resultados de este estudio se depositen en una base de datos segura.
- Estoy de acuerdo en que se me contacte en el futuro, si el estudio requiere colectar información adicional acerca de mi estado de salud.

**Almacenaje de muestras de ADN:** Las muestras de ADN pueden ser almacenadas para utilizarse en caso de que se requieran estudios genéticos adicionales.

Por favor elija una de las siguientes opciones para el almacenaje de sus muestras:

Deseo que mi muestra de ADN sea destruida en cuanto termine este estudio de investigación.

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del  
cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

- Deseo que mi muestra de ADN se destruya después de \_\_\_\_\_ años.  
 Autorizo a que mi muestra de ADN sea almacenada indefinidamente.

Y (si la muestra es almacenada)

Autorizo a que mi muestra de ADN sea almacenada por 15 años y se use en investigación futura, pero exclusivamente para investigación en **Cáncer de Mama**.

#### 6.- ENTRE LOS POSIBLES RIESGOS O MOLESTIAS

No hay riesgos previsible asociados con el estudio. La toma de muestra de sangre tiene riesgos mínimos asociados a cualquier recolección de sangre, tales como una ligera molestia en el sitio donde ésta se obtiene, comezón, sangrado leve, moretón, mareo; y en raras ocasiones una infección. Por esta razón, la toma de muestra se hará con equipo totalmente nuevo y esterilizado y será realizado por personas capacitadas para ello.

#### 7.- LOS BENEFICIOS POTENCIALES DE LA INVESTIGACIÓN/JUSTIFICACION

Usted no recibirá reportes personales acerca de las alteraciones genéticas encontradas ni tendrá beneficios personales por su participación en el estudio. La principal razón para participar en el estudio es la de contribuir a que se tenga un conocimiento más profundo de las causas genéticas del cáncer de mama. Los resultados de este estudio podrían ser de utilidad para encontrar mejores formas de prevenir, detectar, tratar y posiblemente curar el cáncer, por lo que su participación ayudará a otros pacientes afectados por la misma enfermedad en México y en el resto del mundo.

#### 8.- CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO DE DATOS

- Las muestras codificadas, es decir, no identificadas por nombre, serán procesadas en la Unidad de Biotecnología Médica del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL, el cual cuenta con el equipo y el personal capacitado para mantener el resguardo de sus muestras y de su información personal.
- Haremos todos los esfuerzos posibles para mantener sus datos confidenciales. Solo el investigador principal y los co-investigadores tendrán acceso a los datos. Estos investigadores están comprometidos a mantener sus datos resguardados y a no divulgar su información personal.
- La información será almacenada por al menos 3 años una vez finalizado el

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013







UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

estudio.

### 9.- PARTICIPACIÓN EN EL RETIRO

Su participación en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para retirarse del estudio por favor contacte al investigador principal (Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez al Tel: 83-29-41-74 o al correo electrónico lulugarza87@gmail.com).

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

### 10.- LAS PREGUNTAS SOBRE LA INVESTIGACIÓN

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor hable con la Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez al Celular: 811-801-4350. Facultad de Medicina de la UANL. Usted está en su derecho de solicitar cualquier aclaración y obtener información sobre la investigación.

### 11.- EN EL CASO DE LESIÓN

Es poco probable que la participación en este proyecto dé como resultado un daño a los participantes. Si existe una lesión secundaria al estudio, el sujeto deberá notificar al Investigador Principal para que reciba la atención médica necesaria en el Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González". Contacte a la Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez al Tel: 83-29-41-74 de la Facultad de Medicina de la UANL.

### 12.- COSTOS:

Los costos de esta investigación serán financiados por CONACYT y otros fondos para investigación que sean otorgados para esta investigación.

### 13.- INCENTIVOS PARA PARTICIPAR

¿Tiene algún costo participar en el estudio? ¿Se me pagará por participar?

- I. No tiene ningún costo su participación en el estudio.
- II. No recibirá ningún pago por su participación.
- III. Las muestras de sangre y su información serán utilizadas únicamente para fines de investigación y en ningún momento serán utilizadas con fines comerciales.

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del  
cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

IV. El uso de sus muestras puede dar como resultado invenciones y descubrimientos que pueden convertirse en la base de nuevos procedimientos de diagnóstico o de agentes terapéuticos. En algunos casos, estas invenciones y descubrimientos pueden tener un valor comercial y pueden ser patentados para desarrollar nuevos productos médicos que estarían disponibles comercialmente. Sin embargo, no existe ningún plan para que los donadores de muestras se beneficien de estas ganancias.

#### 14.- LAS RAZONES PARA LA EXCLUSIÓN DE ESTE ESTUDIO

En este proyecto se excluirán mujeres menores de 18 años y mujeres embarazadas.

*Este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" de la Universidad de Autónoma de Nuevo León. Si usted cree que hay alguna violación a sus derechos como sujeto de investigación, puede comunicarse con el Presidente del Comité,*

*Dr. José Gerardo Garza Leal  
Presidente del Comité de Ética  
Teléfono de Contacto: 8329-4050 ext 2870-74*

*Dudas en relación a sus derechos como paciente Lic. Antonio Zapata de la Riva teléfono 8329-4050 ext. 2870-74*

*Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la universidad Autónoma de Nuevo León.  
Av. Francisco I. Madero y Dr. Eduardo Aguirre Pequeño Col. Mútras Centro, 64460 Monterrey, N.L., México.  
Teléfonos (+52) 83294050 ext. 2870-2874.  
Correo electrónico: [investigaciónclinica@meduanl.com](mailto:investigaciónclinica@meduanl.com)*

*Se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a su satisfacción. Si firma abajo indica que está de acuerdo para participar como voluntario en este estudio de investigación.*

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del  
cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

## PARTE 2: FIRMAS QUE DOCUMENTAN EL ACUERDO

### 15.- ACUERDO

*Su consentimiento para participar en la investigación será voluntario e informado. Si usted está de acuerdo en participar y si sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción, usted deberá firmar esta forma. Una vez firmada la forma, usted está de acuerdo en participar en este estudio. En caso de que usted se rehúse a participar, usted podrá retirarse sin pérdida de alguno de sus beneficios médicos.*

*Una vez que usted haya consentido, usted aún tendrá el derecho de retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica. Para retirarse, lo único que usted deberá hacer es informar a su médico de su decisión.*

*Se le ha proporcionado una copia de esta forma para quedársela y para que haga referencia a ella cuando sea necesario.*

\_\_\_\_\_  
Fecha    Firma de la Sujeto    Nombre en letra de molde

\_\_\_\_\_  
Fecha    Firma del Primer Testigo    Nombre en letra de molde

\_\_\_\_\_  
Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio      Dirección

\_\_\_\_\_  
Fecha    Firma del Segundo Testigo    Nombre en letra de molde

\_\_\_\_\_  
Relación del Segundo Testigo con la Sujeto del Estudio      Dirección

### II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

*He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.*

\_\_\_\_\_  
Fecha    Firma de la Persona que Obtuvo el Consentimiento/Investigador Principal    Nombre en letra de molde

Título del Protocolo: Estudio genético y metabólico del  
cáncer de mama  
Consentimiento informado de Investigación

27 de noviembre de 2013



### ANEXO 3. Hoja de recolección de datos

#### Estudio Genómico del Cáncer de Mama

#### Hoja de Recolección de Datos

Fecha: \_\_\_\_\_

#### DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE

Lugar de recolección de datos: \_\_\_\_\_

Iniciales de la paciente: \_\_\_\_\_ Clave Protocolo: \_\_\_\_\_

Procedencia: \_\_\_\_\_ # expediente: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Teléfono Opcional: \_\_\_\_\_

Teléfono Celular: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Sexo: M  F  Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Estado de Nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_

Escolaridad: a) Primaria no terminada    b) Primaria    c) Secundaria    d) Preparatoria  
                  e) Técnico                            f) Universitario                    g) No sabe leer ni escribir

Ocupación: \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES ONCOLÓGICOS

Antecedente de cáncer: \_\_\_\_\_ ¿Cuántos familiares? \_\_\_\_\_

Mama: SI \_\_\_ NO \_\_\_ Ovario: SI \_\_\_ NO \_\_\_ Colon: SI \_\_\_ NO \_\_\_ Otro: SI \_\_\_ NO \_\_\_

Tipo de cancer \_\_\_\_\_ quien \_\_\_\_\_ materno \_\_\_ paterno \_\_\_ ambos \_\_\_ edad \_\_\_

Tipo de cancer \_\_\_\_\_ quien \_\_\_\_\_ materno \_\_\_ paterno \_\_\_ ambos \_\_\_ edad \_\_\_

Tipo de cancer \_\_\_\_\_ quien \_\_\_\_\_ materno \_\_\_ paterno \_\_\_ ambos \_\_\_ edad \_\_\_

Antecedente de cáncer de mama en hombres \_\_\_\_\_.

Observaciones \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### GENEALOGIA

Procedencia del padre \_\_\_\_\_

Procedencia de la madre \_\_\_\_\_

Procedencia del abuelo paterno \_\_\_\_\_

Procedencia de la abuela paterna \_\_\_\_\_

Procedencia del abuelo materno \_\_\_\_\_

Procedencia de la abuela materna \_\_\_\_\_

### **ANTECEDENTES PATOLÓGICOS**

Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_ Peso normal \_\_\_ Sobrepeso \_\_\_ Obesidad \_\_\_ ¿Cuándo empezó a subir de peso? (solo en sobrepeso u obesidad)

Tipo de Obesidad: Ginecoide: \_\_\_\_\_ Androide: \_\_\_\_\_

¿Ha tenido cambios drásticos de peso recientemente (hace menos de 1 año)? NO \_\_\_ SI \_\_\_

Cuántas veces: \_\_\_\_\_ Cuánto: \_\_\_\_\_ Cuando: \_\_\_\_\_ En cuanto tiempo: \_\_\_\_\_

¿Hace cuánto fue la última vez? \_\_\_\_\_ Observaciones: \_\_\_\_\_

Es Diabética: \_\_\_\_\_ tipo: \_\_\_\_\_ ¿Cuándo se diagnosticó? \_\_\_\_\_

Tratamiento: \_\_\_\_\_ Control: \_\_\_\_\_

¿Ha padecido alguna otra enfermedad metabólica? (Ex tiroidea, dislipidemia) ? ¿Cuál? \_\_\_\_\_

Comentarios de la paciente \_\_\_\_\_

¿Ha padecido algún tipo de hepatitis? \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

¿Ha padecido alguna otra enfermedades infecciosa? \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

¿Ha padecido cualquier otra enfermedad no mencionada?(autoinmune, oncológica, tumores benignos etc)

### **ANTECEDENTES PREVENTIVOS**

¿Tenía acceso a realizarse mamografías en su comunidad?

Se realizaba mamografías anuales SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

¿Cuántas mamografías se ha realizado hasta la fecha? \_\_\_\_\_

### **ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS**

Fecha de la última menstruación: \_\_\_\_\_ Ciclo en días(promedio) \_\_\_ Min. \_\_\_ Max. \_\_\_

Fecha de menarca: \_\_\_\_\_

Menopausia: \_\_\_\_\_ edad: \_\_\_\_\_ fisiológica o quirúrgica? \_\_\_\_\_

Terapia de reemplazo hormonal: NO \_\_\_ SI \_\_\_\_\_

¿Está actualmente recibiendo esta terapia? NO \_\_\_ SI \_\_\_ ¿Desde cuándo? \_\_\_\_\_

¿Hace cuánto tiempo que recibió esta terapia? \_\_\_\_\_ ¿Por cuánto tiempo? \_\_\_\_\_

¿Ha usado anticonceptivos orales? NO \_\_\_\_\_ SI \_\_\_\_\_ ¿Por cuánto tiempo? \_\_\_\_\_

¿Cuándo fue la última vez que uso anticonceptivos orales? \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

Gestas: \_\_\_\_\_ Partos: \_\_\_\_\_ Cesáreas: \_\_\_\_\_ Abortos: \_\_\_\_\_ Hijos vivos: \_\_\_\_\_

A qué edad tuvo su primer embarazo? (descripción de los primeros embarazos, definir edad y semanas de gestación) \_\_\_\_\_

Lactancia SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿Cuánto tiempo? \_\_\_\_\_ ¿Cuántas veces? \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES NO PATOLÓGICOS/SOCIALES

Consume alcohol: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿Cuánto? \_\_\_\_\_ ¿Cada cuándo? \_\_\_\_\_

Tiempo de consumo (años, meses): \_\_\_\_\_

Fuma o ha fumado: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ Edad de inicio \_\_\_\_\_ ¿Cuánto tiempo fumo? \_\_\_\_\_ ¿Cuántos cigarrillos al día? \_\_\_\_\_

Consume alguna otra droga: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

Ha estado expuesta a radiación (RayosX, TAC, pantas, fábricas, etc) : SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ ¿Por cuánto tiempo? \_\_\_\_\_

Consanguinidad (comunidad cerrada) \_\_\_\_\_

Realiza algún tipo de ejercicio SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Si la respuesta es Sí:

¿Qué tipo de ejercicio? \_\_\_\_\_

¿Cuántas veces a la semana realiza el ejercicio? \_\_\_\_\_

¿Durante cuánto tiempo realiza el ejercicio? \_\_\_\_\_

¿Tiempo que lleva realizando el ejercicio? \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES ONCOLÓGICOS (sólo para pacientes con cáncer de mama).

Fecha de diagnóstico de cáncer de mama: \_\_\_\_\_

-Diagnóstico de primera vez o recaída: \_\_\_\_\_

-Tratamiento previo a recaída: \_\_\_\_\_

-¿cuánto tiempo llevaba de tratamiento? \_\_\_\_\_

Lado del cáncer \_\_\_\_\_ Cáncer contralateral: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Tipo histológico \_\_\_\_\_

Etapas: \_\_\_\_\_

Metástasis a: \_\_\_\_\_

¿Ha recibido tratamiento?: Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Qt \_\_\_\_\_

Rt \_\_\_\_\_

Cx \_\_\_\_\_

Tiempo de tratamiento \_\_\_\_\_

**DATOS DE PATOLOGÍA**

Se le hizo estudios de ER o PR: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Resultado \_\_\_\_\_

Se le realizo cirugía: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ Tipo de cirugía: \_\_\_\_\_

Estadio clínico: \_\_\_\_\_ TNM \_\_\_\_\_

Bloom- Richardson. \_\_\_\_\_

Persona que recoleta los datos (Nombre y Firma): \_\_\_\_\_

Persona que toma las muestras \_\_\_\_\_