

UACM

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE LA CIUDAD DE MEXICO

Nada humano me es ajeno

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Determinación del patrón de metilación del
promotor del gen *brca1* en cáncer de mama
en población mexicana**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P r e s e n t a:

Q.F.B. Miguel Ángel Sandoval Esquivel

Director de tesis: Dr. Mario César López Camarillo
Co-director de tesis: Dr. Normand García Hernández

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

CO-DIRECTOR

Dr. Normand García Hernández
Investigador Asociado B. Unidad de Investigación de Genética.
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

ASESORES

Dra. Laurence A. Marchat Marchau
Profesora Titular. Posgrado Institucional en Biomedicina Molecular
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía de IPN

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga
Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Patricio Gariglio Vidal
Profesor Titular. Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

Dr. Diego J. Arenas Aranda
Investigador Titular A. Unidad de Investigación de Genética
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

El presente proyecto de investigación contó con el apoyo académico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México a la cual agradezco.

También agradezco al CONACyT por la beca otorgada para realizar este proyecto durante el periodo de mayo 2008 a julio del 2009. No. De CVU 238226.

El presente proyecto de investigación contó con el apoyo económico del CONACyT del proyecto 80620, de ciencia básica CB_2007-01.

AGRADECIMIENTOS

Al Director de esta tesis, Dr. Cesar López Camarillo, por su apoyo y por su gran compromiso en la realización de este trabajo.

Al Dr. Normand García Hernández, por su amistad y confianza, por aceptarme en su grupo de trabajo, por sus acertados consejos, que han contribuido a que este trabajo llegara a buen puerto.

A la Dra. Laurence A. Marchat Marchau, por su contribución al desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Mavil López Casamichana, por su valioso tiempo que dedico a la lectura de esta tesis.

A la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, por sus valiosas aportaciones que contribuyeron a mejorar esta tesis.

A la Dra. Minerva Camacho Nuez, por su gran paciencia y su interés en el desarrollo de este trabajo.

A los chicos de Genética por su amistad.

A la Dra. Sara Huerta y Daniel Hernández, por su apoyo en la elaboración de los microarreglos de tejidos.

A la Dra. Dolores Utrera por su amistad y asesoría en este trabajo.

Al Dr. Mayani Viveros, por todos los permisos que me otorgo.

A Xchel, por su amistad y colaboración en el laboratorio.

A Rita Mota, por su amistad y sus consejos.

A mi madre y mis hermanos por su gran cariño y estar conmigo en todo momento.

DEDICATORIAS

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi esposa y mis hijos.

Por su gran amor, por su paciencia, por tantas desveladas, por su apoyo en los momentos difíciles, por estar siempre conmigo.

Los amo con todo mi corazón y este trabajo es para ustedes.

ÍNDICE	<i>pág.</i>
ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN	
1. Antecedentes generales del tema	1
1.1 Generalidades del cáncer de mama	
1.1.1 Carcinogénesis	2
1.1.2 Desarrollo normal de la mama	6
1.2 Estructura de la glándula mamaria	7
1.3 Clasificación del cáncer de mama por estadio TNM	10
1.4 Incidencia y mortalidad	10
1.5 Incidencia y prevalencia	12
1.6 Factores de riesgo	12
1.7 Detección precoz del cáncer de mama	15
1.8 Aspectos clínicos y diagnóstico	15
1.9 Tipos histológicos de cáncer de mama	16
1.10 Pronóstico y tratamiento	19
1.11 Cáncer de mama hereditario	20
1.12 Estructura, función y expresión de los genes <i>brca1</i> y <i>brca2</i>	21
1.12.1 Regulación transcripcional del gen <i>brca1</i>	26
1.13 Mutaciones de los genes <i>brca1</i> y <i>brca2</i> en la línea germinal	30
1.14 Mutaciones somáticas de los genes <i>brca1</i> y <i>brca2</i>	31
1.15 La metilación del DNA como un mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica	31

1.15.1 Mecanismos de regulación	33
1.15.2 Activación y represión mediada por la cromatina	33
1.16 Metilación del promotor del gen <i>brca1</i> en cáncer de mama esporádico	35
II. JUSTIFICACION	37
III. OBJETIVOS	38
1. Objetivo general	
2. Objetivos específicos	
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	
1. Estrategia experimental	39
V. METODOLOGÍA	
1. Diseño del estudio	40
2. Tamaño de la muestra y muestreo	40
3. Inclusión de los tejidos en parafina	41
4. Microarreglos de tejidos (MAT)	42
4.1 Obtención de laminillas	43
4.2 Inmunohistoquímica por el sistema Avidina-Biotina (ABC)	44
4.3 Contratinción con Hematoxilina de Mayer y montaje	44
4.4 Digitalización de los TMAs y cuantificación	45
5. Extracción de DNA	45
6. Modificación del DNA por el método de bisulfito de sodio	46
VI. RESULTADOS	
1. Selección de casos	47
2. Construcción de los microarreglos de tejidos (MATs)	50
3. Obtención de laminillas	53
4. Detección de la proteína BRCA1 mediante inmunohistoquímica	56
5. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas anti-BRCA1	62
6. Extracción de DNA de tejidos mamarios	68
7. Modificación de DNA por el método de bisulfito de sodio	68

VII. DISCUSIÓN	76
VIII. CONCLUSIONES	80
IX. BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA1	del inglés Breast Cancer 1
cDNA	DNA complementario
ddH ₂ O	Agua desionizada
HE	Hematoxilina Eosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	Gramo
h	hora
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IP	Inmunoprecipitación
kDa	Kilodalton
MATs	Microarreglo de tejidos
MS-PCR	Por sus siglas en inglés Methylation specific PCR
ml	Mililitro
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero
O/N	Toda la noche
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Punto isoeléctrico
pm	picomolar
PM	Peso molecular
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero

s	segundos
UACM	Universidad Autónoma de la Ciudad de México
V	Volts
Vh	Voltaje hora
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Estructura de la glándula mamaria	9
Figura 2. Histopatología del cáncer de mama	18
Figura 3. Diagrama de la proteína BRCA1	25
Figura 4. Secuencia del promotor del gen <i>brca1</i>	28
Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia general	39
Figura 6. Selección de áreas con células neoplásicas teñidas con HE	49
Figura 7. Mapa 1 del microarreglo de tejido	51
Figura 8. Mapa 2 del microarreglo de tejido	52
Figura 9. Construcción del MAT	54
Figura 10. Microarreglo de tejidos	55
Figura 11. Inmunodetección de la proteína BRCA1 en tejido no afectado y neoplásico	57
Figura 12. Inmunodetección de la proteína BRCA1 y control de isotipo en tejido mamario tumoral en los TMA	59
Figura 13. Niveles de expresión de la proteína BRCA1 en tumores de cáncer de mama	61
Figura 14. Análisis morfométrico de microarreglos de cáncer de mama	63
Figura 15. Expresión de la proteína BRCA1 representada en log2	67
Figura 16. DNA genómico provenientes de tejidos de cáncer de mama	69
Figura 17. Productos de amplificación de DNA modificados por bisulfito de sodio	70
Figura 18. Reacción de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos que detectan el DNA metilado en el promotor del gen <i>brca1</i>	72

Figura 19. Identificación de la presencia de metilación en la región
promotora del gen *brca1* 73

Figura 20. Correlación de la expresión de la proteína BRCA1 y el
estado de metilación del promotor *brca1* 75

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama

11

Tabla 2. Tipo histológico y número de muestras analizadas

48

Tabla 3. Promedio de los IOD de las muestras analizadas

65

RESUMEN

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

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

Se utilizaron muestras provenientes del Hospital Juárez-SSA y el Hospital de Oncología CMN S-XXI, IMSS, las cuales fueron analizadas por dos patólogos para confirmar el diagnóstico de cáncer de mama y el porcentaje celular. Se

seleccionaron 78 muestras, 65 carcinomas ductal infiltrante, cuatro carcinomas lobulillares y nueve tejidos mamarios adyacentes. Después de realizar la detección de la proteína mediante IHQ, realizamos un análisis morfométrico y observamos una disminución en la expresión de BRCA1 en 41% de las muestras, 26% con expresión normal y en 33% detectamos que la proteína aumentó su expresión con respecto al tejido no afectado.

Con la determinación del estado de metilación del promotor mediante MS-PCR, encontramos que 5.7% de las muestras presentaron metilación de la región promotora del gen *brca1*. El DNA de los cuatro tumores que resultaron metilados en su región promotora del gen *brca1*, dos correlacionaron con el estado de sub-expresión esperado, uno presenta niveles normales de la proteína BRCA1, y encontramos otro tumor en el que su DNA presentó metilación en la región promotora del gen *brca1*, sin embargo este último presentó sobre-expresión de la proteína BRCA1.

Los resultados antes descritos correlacionaron con lo reportado por otros investigadores en diferentes poblaciones, y sugiere que en el caso de la sub-expresión, los dos alelos estén silenciados por la metilación en la región promotora del gen *brca1*, en el caso de expresión normal podría ser solamente que uno de los dos alelos este metilado y en el otro alelo permanezca sin metilación del promotor, lo que explicaría la presencia de la proteína en los niveles normales. En lo que se refiere a la muestra en el que se encontró metilación en la región promotora y altos niveles de proteína BRCA1, parecería contradictorio, sin embargo se ha sugerido que esta sobre-expresión podría ser debida a una metilación aberrante en las islas CpG del promotor del gen *brca1* o por algún otro

mecanismo. Los datos obtenidos en el presente proyecto muestran que la metilación del promotor del gen *brca1* es un evento poco común en los tumores de las pacientes mexicanas con cáncer de mama esporádico y que podría estar relacionado con el inicio y avance del proceso neoplásico.

I. INTRODUCCION

1. Antecedentes generales del tema

1.1 Generalidades del cáncer de mama

Los más de 30,000 millones de células que constituyen nuestro organismo nacen, crecen, se dividen y mueren bajo la estricta vigilancia del material hereditario, o sea, de la molécula de DNA. Por tanto, unas células regulan la proliferación de otras para asegurarse, que los órganos y tejidos crezcan en equilibrio y mantengan la arquitectura corporal. La producción celular esta supervisada por determinados sistemas de control extremadamente rigurosos. Para que una célula se divida en 2 células hijas idénticas es necesaria la participación de una gran cantidad de proteínas, enzimas, factores de crecimiento y de genes que se activen o desactiven con precisión y de manera sincronizada. El más mínimo fallo que tenga lugar en uno de los sistemas de control puede acarrear daño celular. Las células del tumor descienden de un ancestro común, que en algún momento -generalmente décadas antes del que el tumor se manifieste- inició un programa de división indebido. La transformación maligna de una célula acontece por acumulación de mutaciones en algunos genes específicos, los cuales son la clave molecular para entender las raíces del cáncer (Hernández y col., 2001).

1.1.1 Carcinogénesis

La carcinogénesis involucra alteraciones epigenéticas y genéticas que causan funciones aberrantes en varios genes. El cáncer de mama puede dividirse en dos grupos: el hereditario (familiar) y esporádico (no familiar). Casi todos los carcinomas de mama surgen a partir de carcinomas *in situ* (preinvasivos). El carcinoma ductal *in situ* es el resultado de un largo espectro de lesiones preinvasoras que se originan en el tejido mamario normal, con progresión histológica que va de hiperplasia atípica a cáncer de mama invasivo, aunque los pasos de inicio y vías específicas de la tumorigénesis de mama permanecen todavía sin definirse. Múltiples características clínicas y biológicas distinguen al carcinoma ductal *in situ* del tejido mamario normal, donde ocurren alteraciones cromosómicas que involucran ganancia o pérdida de múltiples locus en la transición de carcinoma *in situ* a carcinoma invasor, por ejemplo, se ha observado pérdida de heterocigocidad hasta en 70% de los carcinomas de alto grado *in situ* a diferencia del tejido de mama normal que es de cero por ciento (Agnantis y col., 2004).

Han sido identificados marcadores moleculares asociados con la formación de tumores de mama, por ejemplo, el receptor de estrógeno normalmente es expresado por células epiteliales lumbinales de tejido mamario, en más del 70% de lesiones de carcinoma ductal *in situ* se sobre expresa. Durante el proceso de carcinogénesis se ha identificado el proto-oncogén HER2/neu que se sobreexpresa en aproximadamente la mitad de todas las lesiones de carcinoma ductal *in situ*, pero no en hiperplasia atípica. A través de estudios de secuenciación, se

ha reportado que el gen supresor de tumor p53 está mutado en aproximadamente el 25% de todas las lesiones de carcinomas ductales *in situ*, pero rara vez se encuentran mutados en tejido normal de mama. La frecuencia con que estos marcadores moleculares se expresan en el carcinoma ductal *in situ*, refleja cómo será su expresión en tejido mamario invasivo.

Los cambios más dramáticos en los patrones de expresión genética durante la tumorigénesis de mama, se dan durante la transición del tejido normal mamario al tejido de carcinoma ductal *in situ*, encontrándose que este perfil de expresión genética del carcinoma ductal *in situ* es muy similar al de cáncer de mama invasivo (2004, Polyak 2002; Agnantis y col.,2004).

El carcinoma ductal *in situ* puede estar asociado con cambios en el parénquima mamario circundante. El carcinoma ductal *in situ* de alto grado, en particular, ha sido asociado a la ruptura de la capa celular mioepitelial y de la membrana basal que rodea el lumen del conducto, proliferación de fibroblastos, infiltración de linfocitos y angiogénesis en el tejido estromal circundante. A través de una serie de estudios de ligamiento en el genoma completo, búsqueda de mutaciones en genes candidatos mediante secuenciación y recientemente estudios de asociación del genoma completo se conocen tres grupos de factores con predisposición genética al cáncer de mama, basados en el riesgo relacionado con cada grupo. El primer grupo de riesgo lo constituyen los genes de alta penetrancia relacionados con el cáncer de mama de tipo familiar; a través de estudios de ligamiento fue posible mapear los genes *brca1* y *brca2*. Las mutaciones en *brca1* y *brca2* confieren alrededor de 15 a 20% del riesgo relativo familiar para cáncer de mama en la población caucásica. Las mutaciones en *tp53*,

dentro del marco del síndrome de Li-Fraumeni, también se consideran como de alta penetrancia, ya que las pacientes con este síndrome presentan un riesgo significativamente más elevado a padecer cáncer de mama. También en los síndromes de Cowden (mutaciones en *pten*) y Peutz-Jeghers (*stk11*) y el síndrome de cáncer gástrico difuso hereditario (mutaciones en *cdh1*) se ha identificado una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. Sin embargo, las mutaciones en *tp53*, *pten*, *stk11* y *cdh1* son muy raras en los tumores de mama esporádicos, por lo que su contribución al riesgo relativo fuera del contexto de sus síndromes adjuntos es muy baja. Estudios de resecuenciación de genes candidato han identificado mutaciones en genes como *chek2*, *atm*, *brip1* y *palb2*, los cuales pueden elevar el riesgo relativo de padecer la enfermedad de dos a cuatro veces tabla1. (Hidalgo y col., 2007)

Estos genes están agrupados en dos familias. La primera está integrada por los protooncogenes, los cuales codifican para la producción de proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, receptores etcétera, que estimulan la producción celular. Cuando protooncogenes mutan se transforman en oncogenes, los cuáles son capaces de orquestar una multiplicación celular sin control, de tal modo que hay un aumento en la velocidad de transcripción de los genes, y esto puede hacer que este gen se exprese en forma excesiva. El ejemplo clásico es el de la familia de oncogenes *ras*, el primer oncogen *ras* activado se aisló de una línea celular procedentes de un carcinoma de vejiga. Mutaciones únicamente en los codones 12,13, 59 y 61 del gen *ras* le confieren la capacidad de maligniza. Existen otros

oncogenes importante como son *N-myc* (neuroblastomas), la translocación *bcr/abl* (leucemia).

La segunda familia está integrada por los genes supresores de tumores también conocidos como genes supresores, que en el organismo sano controlan la proliferación celular; ellos por tanto son reguladores negativos de crecimiento y cuando no están presentes en la célula o se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células dejan de crecer normalmente y adquieren propiedades proliferativas anormales características de las células tumorales (Hernández y col., 2001). Dentro de los genes supresores de tumor, el ejemplo más conocido, es el gen *rb* el cual está involucrado en el control del ciclo celular, las mutaciones en este gen son un factor fundamental en el desarrollo de cáncer de retina en los niños menores de tres años, este gen codifica para una proteína de 928 aa que se expresan en todos los tejidos excepto en las células tumorales de retina (Zheng y col., 2001). El gen *p53* considerado por muchos autores como “el guardián del genoma” codifica para una proteína con el mismo nombre. El gen *p53* se activa cuando la célula se dispone a dividirse, para vigilar la secuencia normal de acontecimientos genéticos que permiten la proliferación celular. Si el material genético de la célula resulta dañado o si algún sistema de control se desajusta, esta lo detecta e intenta restaurarlo. Si la lesión no es grave, la *p53* detiene la división celular y activa los genes reparadores del DNA. Si *p53* censa que el daño es irreparable entonces ordena que se pongan en marcha los mecanismos genéticos para que la célula entre en apoptosis o muerte celular programada. Si *p53* sufre alguna mutación, no permite que la célula sea eliminada mediante la muerte celular programada (apoptosis), y se permite la proliferación de células

defectuosas que favorecen el inicio del proceso tumoral. Este gen es el más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, más de un 50 % de los tumores tienen genes p53 anormales, produciéndose una proteína modificada. Pero la pérdida de la función de esta proteína no solo puede deberse a una mutación en el gen que la origina, sino que existen otros mecanismos que pueden provocar que la célula carezca de un control tan importante como éste. (El cáncer en México, 2003)

1.1.2 Desarrollo normal de la mama

Durante el desarrollo normal de las glándulas mamarias ocurre una diferenciación celular por variaciones en los niveles hormonales, induciendo cambios en la expresión de los genes que desencadenan un proceso de madurez controlado. Durante la pubertad, en las mujeres ocurre de manera natural un desarrollo irreversible de la mama. Luego, cada vez que ocurre una gestación, se observa un proceso de cambio en las glándulas mamarias que podemos considerar reversibles (involución) terminada la crianza, en donde los conductos lácteos se desarrollan ocupando el espacio del estroma que antes almacenaba grasa. Durante este proceso de cambio, se pueden observar eventos tales como apoptosis en las células que están siendo sustituidas, proliferación y crecimiento de las células donde participan protooncogenes y genes supresores de tumor, angiogénesis para un abastecimiento de nutrientes de las células nuevas, etc. Estos cambios son regulados por factores de crecimiento, proteínas del ciclo celular, reguladores de invasión, interacciones célula-célula, etc. Si durante estos eventos de desarrollo ocurre un daño celular o alguna alteración en la

recombinación y fallan los sistemas de reparación, las células evaden el control normal, provocando posiblemente cáncer (Bishop,1983).

1.2 Estructura de la glándula mamaria.

En la mujer, la glándula mamaria se encuentra en la estructura anatómica denominada mama. La histología de la glándula mamaria es prácticamente la misma en todas las especies: un parénquima glandular, compuesto de alveolos y ductos y un estroma de soporte. Cada célula alveolar se comporta como una unidad de secreción, produciendo leche completa, sintetizando y transportando desde el plasma sanguíneo las proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales minerales, anticuerpos y el agua, que son los principales constituyentes de la leche.

Las mamas están situadas en la parte anterior del tórax y pueden extenderse en forma variable por su cara lateral. Su morfología varía según características personales, genéticas y en la misma mujer de acuerdo a la edad y paridad. Durante el embarazo y la lactancia el tamaño de la mama aumenta debido al crecimiento del tejido glandular (Strand, 1982).

El tejido celular subcutáneo rodea la glándula sin que exista una cápsula claramente definida, desde éste se dirigen hacia el interior numerosos tabiques de tejido conectivo. Estos tabiques constituyen los ligamentos suspensorios de la mama o ligamentos de Cooper. Un conjunto de quince a veinte lóbulos mamarios conforman la glándula mamaria, cada uno con su aparato excretor, que se abre en

el pezón por medio de un conducto lactífero. Los lóbulos mamarios están constituidos por numerosos lobulillos que se encuentran unidos entre sí por tejido conectivo, vasos sanguíneos y por su sistema excretor, los conductos lactíferos. Los lobulillos están formados por diez a cien acinos, cada uno con su conducto excretor denominado conducto terminal. Los acinos están estructurados por un conjunto de células secretoras que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción, están rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche (Berek, 2000).

El sistema de conductos lactíferos que vacía la glándula mamaria es el siguiente: el acino se vacía a través de un conducto terminal, el cual converge con sus congéneres para formar el conducto lobulillar, que recoge la secreción láctea de todos los acinos de un lobulillo. Los conductos lobulillares se reúnen para formar el conducto interlobulillar, que al unirse con otros conductos de éste tipo, forman el conducto lobular o segmentario, de mayor calibre que los anteriores, que se dirige al pezón y antes de llegar a él, bajo la areola mamaria, se dilata formando el seno lactífero, el que se angosta nuevamente al desembocar en el pezón (figura 1) (Berek, 2000).

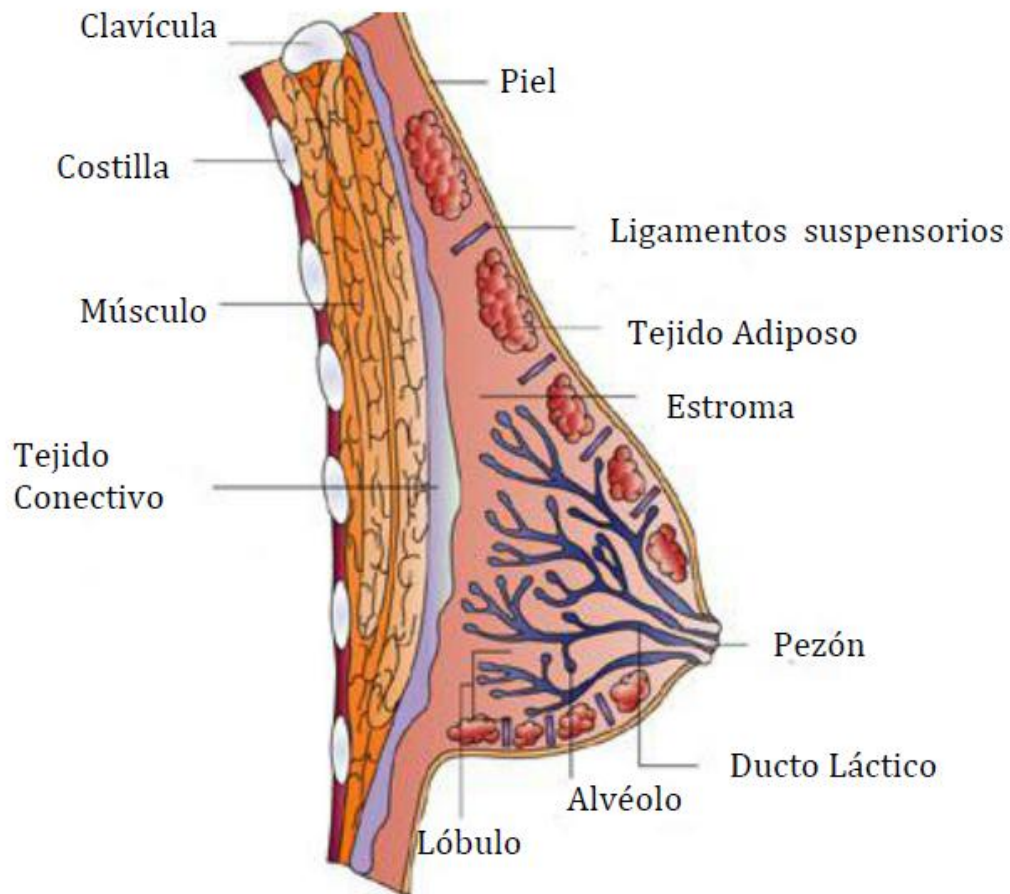


Figura 1. Estructura de la glándula mamaria. El esquema representa la estructura de la glándula mamaria y el sistema de conductos lactíferos (Modificado de Simak y col., 2002).

1.3. Clasificación del cáncer de mama por estadio TNM.

La determinación del estadio de un tumor no sólo permite un pronóstico exacto, sino que en muchos casos determina las decisiones terapéuticas a seguir y se basa en las características clínicas propias del tumor como el tamaño (T), el número de ganglios afectados (N) y la presencia de metástasis (M). El conjunto de estos caracteres determina el estadio en el cual se encuentra el tumor. Los criterios de clasificación de los estadios del cáncer de mama se presentan en la Tabla 1 (Cotran,1999).

1.4 Incidencia y mortalidad

En México, a partir del 2006 el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en la población femenina de 30 a 54 años y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres. En 2006 murieron 4,451 mujeres mexicanas, lo cual implica un fallecimiento cada 2 hr. La tasa de mortalidad en México ha registrado un aumento importante de 1950 a 2005, pasando de una tasa de 2 x 100,000 a 9 x 100,000 mujeres. La mortalidad por cáncer cérvico-uterino ha ido descendiendo en México a partir de 1990. Efecto contrario a la tasa por el cáncer mamario, que se incrementó 2.5 veces de 1992 al 2006, de tal forma que a partir del 2005 la tasa de mortalidad por cáncer de mama fue superior a la de cáncer cérvico-uterino. En el 2006 las mujeres de entre 30 y 65 años presentaron un riesgo mayor de morir por cáncer de mama que por cáncer cérvico-uterino, mientras que en 1980 el riesgo de morir por cáncer cérvico-uterino era dos veces mayor que por cáncer mamario (Knaul y col., 2006).

Clasificación de cáncer de Mama basado en criterios TNM

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

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer de mama. En la tabla se aprecian las características de cada una de las etapas TNM del cáncer de mama (Tomado de Harrison, Principios de Medicina Interna 2005).

1.5 Incidencia y prevalencia

En el año 2001 se reportaron 3,971 casos (10.2 x 100,000 mujeres de 15 años o más) en México, y en el 2006 se elevó a 6,043 casos (15.6 por 100,000). En México, se estima que la edad de ocurrencia se da una década antes que en las mujeres de EE.UU. y Europa de los 33,044 casos registrados durante el periodo 2000-2006, el 50% ocurrieron en personas menores de 50 años. Se reporta más de 1 millón de casos de cáncer de mama en el mundo, de los cuales el 45% provienen de países de ingresos bajos o medios. En América Latina se reportaron 96,561 nuevos casos a principios de la década actual. Como conjunto, esta región contribuye con 10% de los casos nuevos de cáncer de mama en el mundo (Anuarios de morbilidad 2000-2006; Porter, 2008).

1.6 Factores de riesgo

La edad es el factor de riesgo más importante para el cáncer de mama, ya que aproximadamente el 77% de los casos son diagnosticados en mujeres con más de 50 años. La historia familiar de cáncer de mama se considera el segundo factor de riesgo, indicando un importante papel de la herencia. Comparado con mujeres sin antecedentes familiares de cáncer de mama, el riesgo relativo (RR) es de 1.4 (RR) para mujeres cuya madre se diagnosticó de cáncer de mama después de los 60 años, y para mujeres de 40 años con mutación en el gen *brca1* es de 15 (RR). Otros factores de riesgo son la menarquía precoz, la nuliparidad y la menopausia tardía. Se piensa que estos factores influyen debido al aumento en el número de ciclos menstruales, y por tanto, al aumento en la exposición de las células de la mama al efecto estimulador de los estrógenos. Hay dos estudios que

demuestran, que el alto contenido de grasas en la dieta contribuye también al aumento de riesgo del cáncer de mama (Easton y col., 1993; Golditz y col., 1996). La menarca y ciclo menstrual cuanto más tarde sea la edad de presentación de la primera menstruación, más bajo será el riesgo de una mujer a sufrir cáncer de mama. Así, las mujeres que comienzan a menstruar antes de los 12 años tienen un RR de cáncer invasor de 1.3 comparadas con aquellas que comenzaron después de los 15 años. Por cada año de retardo en la presentación de la menarca, el riesgo disminuye en cerca del 5%. Existen también pruebas de que, aunque la edad de la menarca está relacionada con el riesgo de cáncer de mama en todas las edades, el efecto puede ser mayor en mujeres jóvenes (*premenopáusicas*). Otros factores menstruales, tales como longitud y regularidad del ciclo, no han sido consistentemente relacionados a riesgo de cáncer de mama.

El efecto de la lactancia sobre el riesgo de cáncer de mama ha sido controversial, probablemente debido a que los cambios en el riesgo asociado con el promedio de lactancia es pequeño. Sin embargo, estudios recientes en países menos desarrollados, donde la duración total del período de lactancia puede ser muy largo, han informado de efectos protectores sustanciales. Esto también ha sido observado en algunos estudios realizados en países más desarrollados. Por ejemplo, el estudio americano de Hormonas Esteroideas y Cáncer de mama examinó la relación entre lactancia y cáncer de mama en más de 4500 mujeres con la enfermedad y encontró que las mujeres que habían amamantado por un total de 25 meses o más, tuvieron un 33% de menos riesgo de cáncer de mama

que aquellas quienes nunca amamantaron, este resultado fue ajustado a paridad y edad del primer embarazo a término.

Las mujeres que experimentan la menopausia en edades avanzadas están en mayor riesgo de presentar cáncer de mama que aquellas que cesan de menstruar en forma temprana, con un riesgo total de cerca del 3% por cada año después de la edad promedio para presentar la menopausia. Así, aquellas mujeres que entran a la menopausia hasta los 55 años o después muestran un RR de 1.22 comparadas con aquellas que la experimentan antes de los 45 años. El efecto protector de la menopausia puede justificar el aumento más lento observado en la tasa de incidencia de cáncer de mama después de los 50 años. Así, las mujeres premenopáusicas están en mayor riesgo de tener un cáncer de mama que las mujeres postmenopáusicas de la misma edad y las mujeres perimenopáusicas se encuentran en un riesgo intermedio.

Durante la década pasada, algunos estudios prospectivos de cohorte han examinado la relación entre las concentraciones séricas de hormonas y riesgo de cáncer de mama. Para las mujeres postmenopáusicas, los estudios han mostrado una asociación positiva entre las concentraciones de estradiol y riesgo; las mujeres postmenopáusicas con altas concentraciones de estradiol tienen un riesgo de cerca del doble en relación a las mujeres con bajas concentraciones de esta hormona.

El riesgo de cáncer de mama está aumentado en cerca del 25% en las usuarias de anticonceptivos orales, pero el exceso de riesgo cae después del cese

de su empleo de manera tal que 10 o más años después de suspender su empleo no se demuestra un incremento significativo en el riesgo. El riesgo no varía significativamente con la duración del uso o el empleo de anticonceptivos orales combinados (Nissan y col., 2004; Key y col.2001).

1.7 Detección precoz del cáncer de mama

La única manera de detectar de forma precoz el cáncer de mama es la auto-exploración mamaria y la mamografía. Hoy en día se recomienda en la población general, la realización de mamografía anual a partir de los 45 años hasta los 69 años, y posteriormente de forma bianual. La Sociedad de Oncología Médica Americana recomienda a las pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer de mama debido a su historia familiar, empezar la exploración mamográfica a los 25-35 años mediante la auto-exploración mamaria mensual, examen clínico anual o semestral y mamografía anual.

1.8 Aspectos clínicos y diagnósticos

La tumoración es el signo más frecuente para la detección de estos tumores malignos. También pueden aparecer otros signos como la retracción del pezón, la “piel de naranja” o la secreción sanguinolenta por el pezón. El diagnóstico se realiza mediante la exploración clínica adecuada, una mamografía y la punción con citología y biopsia para la determinación anatomopatológica. Hoy en día se diagnostica en estadio localizado el 63% de las ocasiones, en estadio regional el 29% y en estadio metastásico un 6% (Jemal y col., 2004).

1.9 Tipos histológicos de cáncer de mama

Existen muchas clasificaciones anatómo-patológicas. La más comúnmente utilizada es la presentada por la Organización Mundial de la Salud. La mayor parte de las neoplasias de la mama se originan en el epitelio de los conductos galactóforos (carcinoma ductales) y los restantes se forman en estructuras acinares de los lobulillos mamarios (carcinomas lobulillares). Ambos grupos presentan variedades infiltrantes y no infiltrantes. En base a los rasgos anatomopatológicos, macroscópicos y microscópicos los carcinomas infiltrantes podemos dividirlos en:

- 1) **Carcinoma ductal:** El carcinoma ductal infiltrante es la neoplasia más frecuente en la mama. El tumor crece formando pequeñas e irregulares glándulas, cordones, nidos o como células sueltas, infiltrando el estroma fibroso y constituye el 70% del total de los cánceres de mama (figura 2).
- 2) **Carcinoma medular:** El carcinoma medular es un tipo histológico de buen pronóstico. Las células neoplásicas están embebidas en un abundante estroma linfóide. Esta variedad posee bajas posibilidades infiltrativas y constituye del 5 al 7% de todos los cánceres de mama (figura 2).
- 3) **Carcinoma tubular:** El carcinoma tubular es una variante bien diferenciada de carcinoma constituida por túbulos de forma angulada dispuestos irregularmente en un estroma fibroblástico reactivo. Su pronóstico es mejor que el de los carcinomas ductales (figura 2).

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

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

6) **Comedocarcinoma infiltrante:** Es un tipo de carcinoma ductal conocido como Enfermedad de Paget. Ocurre en el 1% de todos los cánceres de mama. La epidermis del pezón contiene células tumorales. La presencia de carcinoma inflamatorio de la mama, que se caracteriza clínicamente por edema de la piel de la mama, enrojecimiento, calor e induración del tejido subyacente. Su pronóstico suele ser malo (figura 2).

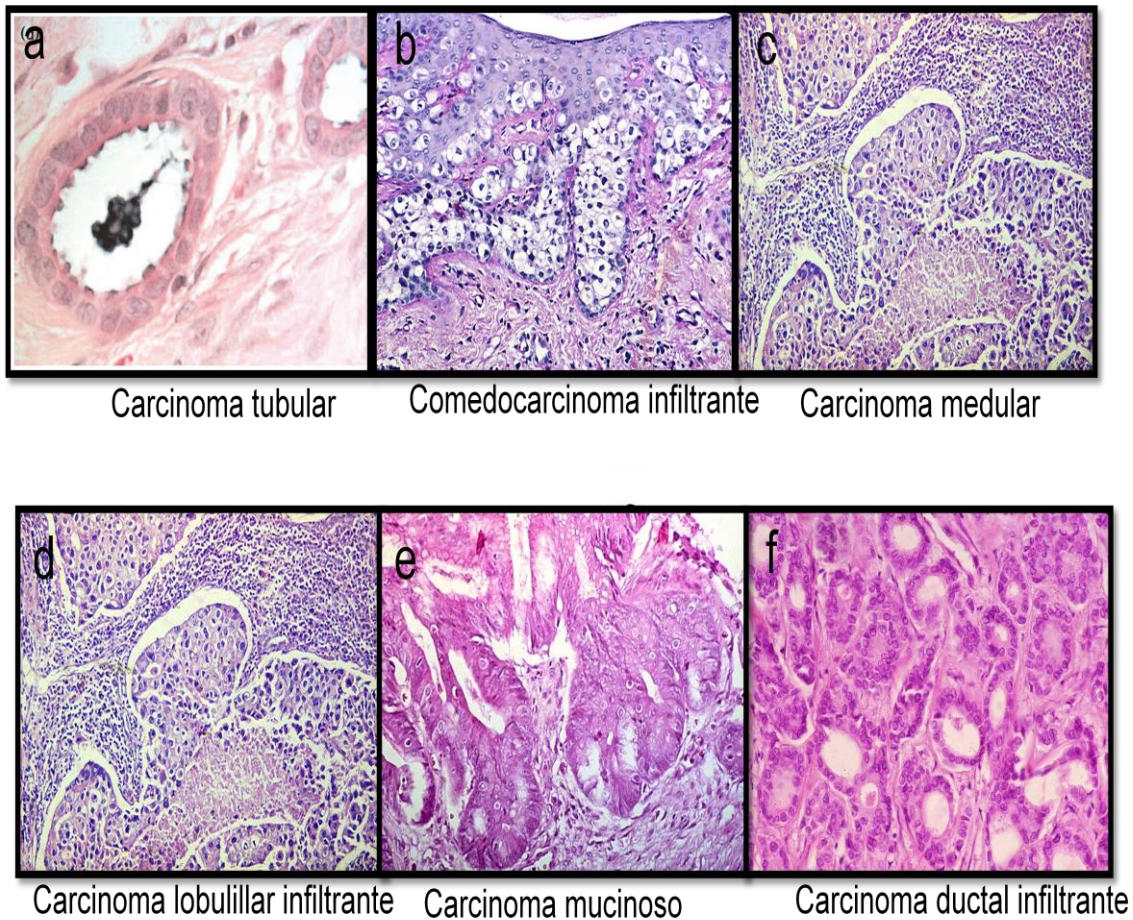


Figura 2. Histopatología del cáncer de mama. Se muestran los seis diferentes tipos histológicos que se presentan en cáncer de mama. a) carcinoma tubular b) comedocarcinoma infiltrante c) carcinoma medular d) carcinoma lobulillar infiltrante e) carcinoma mucinoso d) carcinoma ductal infiltrante (Modificada de Lakhani, 1990).

1.10 Pronóstico y tratamiento

Varios parámetros influyen con mayor intensidad en el pronóstico de esta enfermedad. Los factores más importantes son el tamaño del tumor, la afectación ganglionar axilar, el grado de atíпия nuclear y los receptores hormonales. En las últimas décadas, la mortalidad ha disminuido. El aumento en la supervivencia se debe a la autoexploración y la mamografía, que detectan tumores en estadio localizado y permite un tratamiento curativo. La correcta elección de un determinado tratamiento viene indicada por las características tumorales y el estado del paciente. En general, para tumores sin metástasis y localizados, se utiliza la cirugía, mediante tumorectomía o mastectomía. En estos casos, la cirugía suele ir acompañada de un tratamiento de quimioterapia, hormonoterapia o radioterapia adyuvante para disminuir el riesgo de desarrollar recurrencias locorregionales y a distancia. Cuando la enfermedad es metastásica, el tratamiento de la enfermedad tiene fines paliativos.

El tratamiento para el cáncer metastásico suele comprender la quimioterapia, la hormonoterapia o ambas. La radioterapia y/o la cirugía sólo se utiliza en casos muy concretos dentro de este grupo de pacientes, por ejemplo ante una metástasis dolorosa o ante problemas locales de dolor o hemorragia en la mama. En aquellas pacientes que tienen tumores que sobre expresan el receptor HER2/neu el tratamiento con Herceptin, anticuerpo monoclonal que se une al receptor del HER2/neu aumenta la supervivencia de los pacientes (Jemal y col., 2004).

1.11 Cáncer de mama hereditario

La mayor parte de los cánceres de mama son esporádicos, es decir, no hay indicio de una susceptibilidad heredada a padecer la enfermedad. Los cánceres esporádicos se generan por una acumulación de eventos genéticos que provocan el crecimiento descontrolado de una clona celular. Estas alteraciones genéticas implican, sobre todo, a genes relacionados con la proliferación y reparación (*brca1*, *brca2*, *p53* y *rb*), que se producen a nivel de las células somáticas, por tanto, no es hereditario. Pero existe una baja proporción, estimada en torno al 5-10%, donde aparece una predisposición hereditaria al cáncer de mama (Donovan y col. 2010). La alteración mutacional aparece a nivel de un gen que se hereda de forma mendeliana y confiere un mayor riesgo de padecer la enfermedad. Por tanto, la mutación, a diferencia del cáncer esporádico, está presente en cada una de las células del paciente. En general una de cada 8 mujeres desarrollará cáncer de mama a lo largo de su vida, pero en algunas familias el número de afectados es mayor.

El síndrome de cáncer de mama/ovario hereditario se caracteriza por un acumulo de casos de cáncer de mama sólo o hay casos de cáncer de mama y ovario en una familia. Históricamente, el cáncer de mama/ovario hereditario se reconoció en familias con un modelo hereditario de transmisión autosómica dominante, a principios de 1970. Este concepto se deriva de las observaciones de Knudson a principios de los años 70, ya que a partir del estudio del retinoblastoma familiar, esporádico y el análisis de la edad, le permitió proponer la “teoría de los dos hit” o eventos mutagénicos que son necesarios para el desarrollo del retinoblastoma. En individuos con la forma heredada, Knudson propuso que el

primer hit es la presencia de la mutación en la línea germinal, y por tanto, en todas las células del cuerpo. Sin embargo, la presencia de esta mutación es insuficiente para la formación del tumor y una segunda mutación somática es necesaria para producir la formación de un tumor. Esta teoría de Knudson sería aplicable al cáncer de mama/ovario hereditario, y explicaría su aparición a edad más precoz que el cáncer de mama esporádico (Knudson, 1971). Mediante estudios epidemiológicos se demostró la existencia de genes de susceptibilidad al cáncer de mama (Mc Person y col., 2000). Pero fue en 1990 cuando, mediante análisis de ligamiento de familias con múltiples casos de cáncer de mama, se aisló el primer gen de susceptibilidad a esta enfermedad. Este gen conocido como *brca1* se localizó en el cromosoma 17q12- q21 y fue clonado en 1994. El gen *brca1* parecía además estar relacionado con el cáncer de ovario. Hoy en día se sabe que la contribución de estos dos genes (*brca1* y *brca2*) a este tipo de cáncer es más modesta, y que aún quedan muchos casos que no pueden ser explicados por alteraciones de estos genes. (Easton y col., 1993; Easton y col., 1997)

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

1.12 Estructura, función y expresión de los genes *brca1* y *brca2*

El gen *brca1* posee 24 exones, 22 de los cuales son codificantes, distribuidos a lo largo de unos 100 Kb de DNA genómico. El gen *brca1* codifica una proteína de 1863 aa con un peso molecular de 220 kDa (figura 2). El exón 11 es comparativamente mucho más grande que el resto de los exones el cual

codifica para un péptido de 3.5 KDa. El gen *brca1* posee 2 exones, denominados 1a y 1b que generan 2 transcritos distintos a partir de 2 promotores (Fang y col., 1979) Recientemente se han caracterizado múltiples transcritos funcionales, por ejemplo el transcrito BRCA1-IRIS que comprende del exón 1 al 11 y parte del intron 11, BRCA1-IRIS está asociado con la cromatina y exhibe una influencia en la replicación con el DNA. (Pettigrew y col., 2010) La mayor parte de la secuencia del gen *brca1* no tiene una homología muy fuerte con el resto de genes conocidos.

En la proteína BRCA1 sólo una secuencia situada en la zona amino-terminal de BRCA1 (residuos:20-68) guarda homología con proteínas previamente descritas (figura 2). Esta secuencia conocida como “dominio anillo”, es característica de muchos factores de transcripción y parece estar implicada en la interacción de las proteínas con el DNA y proteína-proteína (Miki y col., 1994). Mediante el sistema del doble híbrido se ha localizado una proteína que interactúa con este dominio de anillo llamada BARD1 el cual está involucrado en el proceso de ubiquitinación, en este dominio de anillo se ha demostrado que interacciona con E2F, un factor de transcripción involucrado en la regulación del ciclo celular. La proteína BRCA1 también posee una secuencia en la zona carboxi-terminal de la proteína, conocida como dominio BRCT (del inglés BRCA1 C-terminus) que aunque está poco conservada, mantiene una cierta homología con otras proteínas implicadas en la reparación del DNA y control del ciclo celular, este dominio BRCT forma un complejo con dos proteínas de unión RB (Narod y col., 2004).

La función de la proteína BRCA1 parece estar relacionada con el mantenimiento de la integridad del genoma. El hecho de que la sobreexpresión de BRCA1 produzca una inhibición del crecimiento celular a demás de que, en los cánceres

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

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

BRCA1 es una proteína que posee además dominios capaces de activar la transcripción, concretamente, es capaz de activar la transcripción del gen *p21*, que es un potente supresor del ciclo celular en la fase G1/S (Scully y col., 1997). También la relación con desacetilasas, helicasas, así como proteínas reguladoras como la CtIP sugiere que BRCA1 tiene un papel regulador de la transcripción y reparación del DNA. Algunos trabajos muestran como *BRCA1* podría estar implicado en la degradación dependiente de ubiquitina de ella misma o de otras proteínas, este proceso de ubiquitinación se lleva a cabo entre la interacción de la proteína BRCA1 y BARD1 a través de su dominio nillo (RING-finger), estudios recientes indican que BRCA1 regula el proceso de ubiquitinación en respuesta al estrés (Morris y col., 2004).

El gen *brca2* es estructuralmente parecido a *brca1*. También es un gen de gran tamaño, posee 27 exones que codifican para una proteína de 3418 aa (casi el doble que BRCA1), la cual tiene un peso molecular aproximado de 384 kDa. El RNAm es de aproximadamente 12 Kb. Una característica de esta proteína es que tiene un grupo (cluster) de secuencias repetidas (llamada BRC) la cual es

codificada por el exón 11, está altamente conservada entre los mamíferos, estos repetidos (BRC1,BRC7 y BRC8) están involucrados en la interacción BRCA2 y RAD51, una proteína que es esencial para la recombinación genética y la reparación de DNA (Davies y col., 2001). La proteína BRCA2 también posee una secuencia de señalización nuclear que está localizada en el extremo C-terminal, mientras que en la proteína BRCA1 tal secuencia está codificada por en el exón 11. La función de la proteína BRCA2 es similar a la proteína BRCA1. La interacción con a RAD51, su señalización al núcleo así como su patrón de expresión, indicarían que BRCA2 podría estar también implicada en la reparación del DNA. Además, BRCA2 tiene un dominio codificada por el exón 3 capaz de activar la transcripción.

Además de unirse a RAD51 se ha reportado que BRCA2 interacciona con p53 y p21 los cuales detienen el ciclo celular. En los genes *brca1* y *brca2* el exón 11 se ve comprometido por mutaciones, alterando su capacidad transcripcional, lo cual se ha observado en pacientes con cáncer de mama, y podría indicar que la alteración de esta función está relacionada con el desarrollo tumoral (Kerr y col., 2001).

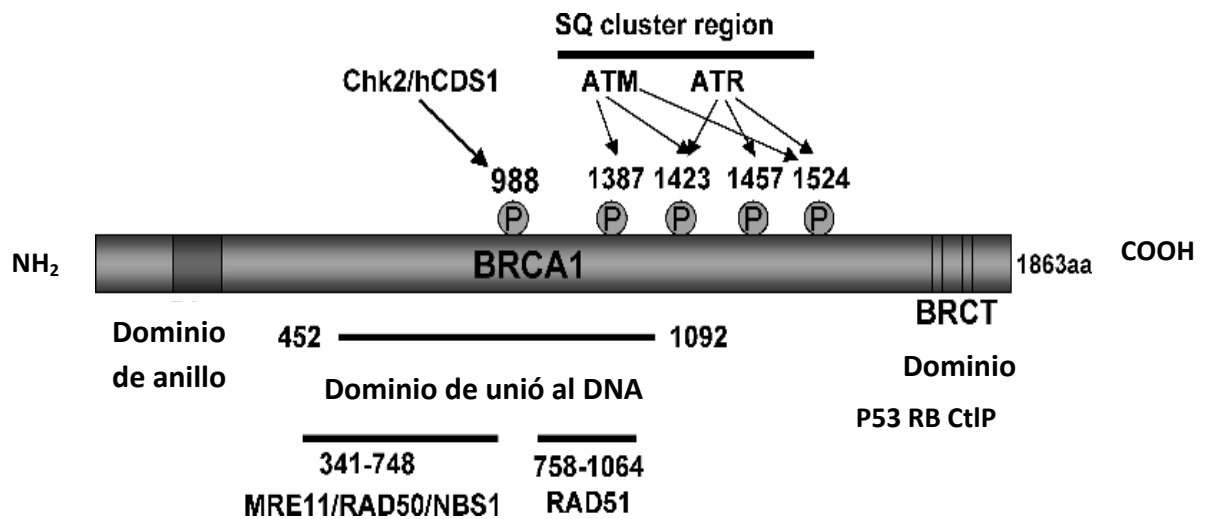


Figura 3. Diagrama de la proteína BRCA1. Se muestran los dominios funcionales de la proteína BRCA1, los sitios de fosforilación (P) y las regiones que interactúan con otras proteínas tales como P53, Rb, CtIP, BARD1, E2F, RAD51 y MRN (Tomado de Zhang y col. 2005).

1.12.1 Regulación transcripcional del gen *brca1*.

Hay evidencias que sugieren que los genes *nbr2* y *brca1* se regulan recíprocamente; en líneas celulares de mama se han encontrado altos niveles de expresión del gen *nbr2* y esto correlaciona con bajos niveles de expresión del gen *brca1*, esto puede ser explicado no solo por la competencia entre los promotores por la RNA polimerasa II, sino también se sugiere que la activación del promotor *nbr2* podría conducir a una disminución en la expresión del gen *brca1*. La expresión del gen *brca1* por estrógenos parece ser el resultado del efecto de esta hormona en el crecimiento de las células del tejido mamario, este incremento en la proliferación es mediada por el sitio de reconocimiento a E2F caracterizado en el promotor del gen *brca1*. Por el contrario, la proteína p53 puede inhibir la expresión de BRCA1 evitando que E2F se una a su sitio de unión al DNA. Se demostró posteriormente que el sitio CREB (del inglés, cAMP-responsive element binding) es un sitio de unión a factores de transcripción fuerte y positivo de la transcripción del gen *brca1*, se ha reportado metilación en este sitio CREB, lo cual estaría silenciando la transcripción del gen *brca1*. Uno de los sitios de unión a factores de transcripción que se han identificado y que son importantes para la expresión de gen *brca1*, ha sido en líneas celulares de mama (MCF7 y T-47D). El elemento RIBS (del inglés EcoRI Band Shift) caracterizado en el promotor del gen *brca1* el cual se une a múltiples subunidades de los factores de transcripción Ets y GABP- α / β y actúa como un activador en células MCF-7, pero no en la línea celular T47D. La inactivación del hélice-loop-hélice (HLH) inhibidor de la proteína de la diferenciación de 4 (Id4) fue capaz de aumentar la expresión del gen *brca1* en la línea celular MCF-7. Parece existir una relación recíproca entre la expresión del

gen *brca1* y *Id4* el cual es regulado por estrógenos. Recientemente MacDonald (y col. 2007, identificó un elemento represor, conocido como el sitio UP, el cual se encuentra en el promotor del gen *brca1*, la inactivación de este aumenta la actividad del promotor, el elemento UP está compuesto por dos secuencias, una de las cuales se une a la familia de los factores de transcripción ETS GABPalfa / beta (Mueller y col., 2002; Rosen y col., 2003; MacDonald y col., 2007).

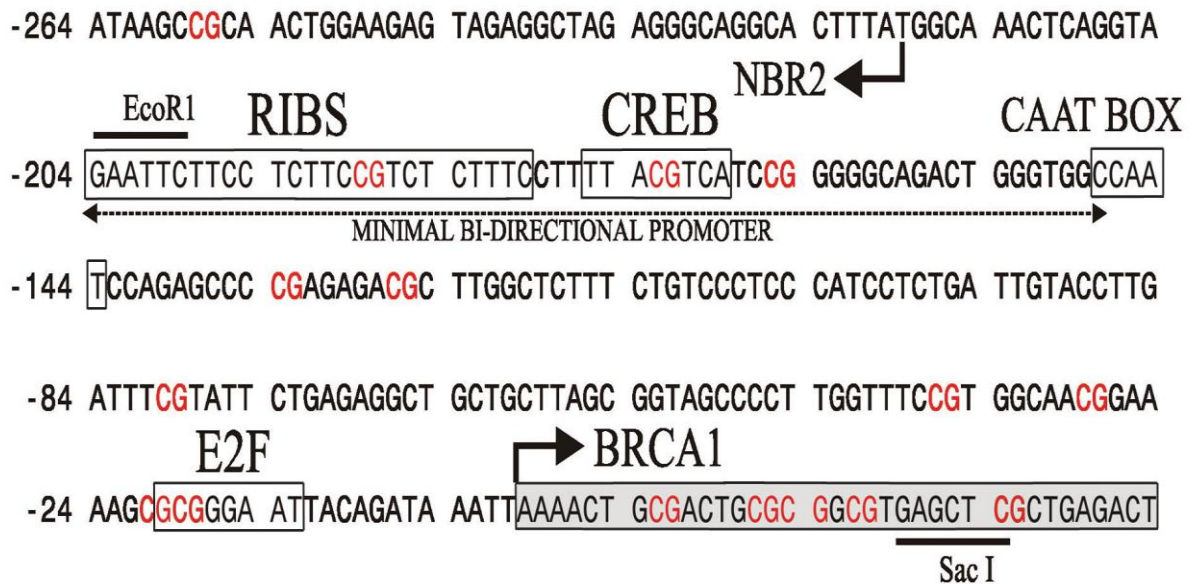


Figura 4. Secuencia del promotor del gen *brca1*. Los puntos de inicio de transcripción se indican con la flecha izquierda y el derecho de los genes respectivos. Los sitios de unión de factores de transcripción identificados como importantes para la actividad del promotor se muestran enmarcados en la imagen. El promotor bidireccional se indica por la línea discontinua. El primer exón del gen *brca1* se indica por el cuadro sombreado y los dinucleótidos CpG que pueden ser potencialmente metilados, se muestran en rojo (Tomada de Mueller y col., 2002).

En general, tanto las proteínas BRCA1 como BRCA2 están implicados en el mantenimiento de la integridad del genoma. La mayoría de las mutaciones reportadas resultan en proteínas truncadas, estas mutaciones invariablemente generan proteínas no funcionales (BRCA1 o BRCA2) lo que provocaría un acumulo de mutaciones en otros genes que podrían favorecer el desarrollo de tumores. Por tanto, estos dos genes estarían dentro de lo que se conoce como genes supresores de tumores. Un gen supresor tumoral es un gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena. Los genes supresores de tumores se encuentran en las células normales y normalmente inhiben la proliferación celular excesiva y las alteraciones del genoma. Una mutación o una delección de un gen supresor tumoral, aumentará la probabilidad de que se produzca un tumor, al perder su función. Cuando se posee una alteración en los genes *brca1* o *brca2* en células de línea germinal, cada una de las células del sujeto portador posee la mutación. Un alelo sano es suficiente para mantener la funcionalidad del gen. Es necesario, por tanto, la pérdida del alelo sano para poder llegar a desarrollar una neoplasia. La pérdida del alelo puede producirse por una delección de la zona que incluye el gen codificante, aunque también puede producirse una hipermetilación que silencia la expresión del gen (Birgisdottir y col.,2006).

La hipermetilación es un proceso mediante el cual se metilan posiciones concretas de las islas CpG que existen en la región promotora del gen *brca1*. Esta modificación del promotor impide la transcripción del gen, ya sea porque proteínas reguladoras necesarias para la transcripción ya no son capaces de unirse al

promotor o porque proteínas represoras que tienen afinidad por las zonas metiladas se unen inactivando la transcripción. Debido al gran tamaño y a la gran complejidad de los genes *brca1* y *brca2*, no se descarta que nuevas funciones puedan ser atribuidas a estos genes, que actuarían a distintos niveles mediante dominios diferentes (Wosster y col., 1995; Tavtigian y col., 1996).

1.13 Mutaciones de los genes *brca1* y *brca2* en la línea germinal

Las alteraciones provocadas en estos dos genes confieren una alta predisposición al cáncer de mama y un riesgo moderado a otros tipos de cáncer. Se han descrito más de 600 mutaciones y variantes alélicas en el gen *brca1* desde su identificación, mientras que el gen *brca2* cuenta hasta el momento con unas 450 mutaciones. No se han encontrado regiones en que las mutaciones sean frecuentes (hots spots) en estos genes, en los que se acumule un mayor número de mutaciones y sólo unas pocas mutaciones aparecen más frecuentemente en determinadas poblaciones debido a su carácter endogámico (Judíos Ashkenazi). El gran tamaño de estos genes, así como la dispersión y variedad de mutaciones que se registran en ellos, dificulta enormemente la identificación de mutaciones en poblaciones no endogámicas. La mayoría de las mutaciones descritas hasta el momento son pequeñas deleciones, inserciones o mutaciones de pérdida de sentido que provocan el truncamiento de la proteína y por tanto la pérdida de función de ésta (Eliot y col., 2003).

1.14 Mutaciones somáticas de los genes *brca1* y *brca2*

Por las características que poseen *brca1* y *brca2* como genes supresores de tumores, y el hecho que se haya observado una pérdida de heterocigocidad de las regiones pertenecientes a los genes *brca1* y *brca2* en buena parte de los cánceres esporádicos, es posible que puedan existir mutaciones somáticas en el alelo no perdido en estos genes en tumores esporádicos de mama. Sin embargo, en los tumores esporádicos de mama, no se han encontrado mutaciones en el gen *brca1* y en muy pocos casos debidas a mutaciones en el gen *brca2* (Polyak, 2002). Existen otros mecanismos mediante los cuales se puede inactivar al gen *brca1*. Se ha observado que muchos cánceres de mama esporádicos muestran una reducción de los niveles de RNAm del gen *brca1*. Este hecho implica que algún mecanismo debe estar alterando la expresión de este gen. Se piensa que esta reducción de la expresión puede ser provocada por una hipermetilación de su región promotora. *brca1* posee islas CpG susceptibles de metilación en la región promotora y se ha detectado hipermetilación de *brca1* en cáncer de mama esporádico (Futreal y col., 1994; Dobrovic y col., 1997).

1.15 La metilación del DNA como un mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica

La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas en los últimos años e incorpora un nuevo concepto a la regulación conocida como "memoria epigenética" o "memoria celular". Este nuevo concepto de memoria se suma a la definición de epigenética en la cual los cambios en la

expresión de los genes son heredables de una generación celular a otra (Lund y col., 2004).

La metilación del DNA consiste en la incorporación de un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 5 de las citosinas que se encuentran formando un dinucleótido CmpG, y en menor grado se puede encontrar la metilación en secuencias del tipo CmC(A/T)GG o CmpNpG. La metilación del DNA está mediada por enzimas denominadas DNA metil-transferasas (Dnmts, por sus siglas en inglés). Las enzimas Dnmt3a y Dnmt3b son Dnmts *de novo*, mientras que la Dnmt1 es de mantenimiento, esta última hemimetila el DNA donde una hebra ya está metilada y se encuentra asociada a la maquinaria de duplicación del DNA. La metilación del DNA participa de manera normal en la inactivación de transposones (secuencias repetidas y secuencias retrovirales) evitando su movilidad y por ende, manteniendo la estabilidad genómica. También se ha encontrado asociada a eventos de regulación en etapas tempranas de desarrollo silenciando genes que no van a volver a expresarse, la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica (Jones y col., 2007). La impronta se asocia a modificaciones epigenéticas del DNA y alteraciones de la estructura cromatínica que ocurren durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario, originando un estado funcionalmente haploide del genoma improntado. La impronta genómica (*genomic imprinting*), también llamada gamética o genética, supone modificaciones específicas en la línea germinal que produce diferencias de expresión del material genético dependiendo de su procedencia, materna o paterna (Lund y col., 2004).

1.15.1 Mecanismos de regulación

Brevemente, la estructura de la cromatina tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica, pues la activación transcripcional y la represión requiere del reclutamiento de múltiples complejos protéicos que permiten su remodelación. La cromatina está compuesta por nucleosomas cuya función principal es la de empaquetar al DNA dentro del núcleo. El nucleosoma está constituido por un octámero de las histonas; H3/H4, H2B y H2A en el cual se enrollan 147 pb de DNA. Bajo condiciones fisiológicas la histona H1 se estabiliza y compacta la estructura de la cromatina de tal manera que en el cromosoma las secuencias del DNA son inaccesibles a la maquinaria de transcripción (James y col., 2000).

1.15.2 Activación y represión mediada por la cromatina

Las alteraciones en la estructura de la cromatina, a través de la modificación postraducciona de las histonas, tiene consecuencias directas en la regulación de la expresión de genes, la acetilación de los extremos amino-terminales de las histonas ocasiona la neutralización de la carga positiva del amino terminal. Como consecuencia se presenta una relajación de la estructura nucleosomal, haciendo a la cromatina más accesible a la maquinaria transcripcional. En contraste, la desacetilación de estas regiones produce compactación de la cromatina impidiendo el acceso a los factores de transcripción.

La acetilación de las histonas depende de dos grupos de enzimas, acetiltransferasa (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs).

Complementariamente, trabajos recientes han identificado otros complejos de proteínas que son requeridos para remodelar la cromatina por desplazamiento de nucleosomas dependientes de ATP. Estos fueron encontrados originalmente en levaduras, entre ellos se encuentran las proteínas SWI/SNF, RSC (del inglés: "Remodels the Structure of Chromatin"), CHRAC (del inglés: "Chromatin accessibility complex"), NURF (del inglés: "Nucleosome remodeling factor") en humanos hSWI/SNF, NuRD (del inglés: "nucleosome remodeling and deacetylation"), RSF (del inglés: "remodeling and spacing factor") (Jocelyn y col., 2000; Cress y col., 2000; Burke y col., 2000). Estos complejos favorecen un remodelaje de la cromatina tanto con consecuencias activadores como represoras para la función transcripcional. Actualmente no queda claro su modo de acción aunque se propone que estos complejos movilizan de alguna manera los nucleosomas facilitando o bloqueando el acceso a las secuencias reguladoras claves en regiones de control como las promotoras (Esteller 2007).

Las técnicas utilizadas para estudiar la metilación del DNA son variadas y van desde las muy generales, como la digestión del DNA con enzimas de restricción metilo-sensibles (como *MspI/HpaII*) revelando la zona de interés utilizando las técnicas *Southern Blot* y la PCR específica de metilación (MS-PCR), a los métodos más sensibles como la PCR mediada por ligación (LM-PCR, por sus siglas en inglés) y la secuenciación genómica por bisulfito de sodio. Dentro del

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

1.16 Metilación del promotor del gen *brca1* en cáncer de mama esporádico

Actualmente existen reportes en los que se hace el análisis epigenético para entender la relación que existe entre la metilación de la región promotora del gen *brca1* en cáncer de mama esporádico y la expresión de la proteína BRCA1. Hay reportes de análisis epigenéticos, en los que se han estudiado la relación que existe entre la metilación de la región promotora del gen *brca1* y la expresión de la proteína; encontrándose que la metilación en la región promotora el gen *brca1* participa en el desarrollo de cáncer de mama esporádico al ocasionar la disminución de la expresión de la proteína BRCA1. Algunos de estos reportes se resumen a continuación.

Dobrovic y col., en 1997, estudiaron siete tumores de cáncer de mama encontrando que en dos existía hipermetilación en la región promotora del gen

brca1 con respecto al tejido normal donde no encontraron metilación. En otro estudio, Esteller y col., en el 2000 analizaron el estado de metilación del promotor del gen *brca1* en 215 tumores mamarios y en 21 líneas celulares, así como siete xenotransplantes, encontrando una hipermetilación y disminución de la expresión del RNAm en dos xenotransplantes en 13% de los tumores y además pérdida de la heterocigocidad. Sin embargo, en las líneas celulares no encontraron alteraciones en el estado de metilación. Por otra parte, Valgerdur y col. en 2001, evaluaron también el estado de metilación del promotor del gen *brca1* en 146 tumores de mama esporádico, encontrando hipermetilación en 13 tumores (9.1%). De estos, nueve mostraron una reducción en la expresión de la proteína y una delección en el gen *brca1*.

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

II. JUSTIFICACION

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

En la actualidad no existen estudios relacionados con la regulación epigenética del gen de *brca1* en cáncer de mama esporádico en población mexicana, por lo que en el presente proyecto proponemos analizar el grado de metilación de su región promotora.

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

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general.

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

2. Objetivos específicos.

- 1.- Determinar la expresión de la proteína BRCA1 en tumores de mama.
- 2.- Determinar el estado de metilación del promotor del gen *brca1* en tejido mamario neoplásico y correlacionarlo con los niveles de la proteína BRCA1.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

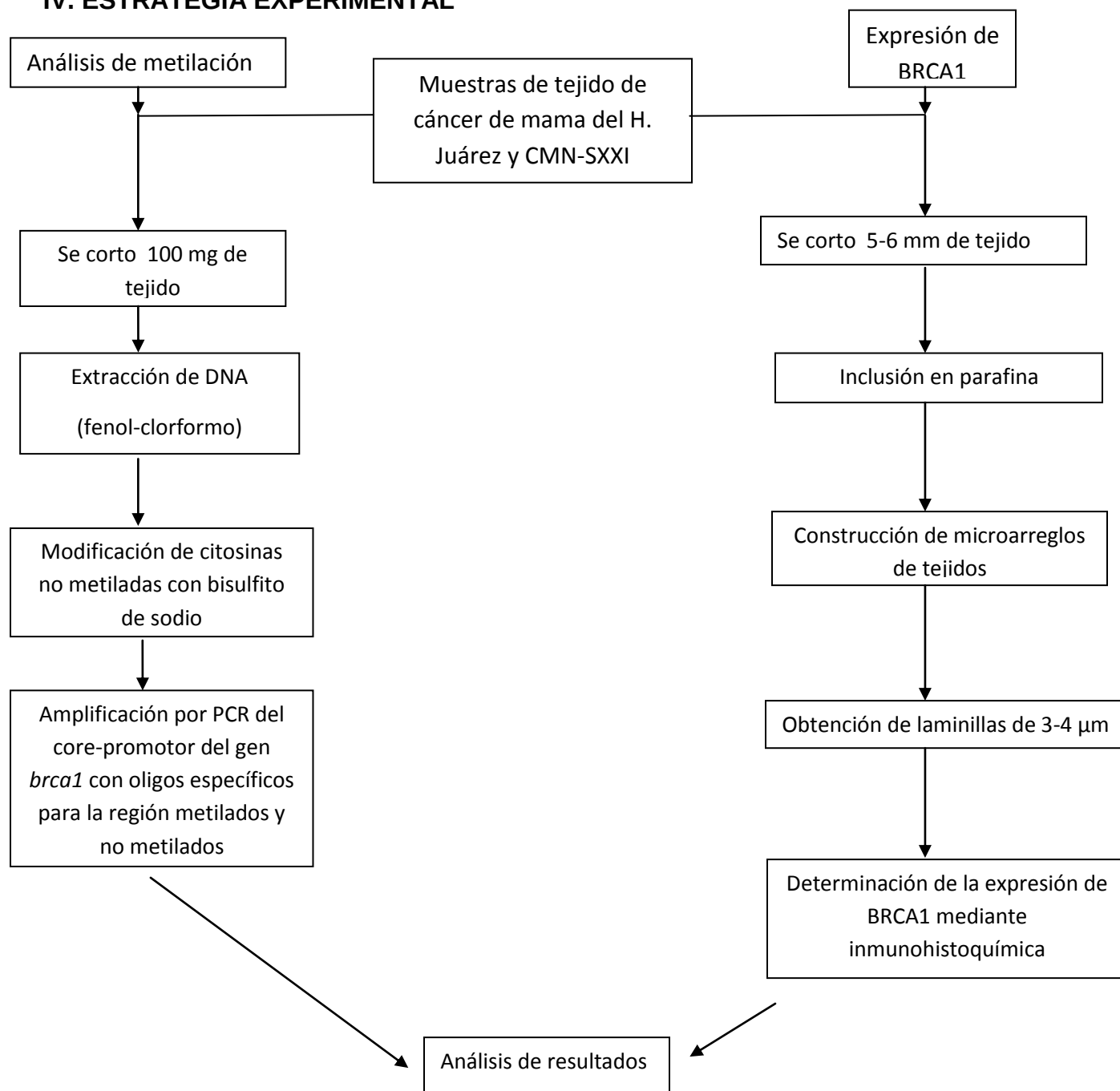


Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia general. Las biopsias de cáncer de mama se fraccionaron en dos partes: una de ellas se utilizó para determinar el estado de metilación del promotor, utilizando la técnica de bisulfito de sodio y la otra parte del tejido se utilizó para determinar el nivel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

V. METODOLOGIA

1. Diseño del estudio

Se trata de un estudio descriptivo, transversal y analítico.

2. Tamaño de la muestra y muestreo

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

Para obtener biopsias que sean representativas y que nos permitieron tener resultados confiables, estas pasaron por dos filtros de selección. El primero fue el

diagnóstico clínico dictaminado por el médico cirujano que confirmó y determinó la etapa patológica en la que se encontró el tumor en base a la clasificación TNM. El segundo fue el análisis histológico, evaluado mediante una impronta del tejido mamario en donde se verificó la variedad histológica de la biopsia (ductal o lobulillar) así como la celularidad de la misma. Para que una biopsia sea representativa de un tumor debe contener al menos un 70% de células malignas.

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

3. Inclusión de los tejidos en parafina

Se cortaron 5 mm de tejido, se colocaron en 20 ml de paraformaldehído para fijar el tejido durante 12 h. Posteriormente, se deshidrataron las muestras mediante la inmersión subsecuente en soluciones de alcoholes (70%, 80%, 90% y Absoluto). Una vez deshidratado se embebió en parafina a 56°C. Después de que se obtuvo el bloque con las muestras, se realizaron cortes finos de 3-5 μ m y cada muestra se tiñó con hematoxilina y eosina (HE) para el análisis histopatológico. La tinción de tejidos con HE se realizó durante 30 s, luego se lavaron las laminillas con agua corriente y se quitó el exceso de HE pasando las laminillas por alcohol ácido (200 ml de agua destilada, 100 ml de alcohol 96 % y 1.0 ml de ácido

clorhídrico concentrado) durante unos segundos. A continuación se lavó nuevamente con agua corriente y se incubó en agua amoniacal (300 ml de agua destilada, 1.0 ml de hidróxido de sodio) durante 2-4 s. Se volvió a lavar con agua corriente y se sumergieron las laminillas en alcohol al 50%. Para luego teñir con eosina durante 2-3 s. Se enjuagó y comenzó la deshidratación del tejido sumergiendo las laminillas en etanol al 96% durante 5 min, luego en etanol al 100% durante 5 min y en xilol durante 10 min. Finalmente se montó el cubreobjetos a la laminillas empleando reactivo de Permont.

4. Microarreglos de tejidos (MAT)

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

Para la construcción de los microarreglos luego de la selección del material objeto de estudio en los portaobjetos de las biopsias teñidos con HE se localizó la zona en el bloque de tejido donante conservado en parafina. Se construyó un bloque de parafina en blanco que será el bloque receptor de los microarreglos tisulares. Se preparó el Tissue-Arrayer II colocando dos agujas de punción, donante y receptora, con una sección de 1 mm en la torreta. Con la aguja

receptora se realizó una perforación en el bloque receptor y se extrajo el cilindro blanco de parafina sobrante de la aguja receptora. Situando la bandeja puente protectora encima del bloque receptor, se colocó encima el bloque de tejido donante conservado en parafina. Se realizó una perforación en la zona preseleccionada del bloque donante con la aguja donante del Tissue-Arrayer II, obteniendo un cilindro del interior de la aguja donante, al presionar sobre el tope de profundidad situado por encima de la aguja de punción. Se introdujo el cilindro de tejido donante en el orificio previo que se había efectuado en el bloque receptor. Se avanzó la torreta del Tissue-Arrayer II dos vueltas del orificio anterior haciendo una nueva perforación con la aguja de punción receptora y se repitieron los pasos que se describieron, y así sucesivamente, hasta completar la primera fila de orificios y oclusión con cilindros tisulares donantes en el bloque receptor (spots). Con el micrómetro se efectuó un desplazamiento lateral para separar otras 2 vueltas del último orificio realizado en la primera fila comenzando a construir el primer orificio de la segunda fila. Se repitieron los pasos descritos para la primera fila, en la segunda y sucesivas filas. Una vez completado el primer bloque receptor de Tissue-Arrayer II se siguió el procedimiento idéntico para el resto de bloques receptores.

4.1 Obtención de laminillas

Una vez fabricado el bloque del microarreglo de tejido (MAT) se colocó el bloque en el micrótopo (Leica RM 2125), se alineó y rebajó el bloque hasta obtener cortes representativos de todas las muestras posicionadas en el MAT. Para obtener las laminillas se hicieron cortes de 5 μm , se utilizó el sistema de

transferencia de cinta PSA. Se colocó un segmento de la cinta sobre el bloque y se procedió a obtener los cortes de 3 μ m, una vez que se obtuvo el corte en la sección de cinta se colocó en una laminilla con adhesivo, se le pasó un rodillo y se expuso a la luz ultravioleta durante 2 min para fijar el tejido a la laminilla, después se sumergió en el solvente TCP para desprender la cinta adhesiva y obtener los MATs, los cuales se colocaron a 60°C, durante 24 h para desparafinar y se sumergieron en xilol durante 24 h para retirar los residuos de adhesivo.

4.2 Inmunohistoquímica por el sistema Avidina-Biotina (ABC)

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

4.3 Contratinción con Hematoxilina de Mayer y montaje

Para contrateñir las muestras, se sumergieron las laminillas en hematoxilina de Mayer unos 30 s, se lavó con agua y se incubó en agua amoniacal durante 5 min. A continuación se volvió a lavar con agua y luego se sumergió en etanol al 96% durante 5 min, posteriormente en etanol al 100% durante 5 min y en xilol

durante 10 min, todo a TA. Finalmente, se montó el cubreobjetos a la laminillas empleando reactivo de Permont.

4.4 Digitalización de los MATs y cuantificación

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

5. Extracción de DNA

Se realizó la extracción del DNA de los tumores mediante el método de proteinasa K (fenol-cloroformo). A partir de 100 mg de tejido congelado se maceró la muestra con mortero. Se le agregó el buffer de digestión (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH=8.0, 25 mM de EDTA, SDS 0.5%, 0.1 mg/ml de proteinasa K), se incubó la muestra durante 18 h a 50°C. Posteriormente, se realizó la extracción volumen:volumen con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Después, se centrifugó durante 5 min a 16,000 g. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se precipitó con acetato de amonio e isopropanol, se lavó dos veces la pastilla con

etanol al 70% se centrifugó nuevamente durante 3min a 800g. Finalmente, el DNA puro se resuspendió en un volumen de 50 µl de agua libre de nucleasas y se analizó la integridad y calidad del DNA mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las bandas fueron analizadas mediante la tinción con bromuro de etidio y visualizadas bajo un transiluminador con lámpara de luz UV.

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

Se realizó la restricción de 1µg de DNA con la enzima *Hind*III (5U) durante 6 h a 37°C. Se desnaturalizó con NaOH 3M a 37°C, se agregó hidroquinona 10mM y bisulfito de sodio 10M a pH 5 durante 16 h a 55°C en oscuridad. Posteriormente, se retiró el bisulfito de sodio pasando las muestras por columnas Wizard de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega A-7280). Se desnaturalizó la muestra con NaOH 3M, se incubó a 37°C, y se precipitó con acetato de amonio 5M pH=7, glicógeno y etanol Absoluto. durante 4 h a -70°C. Finalmente, se centrifugó a 16,000 g durante 1 h a 4°C y la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua d.dH₂O.

VI. RESULTADOS

1. Selección de casos

De las muestras biológicas de los pacientes se revisaron 200 registros y de acuerdo a los criterios de inclusión se seleccionaron 180 muestras. A partir de estas biopsias, se obtuvieron cortes de 5 mm y se embebieron en parafina como se menciona en materiales y métodos. Estas muestras fueron analizadas por dos patólogos en forma independiente, quienes revisaron que el tejido estuviera bien conservado y el diagnóstico fuera concordante con el del registro y que contuviera al menos 80% de células neoplásicas. Con base en el análisis histopatológico, solo 78 muestras resultaron útiles para el estudio, las cuales incluyeron 69 tumores donde el tipo histológico que resultó más frecuente fue el carcinoma ductal infiltrante con un 83.3% de los casos, seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante con un 5.1% y nueve tejidos peritumorales (11.53%). Además, se incluyeron siete controles de tejidos de mama normal y cuatro controles positivos de tejido prostático normal. En la tabla 2 se resumen las características de las 78 muestras que resultaron adecuadas para el presente estudio.

De las 78 muestras y controles incluidos en parafina, se realizaron cortes de 4-5 μm . Estas laminillas se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar el área de estudio, se revisaron al microscopio buscando áreas en donde se encontraron las células tumorales y evitar tomar áreas donde no estuviera presente la lesión. Una vez localizadas las áreas de interés se puntuaron con un marcador indeleble al menos tres secciones representativas para la construcción del TMA (figura 6, flecha vertical).

Tipo histológico de las biopsias	Numero de muestras	% casos
Carcinoma ductal infiltrante	65	83.3
Carcinoma lobulillar infiltrante	4	5.1
Tejido peritumoral mamario no afectado	9	11.53
Total	78	100

Tabla 2. Tipo histológico y número de muestras analizadas. En el cuadro se resumen las características histopatológicas de las muestras que fueron útiles para el presente estudio de un total de 180 a las cuales se les realizó el escrutinio patológico inicial.

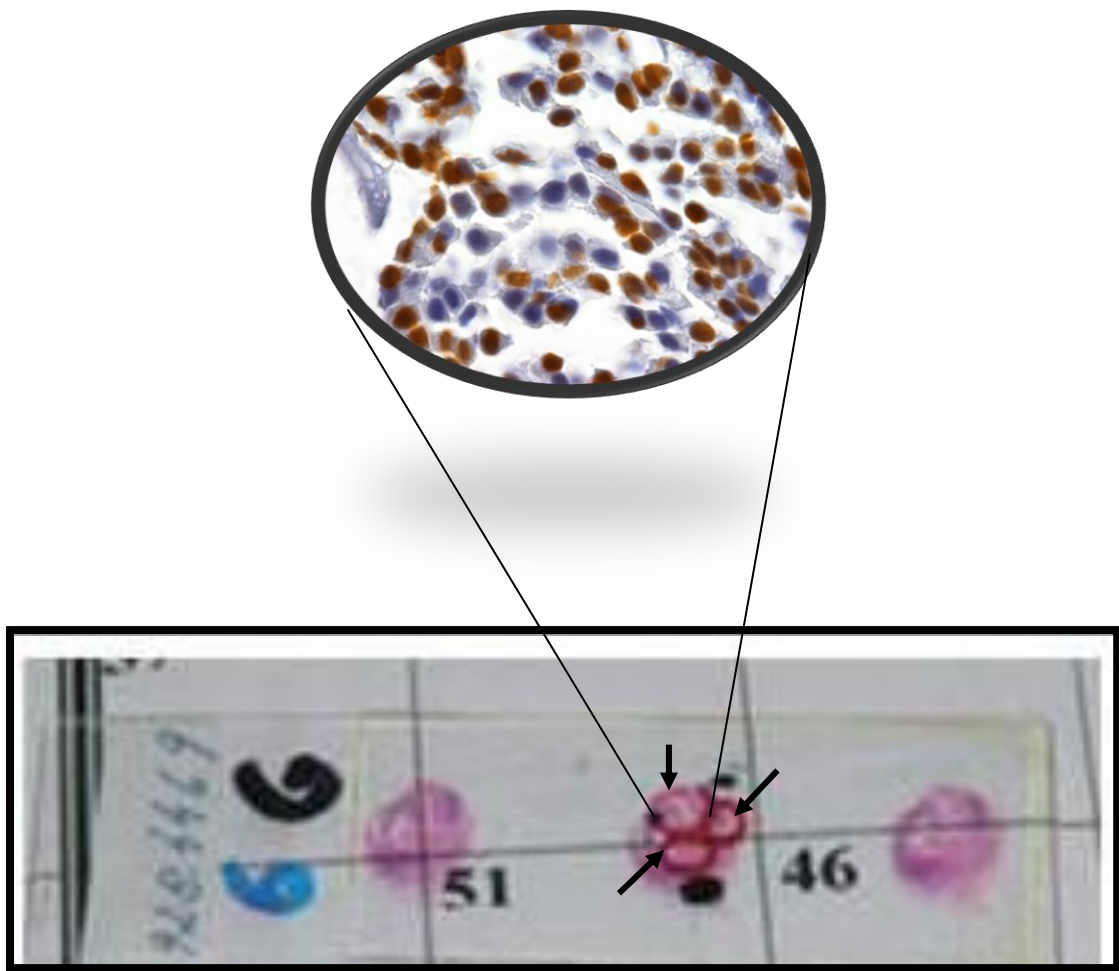


Figura 6. Selección de áreas con células neoplásicas teñidas con HE. Las flechas ejemplifican el área de las cuales se tomó una sección de tejido tumoral representativa para la construcción de los MATs, en parte superior se muestra el area en donde se encuentra las células neoplasicas.

2. Construcción de los microarreglos de tejidos (MATs)

Se elaboraron dos mapas que definen los TMAs, en los cuales se organizaron 11 controles (tejido mamario no afectado y de próstata normal), solo se deposito un cilindro por cada control) y de las 78 muestras se depositaron tres cilindros. De tal manera, en el mapa 1 se arreglaron 120 cilindros de 40 muestras y 11 controles (figura 7). En el mapa 2 arreglaron 114 cilindros de 38 muestras, mas 11 controles (figura 8). En las figuras 5 y 6, se muestran los arreglo de los tejidos, en color gris se representan los tejidos seleccionados previamente los cuales se arreglaron por columnas de arriba hacia abajo por triplicado. Los números dentro del círculo representan el número de muestra, los círculos amarillos representan los controles de tejido de mama normal y los círculos rojos representan el control positivo que expresa normalmente la proteína BRCA1.

MAPA 1

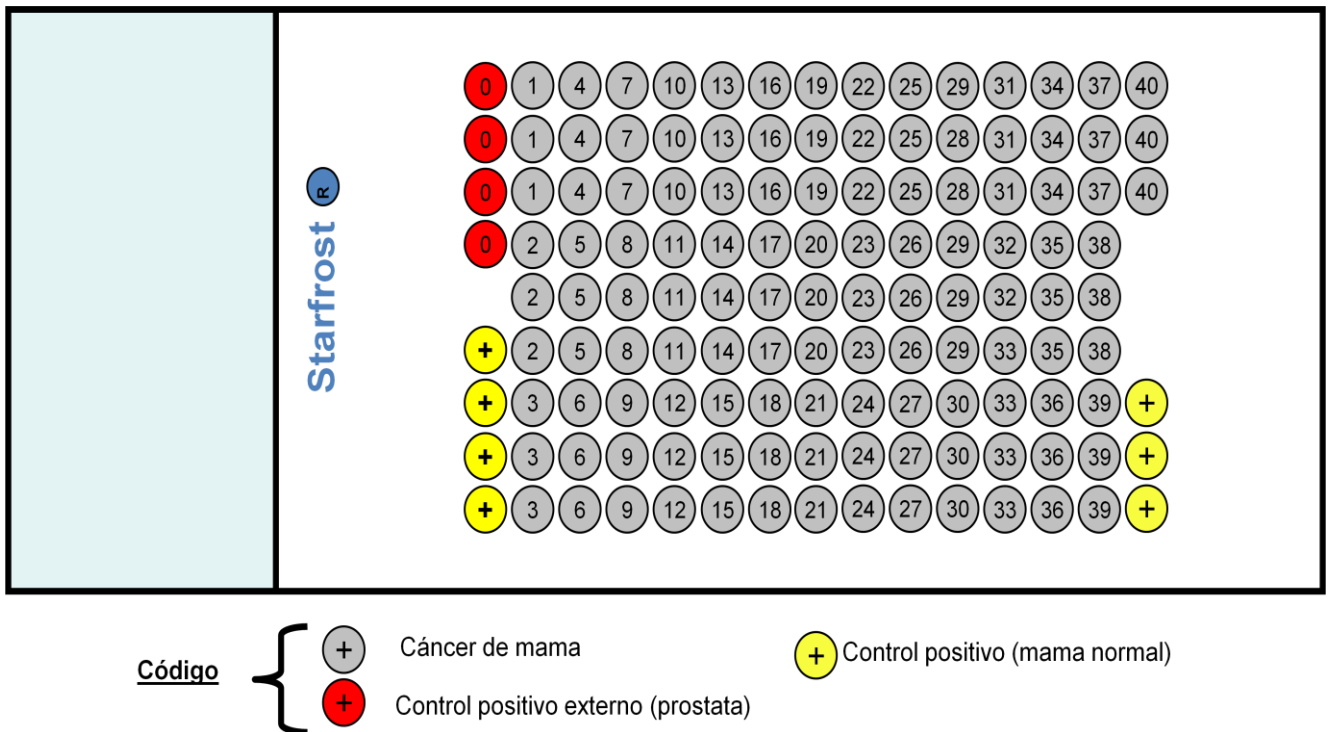


Figura 7. Mapa 1 del microarreglo de tejido. En la figura se observa la localización de las muestras 1 a 40 en color gris, el número dentro del círculo se refiere al No. de la muestra. El color rojo representa control externo tejido de próstata sano y el amarillo representa los controles de tejido sano.

MAPA 2

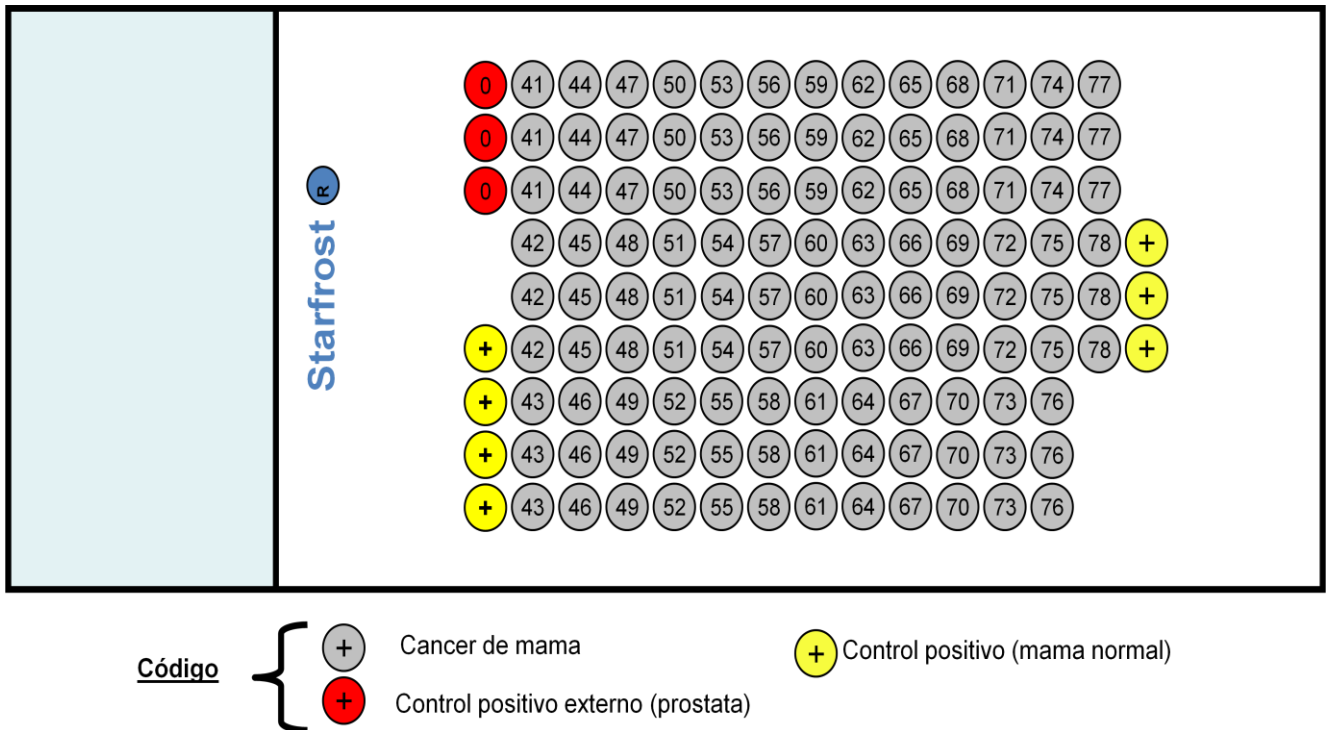


Figura 8.- Mapa 2 del microarreglo de tejido. En la figura se observa la localización de las muestras 41 a 78 en color gris, el número dentro del círculo se refiere al número de la muestra. El color rojo representa control externo de tejido de próstata sano y el amarillo representa los controles de tejido sano.

En base a los mapas diseñados y a una vez determinadas las áreas de interés en las laminillas, se procedió a la construcción de los TMA como se describió en material y métodos. En la figura 9, se muestra la construcción de los TMA de tejido de cáncer de mama esporádico y tejido normal.

Se construyeron dos bloques, uno de las muestra 1 a 40 (mapa1) y el segundo de las muestras 41 a 78 (mapa 2), ambos con sus controles tejido normal de mama y como control externo tejido prostático (figura 10). Los resultados muestran que la plataforma “Manual Tissue-Arrayer II” que se utilizó para la construcción de los micromicroarreglos permitió arreglar con precisión y exactitud las muestras de tejido mamario.

3. Obtención de laminillas

Una vez fabricados los bloques de los microarreglos, se procedió a hacer cortes de 5 μ m como se describió en material y métodos, de cada bloque se hicieron 5 cortes para estandarizar la inmunohistoquímica y determinar la expresión de la proteína BRCA1.

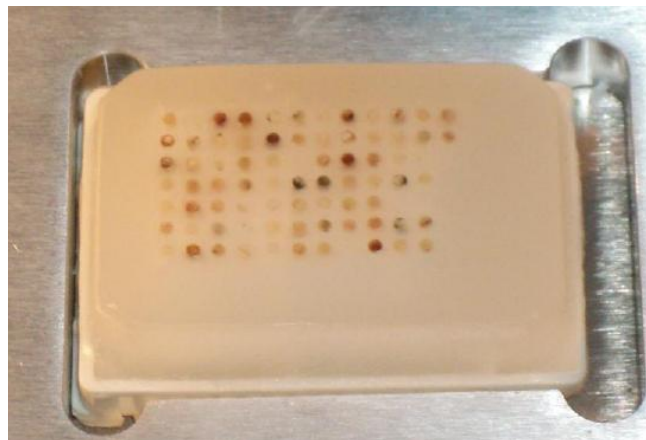
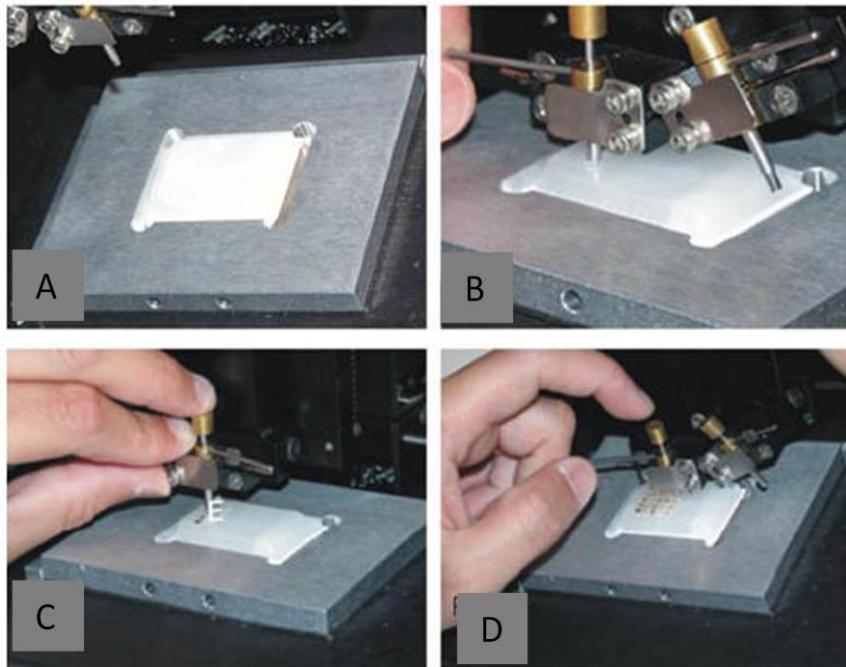
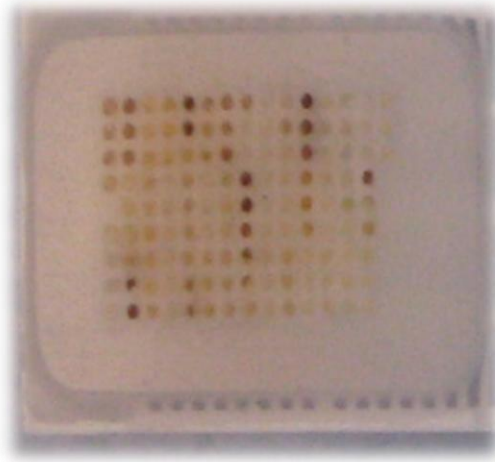


Figura 9. Construcción del MATs. (A) Se muestra el bloqueceptor en el cual se insertaron las muestras. (B-C) Se muestran la formación de los orificios utilizando una aguja de 1mm y cómo se arreglaron en base a los mapas descritos previamente. En la imagen D se muestra la inserción de las muestras. En la imagen de abajo se ejemplifica un bloque de MATs terminado.

Bloque I



Bloque II

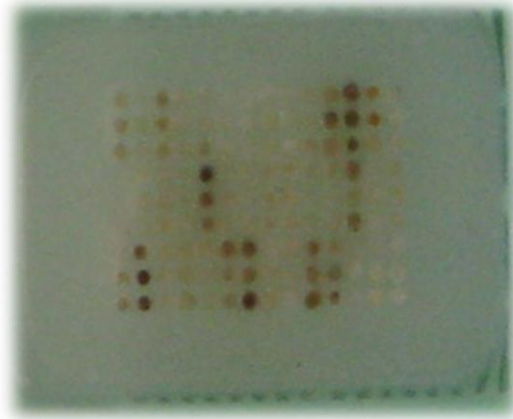


Figura 10. Microarreglo de tejidos. Se construyeron dos microarreglos, el bloque I contiene 120 cilindros más controles y el bloque II contiene 114 cilindros más los controles de acuerdo a lo descrito en los mapas de las figuras 5 y 6.

4. Detección de la proteína BRCA1 mediante inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se estandarizó en cortes de bloques completos de cáncer de mama y tejido no afectado en cortes de 4 μm , el anticuerpo que se utilizó fue Anti-BRCA1 (Calbiochem). Se probaron las siguientes diluciones 1/100, 1/250, 1/500 y 1/1000 de las cuales la mejor fue la dilución fue 1/100. Se utilizó el sistema ABC (Avidina-biotina) descrito en material y métodos. La figura 11 A-B, muestran la inmunotinción de un tejido de mama no afectado, donde se observa la expresión de la proteína BRCA1 en el núcleo (tinción de color pardo) principalmente en los ductos mamarios, mientras que las células que tienen el núcleo teñido de azul representan células que no expresan la proteína BRCA1. En la figura 11-C, se ejemplifica la inmunotinción de tejido de cáncer de mama, el cual no mostró expresión de la proteína BRCA1 en este caso todas la células mostraron tinción azul en su núcleo; en la figura 11-D se ejemplifica la expresión de la proteína BRCA1 en cáncer de mama. La ausencia de tinción podría deberse a algún mecanismo de inhibición de la expresión de la proteína BRCA1, incluyendo cambios epigenéticos como la metilación.

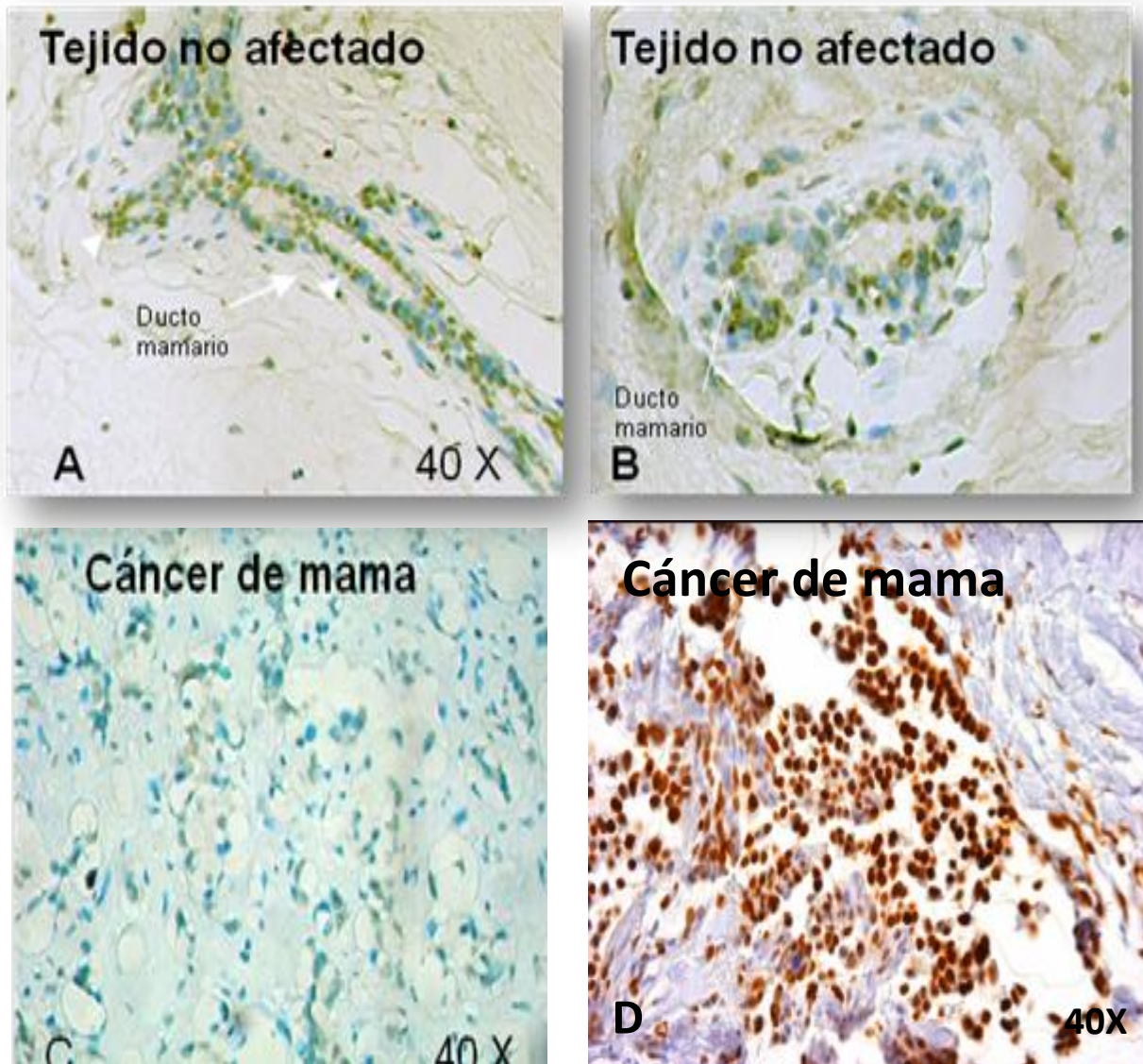


Figura 11. Inmunodetección de la proteína BRCA1 en tejido no afectado y neoplásico. En los paneles A-B se muestra la presencia de la proteína BRCA1 básicamente en los ductos mamarios. En el panel C se ejemplifica tejido neoplásico con ausencia de la proteína BRCA1 y en D se ejemplifica la expresión de la proteína en cáncer de mama.

Una vez estandarizada la inmunohistoquímica para el anticuerpo anti-BRCA1, se realizaron pruebas en las laminillas de los MATs con la dilución 1:100 y se utilizó un control de isotipo (IgG inespecífico) en la misma dilución, como se muestra en la figura 12. En la imagen del lado derecho, se ejemplifica la localización nuclear de BRCA1 en una muestra de cáncer mamario. En la figura 12, del lado izquierdo, se ejemplifica un tejido neoplásico con el control de isotipo, el cual es negativo para la reacción, lo cual demuestra que no existe reacción cruzada del anticuerpo control en nuestros experimentos.

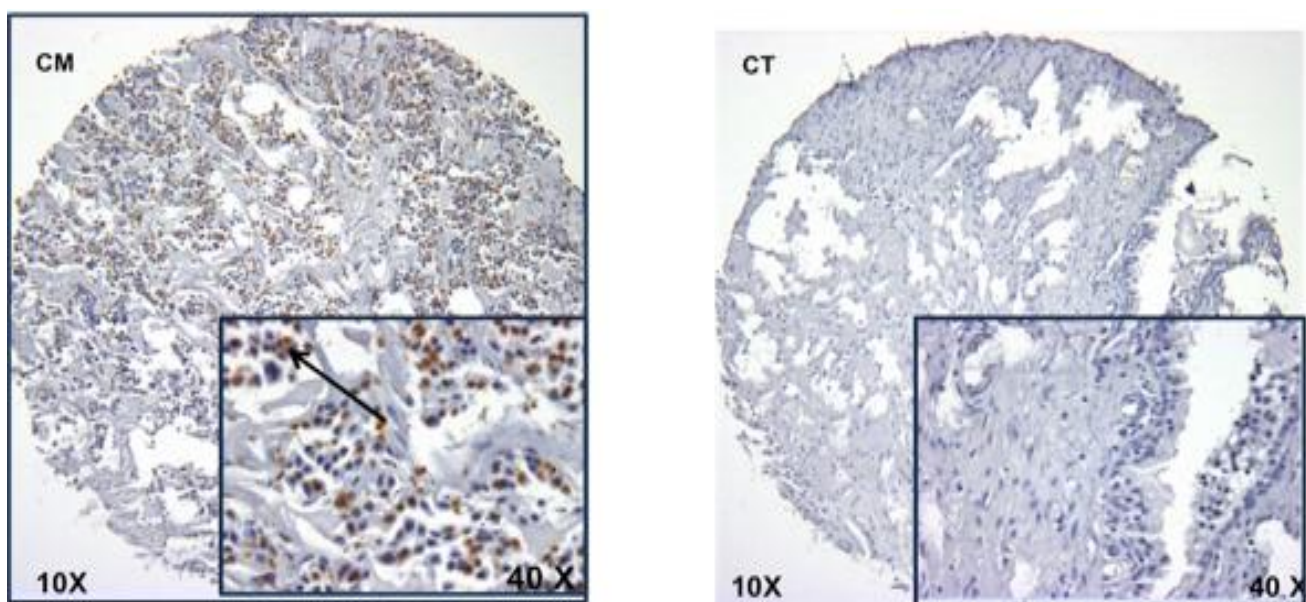


Figura 12. Inmunodetección de la proteína BRCA1 y control de isotipo en tejido mamario tumoral en los MATs. Se observa la presencia de la proteína BRCA1 en color pardo de localización nuclear (lado izquierdo, recuadro) en una biopsia de cáncer de mama y en el lado derecho el control negativo la ausencia de señal del anticuerpo anti-BRCA1 (1/100).

Posteriormente, se realizó la inmunohistoquímica en las laminillas de los MATs. En la figura 13 se ejemplifican los diferentes niveles de expresión (normal, baja, media y alta) detectados mediante la inmunohistoquímica. Se tomaron tres fotos por cilindro en un aumento de 40X de manera aleatoria. Es decir por cada muestra se digitalizaron nueve imágenes, en las cuales se realizó el análisis morfométrico de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos.

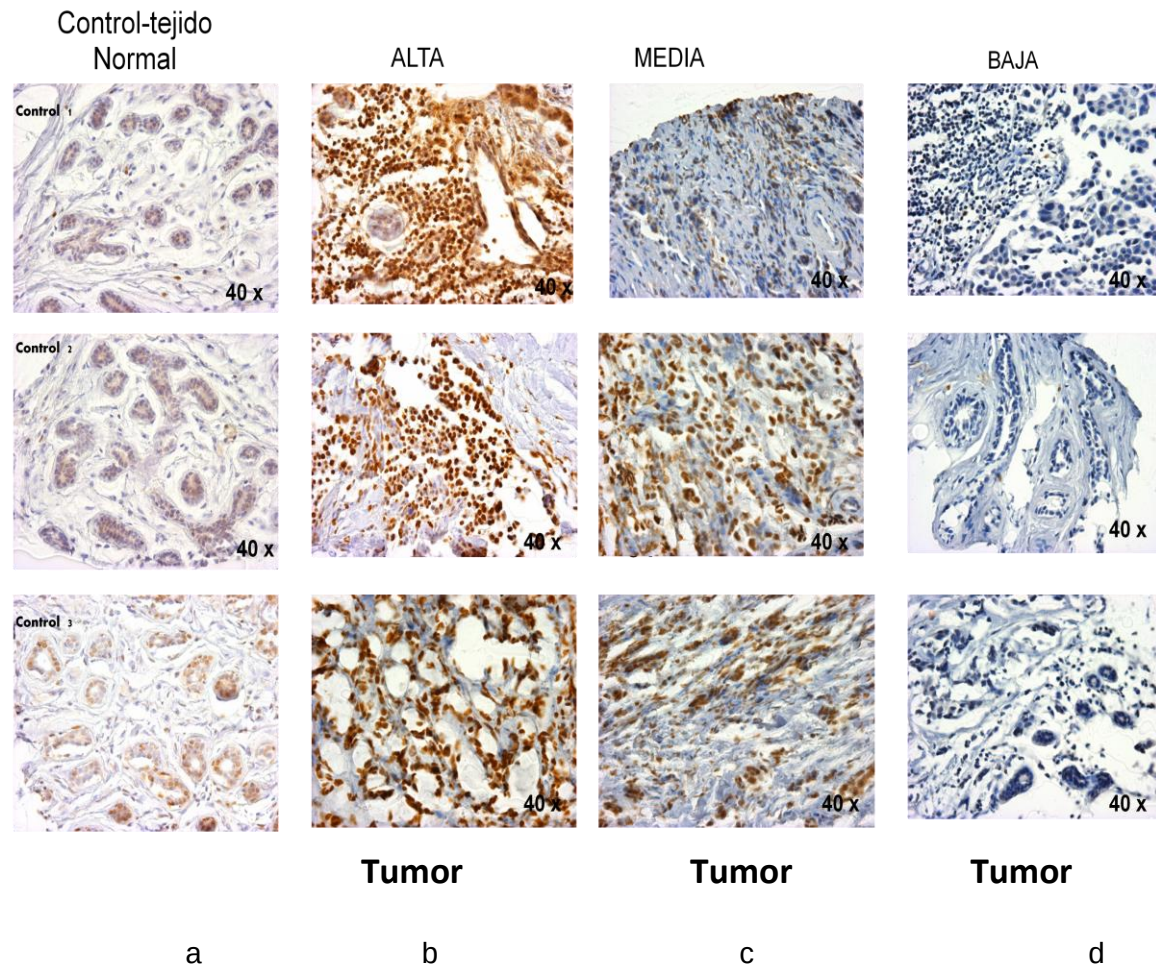


Figura 13. Niveles de expresión de la proteína BRCA1 en tumores de cáncer de mama. Las imágenes muestran una tinción heterogénea correspondiente a la expresión de la proteína BRCA1. En A se muestra la presencia de la proteína BRCA1 en tejido normal; B) se muestran tres diferentes tumores los cuales mostraron una tinción alta de la proteína BRCA1; C) se muestran 3 tumores con una tinción media y d) tres diferentes tumores en los cuales hay una baja tinción.

5. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas anti-BRCA1

Para el análisis morfométrico se seleccionó la imagen, la intensidad de luz, el área, la densidad integrada media, el IOD (densidad óptica integrada) y el número de objetos medidos con el objetivo óptico de 40X. Una vez establecidos los parámetros se determinó el área mediante un recuadro y se localizaron las células que expresaron la proteína BRCA1, por la detección de la unión positiva y específica de los anticuerpos. El programa detectó automáticamente todas las células que presentaron la reacción positiva (ver figura 14). Los IOD se generaron en un archivo de tipo Excel conteniendo todos los datos del análisis de la señal en las células analizadas.

- 64 -

Se realizó el análisis de la expresión de la proteína BRCA1 en los tumores con el IOD obtenido del análisis morfométrico de cada una de las tres imágenes capturadas, se realizó un promedio el cual se muestra en la tabla 3. Las muestras analizadas en las que se encontró una disminución en la expresión de la proteína BRCA1 se observan del lado izquierdo de la tabla, las cuales corresponden a carcinomas ductales infiltrantes etapa III y un carcinoma lobulillar etapa II, con un promedio de edad de 55 años. Las muestras que presentaron una expresión normal de la proteína BRCA1 se presentan en las columnas centrales de la tabla, corresponden a carcinomas ductales infiltrantes etapa III, con un promedio de edad de 50 años y a tejidos mamarios no afectados adyacentes. Y las muestras que presentaron un sobre expresión de la proteína BRCA1, corresponden a carcinomas ductales infiltrantes etapa II y III, y un carcinoma lobulillar, descritas en las columnas del lado derecho de la tabla 3.

Sobre expresados		Normales		Sub expresados	
muestra	IOD	muestra	IOD	muestra	IOD
2	85785	3	4315	1	17237
4	36657	23	1121	9	0
5	79517	30	5959	10	33440
6	81242	32	437	15	15972
7	17627	36	7816	18	15840
8	76670	39	3051	21	14504
11	99976	40	2357	25	26579
12	68097	41	6418	26	13579
13	102167	47	4725	28	22801
14	53824	48	3497	31	15886
16	78987	53	2378	33	12190
17	82953	54	1316	34	13528
19	80042	55	6930	35	9733
20	36563	56	511	37	10625
22	91204	58	1647	42	8673
24	62620	59	5422	44	33674
27	40216	60	1388	51	20061
29	49437	61	196	52	13374
38	37199	62	928	67	16837
43	58744	63	3187	68	8660
45	53633	64	6352	69	18313
46	59562	65	4410		
49	43276	70	2809		
50	38795	71	8125		
57	43405	72	7369		
66	35718	73	286		
		74	6854		
		75	6675		
		76	6854		
		77	4671		
		78	751		

Tabla 3. Promedio de los IOD de las muestras analizadas. En el cuadro se presenta en tres columnas principales el nivel de expresión de la proteína BRCA1. En el lado izquierdo las sub expresadas en una columna el número de muestra y en la subsecuente el promedio del IOD de las tres imágenes analizadas. En el centro se presentan las muestras en un rango normal y en el lado derecho las muestras que presentaron una sobre expresión con referencia al promedio de los controles no afectados.

El nivel de expresión se determinó a través del cociente entre el IOD de las muestras, con respecto al IOD del tejido no afectado, y se transformó en $\log_2$, de tal manera que los valores de sub expresión se observan negativos y superiores de 1 negativo, mientras que los sobre expresados son mayores de 1. Los tejidos con valores en un rango normal están comprendidos entre 1 negativo, pasando por cero hasta 1 en logaritmo base 2. Se graficó como se muestra en la figura 15. Podemos observar una disminución en la expresión de BRCA1 en 41% (32 muestras), 26% fueron normales (20 muestras) y 33% de tumores detectamos que la proteína aumento su expresión (26 muestras).

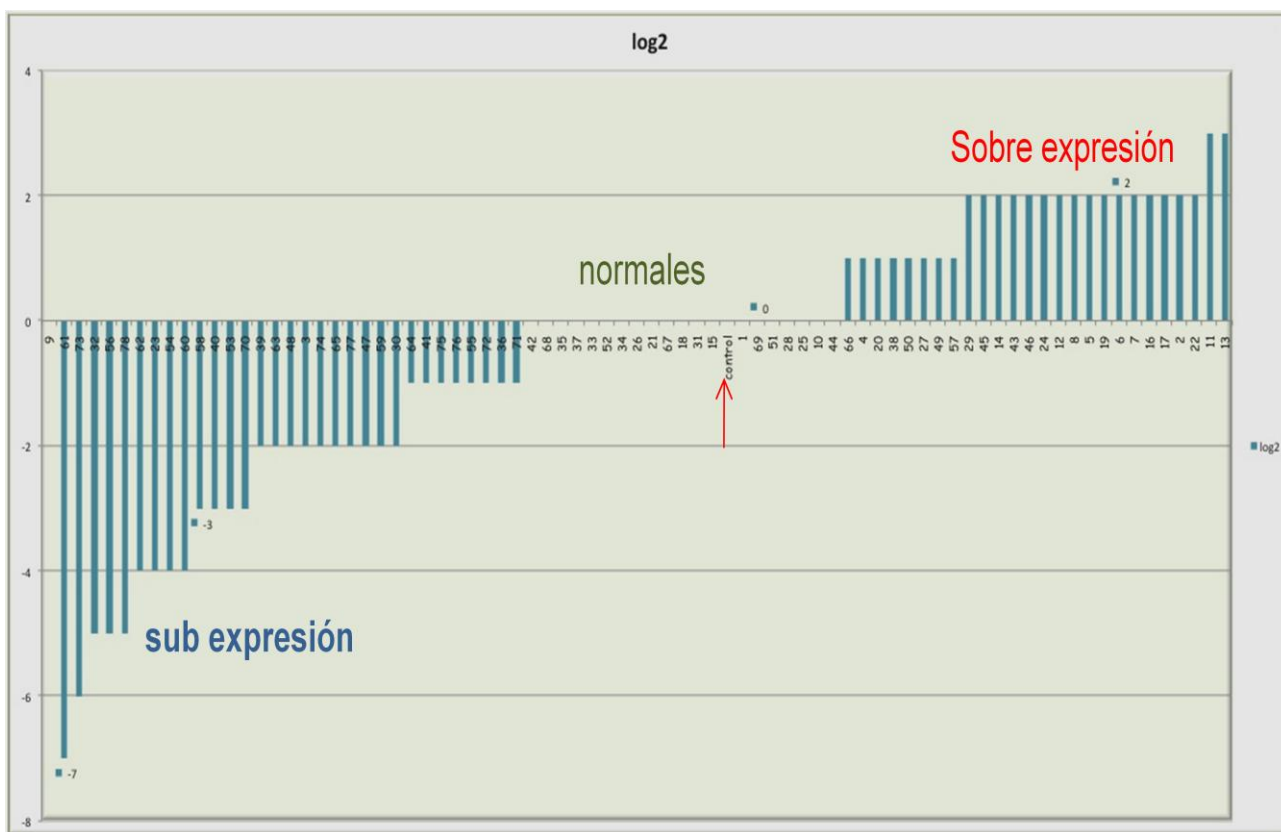


Figura 15. Expresión de la proteína BRCA1 representada en log2. Se muestran las 78 muestras analizadas, de las cuales 32 disminuyen su expresión, mientras que 20 fueron normales y en 26 aumentó la expresión de BRCA1 (barras azules). Los números representan el número de tumor.

6. Extracción de DNA de tejidos mamarios

A partir de 100 mg de tejido se realizó la extracción de DNA de las 78 muestras, como se describió en materiales y métodos. En la figura 16 se ejemplifica el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2%, de ocho muestras de DNA, las concentraciones DNA obtenidas van desde 800 ng/μl a 1265 ng/μl, con rango de pureza 1.77 a 1.82.

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

La modificación del DNA por este método consiste de tres pasos que son: sulfonación, deaminación y desulfonación. Una vez modificado el DNA y para comprobar la modificación de citocinas a uracilos, se utilizó un juego de oligonucleótidos que amplifican en regiones en donde es poco probable que esté metilado, se realizó una PCR anidada. Para la estandarización de la técnica bisulfito de sodio se utilizó como control DNA de linfocitos y DNA de la línea celular MCF-7, debido a que está reportado para ambos genes que no están metilados en la región promotora. En la figura 17 se muestra la amplificación de la región de -180 a +20 correspondiente a la región promotora del gen *brca1* tratado con bisulfito de sodio. Se muestran los productos de amplificación de 250 pb obtenidos de DNA de sangre periférica (líneas 1 y 2), de MCF-7 (líneas 3 a 5), con estos resultados pudimos corroborar que el tratamiento con bisulfito de sodio de las muestras se llevó a cabo correctamente mediante la conversión de C-T, al amplificar con los iniciadores diseñados para este fin.



Figura 16. DNA genómico provenientes de tejido de cáncer de mama. Se ejemplifica el DNA obtenido de ocho muestras del carril 1 al 8, se observan dos bandas, una que corresponde a DNA genómico que no migra más allá del pozo debido al tamaño y una segunda banda de DNA probablemente de menor tamaño.

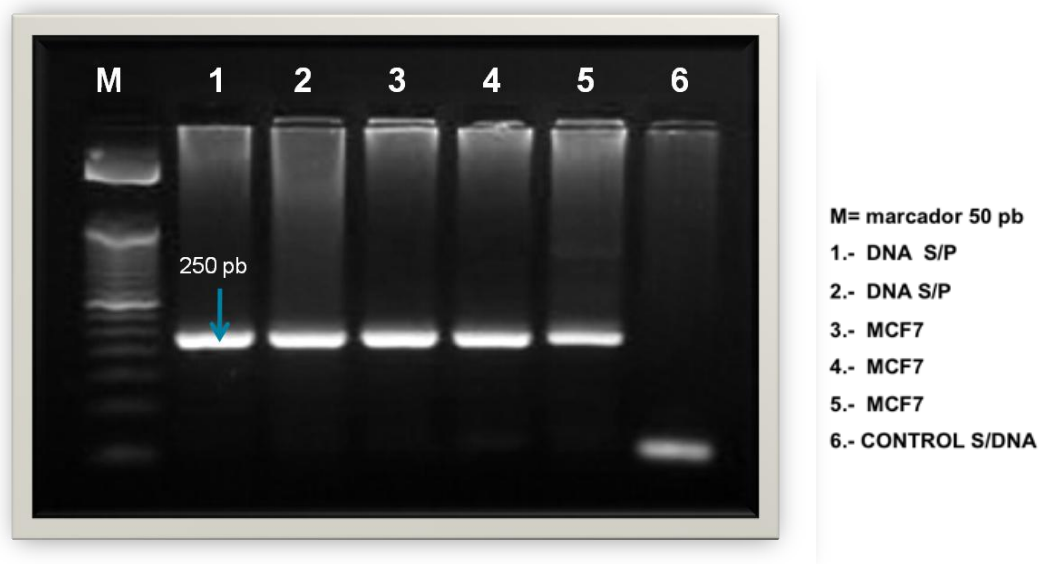


Figura 17. Productos de amplificación de DNA modificado por bisulfito de sodio. Marcador de peso molecular (M). Carril 1-2, DNA de sangre periférica. Carriles 3-5, DNA de la línea celular MCF7 de cáncer de mama. Carril 6 control sin DNA.

Una vez modificado el DNA por el método de bisulfito de sodio, se estandarizó la PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican la región metilada del núcleo del promotor del gen *brca1*, -180 a +20 obteniendo un producto de 182 pb. Los productos de amplificación por PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%. Este experimento se realizó a partir de DNA de la línea celular MCF7 metilado *in vitro* con metilasa *Sss1* y modificado por bisulfito de sodio y DNA de sangre periférica. En la figura 18 se observa en el carril 1 el DNA no metilado obtenido de sangre periférica y tratado con bisulfito como control negativo; en el carril 2 el DNA de las células MCF-7 donde se amplificó el producto esperado de 182 pb. En el carril 3 se observa el DNA sin tratamiento con bisulfito de sodio y el carril 4 representa una PCR sin DNA como controles negativos. Una vez estandarizada la PCR con los oligonucleótidos que reconocen la región metilada del promotor *brca1*, se amplificó el DNA de las muestras previamente tratados con bisulfito de sodio, de los cuales cuatro tumores presentan la región del promotor metilado. Se observa la banda de 182 pb en los carriles 2 y 4 correspondiente al DNA metilado obtenido de la línea MCF-7. El carril 11 corresponde al tumor 58, el carril 34 al tumor 69 y el carril 40 al tumor 6 (figura 19). A partir de estos resultados podemos concluir que un porcentaje bajo de nuestras muestras presentó metilación del gen *brca1*.

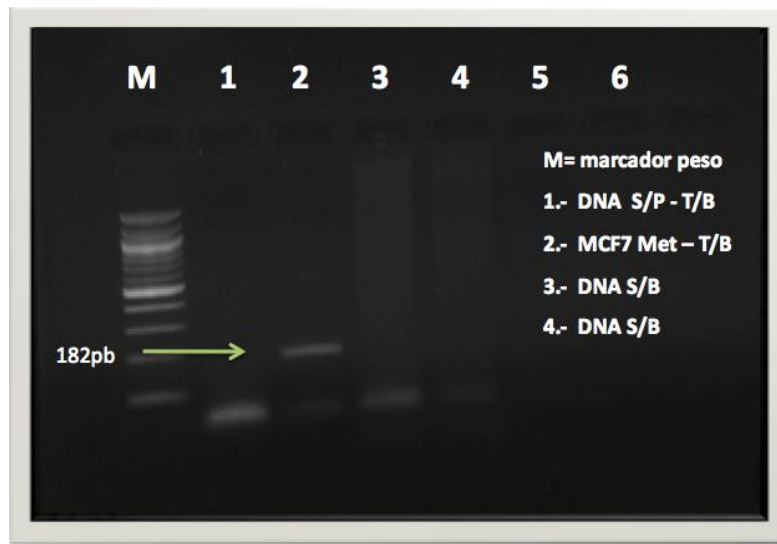


Figura 18. Reacción de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos que detectan el DNA metilado en el promotor del gen *brca1*. Se muestra la amplificación del DNA de la línea MCF7 utilizando los oligonucleótidos MSP que identifican la región metilada. Marcador de peso molecular de 200 pb (M); carril 1, DNA de sangre periférica tratado (S/P) con bisulfito (T/B, en el carril 2 el control positivo DNA de MCF-7 metilado tratado con bisulfito; carril 3, DNA sin tratamiento y carril 4, control negativo sin DNA.



Figura 19. Identificación de la presencia de metilación en la región promotora del gen *brca1*. En el carril 1 se muestra marcador de peso de 100 pb, en el carril 2 y 4 control positivo de DNA metilado *in vitro*, carril 3 DNA sin tratamiento con bisulfito, carril 5-20 y 22-40 muestras de tumores. Los carriles muestran los tumores 12, 34 y 40 donde detectamos la metilación en los cuales se observa el producto de PCR esperado de 182 pb.

En la figura 20 se muestra la correlación entre el estado de metilación y la expresión de BRCA1 en las 78 muestras analizadas. Con un punto rojo se destacan los tumores en los que se detectó el promotor del gen *brca1* metilado. Las muestras que presentaron sub expresión y metilación del promotor del gen *brca1* se encuentran identificadas con el número 56 que corresponde a un carcinoma ductal infiltrante etapa III y con el número 58 que corresponde igualmente a un carcinoma ductal infiltrante etapa III. En lo que se refiere a la muestra identificada con expresión normal, corresponde a la número 69 que es un carcinoma ductal infiltrante etapa III. Finalmente la muestra que presento sobre expresión está identificada con el número 6, corresponde a un carcinoma ductal infiltrante etapa III.

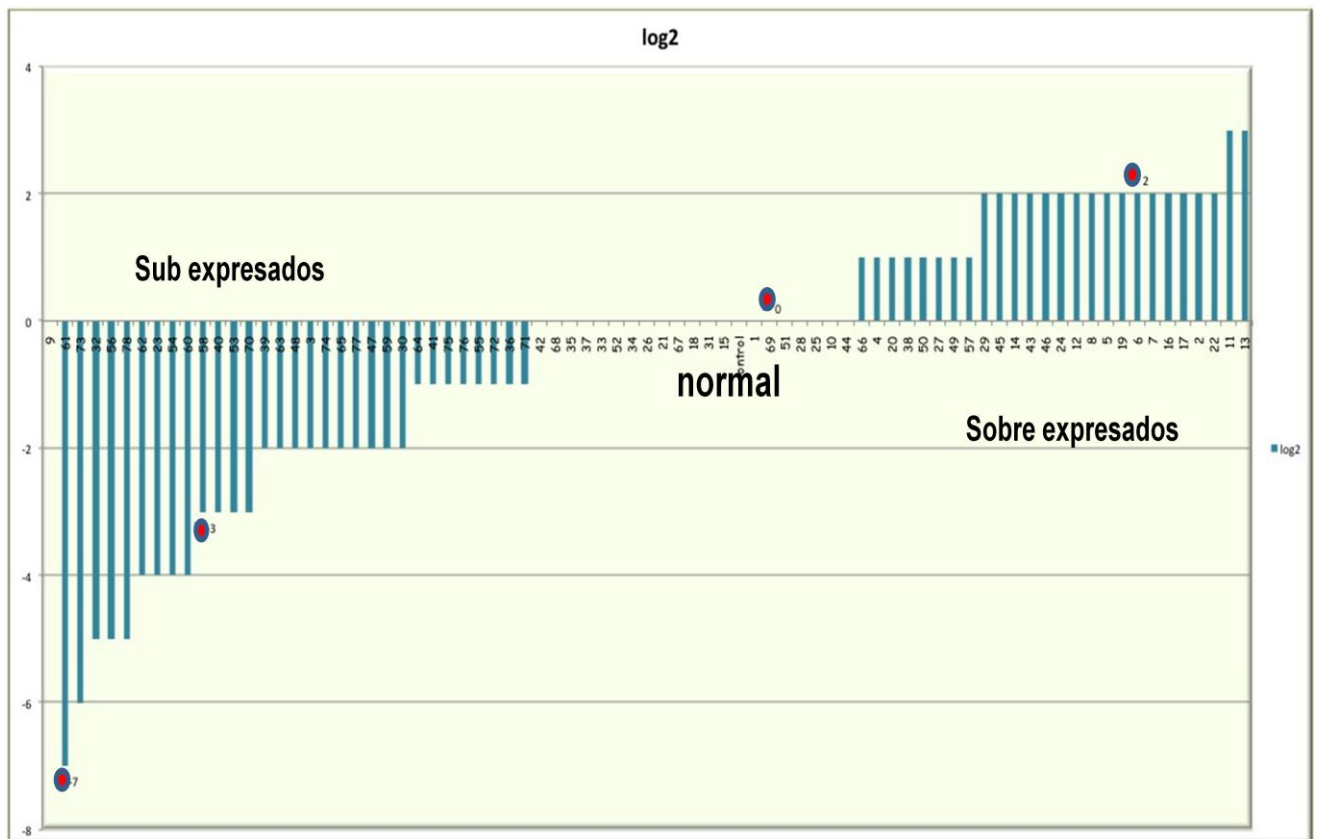


Figura 20.- Correlación de la expresión de la proteína BRCA1 y el estado de metilación del promotor *brca1*. Se muestran en la gráfica las 78 muestras tumorales analizadas. (barras azules). Los números representan el número de tumor y los puntos rojos representan las muestras que se encontraron con el promotor metilado.

VII. DISCUSIÓN

De los 200 registros que se revisaron se seleccionaron 78 muestras tumorales que cumplieron los criterios de inclusión, las cuales fueron analizadas por los patólogos y de éstas se obtuvo el DNA solamente, dado que no hubo suficiente tejido para poder hacer extracción de RNA, se seleccionaron las áreas afectadas para construir los MATs. Nuestros MATs incluyeron un control positivo para la expresión de la proteína BRCA1, que fue tejido de próstata. Se construyeron 2 MATs para poder incluir todas las muestras y poder evaluar la expresión de la proteína.

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

localización celular de la proteína BRCA1 en cáncer de mama, su importancia y de su localización celular anormal. (Honrrado y col., 2007)

Al digitalizar y analizar las imágenes de los microarreglos de tejidos (MATs), nuestros resultados de la inmunotinción mostraron que el comportamiento de la expresión es heterogéneo a lo largo de las muestras analizadas. Encontramos muestras que tuvieron una tinción alta, media o baja, una vez que obtuvimos los valores de intensidad, basados en el área y la densidad celular, a través de IOD sacamos un cociente del valor de expresión de los tumores respecto a nuestros tejidos no afectados (Tumor/no afectado). Determinamos la expresión relativa a un promedio del valor del tejido mamario no afectado, encontramos un 33% de muestras con sobreexpresión, un 26% de muestras en un rango de expresión normal que de acuerdo a lo reportado en la literatura, que es de dos veces para arriba o dos veces para abajo (2-fold) y un 41% de las muestras con subexpresión, lo cual correlaciona con lo ya reportado para la expresión de esta proteína en tejido mamario tumoral.

Nuestros resultados en cuanto a los niveles de expresión de la proteína BRCA1 mostraron una expresión heterogénea lo cual correlaciona con lo reportado por Miyamoto y col. 2002, ellos reportaron una sobre expresión en un 9%, una expresión disminuida de la proteína BRCA1 en un 62 % y una expresión normal de 29 % de un total de 21 muestras de tumor, Youko y col. encontraron que en un 32% de muestras de cáncer de mama esporádico no detectaron la proteína BRCA1 y en el 68 % de las muestras la detectaron. Estos resultados

indican que la desregulación de la proteína BRCA1 juega un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama y puede servir como factor pronóstico.

El DNA que se obtuvo de los tejidos fue de calidad adecuada y en concentración suficiente para desarrollar los métodos. Pudimos corroborar que el tratamiento con bisulfito de las muestras de llevo a cabo correctamente mediante la conversión de C-T, al amplificar con los iniciadores diseñados para este fin. De tal manera que determinamos el estado de metilación en cada una de las muestras. Identificando cuatro tumores y nuestro control positivo de MCF-7 con metilación del núcleo del promotor del gen *brca1*.

El DNA de estos tumores que resultaron metilados dos correlacionan con sub-expresión (tumor 58 y 56), el DNA del tumor 69 esta metilado pero tiene niveles normales de la proteína BRCA1, y el DNA del tumor 6 que también esta metilado sin embargo presenta sobre expresión de la proteína BRCA1. La MS-PCR mostró que de los 69 tumores solo 4 tumores mostraron metilación en su región promotora del gen *brca1* (5.7%). Este porcentaje de metilación resulta más bajo de lo reportado por Dobrovic y col.1997; ellos reportan 22% de metilacion, aunque el tamaño de muestra que manejamos nosotros es considerablemente mayor. Catteau y col.1999, reportaron un 11% de metilación en la región promotora del gen *brca1* de sus muestras con sub-expresión de la proteína BRCA1. Los tumores el 58 y 56 en los que correlaciona el estado de metilación con la sub-expresión, coinciden con los resultados esperados, en donde podemos decir que posiblemente existe silenciamiento por metilación de los dos alelos en su región promotora. El DNA del tumor 69 que resulto metilado pero tiene una

expresión normal de la proteína, respecto al promedio de expresión de los tejidos no afectados o normales que utilizamos, también coincide con lo que se ha reportado en la literatura, en donde se sugiere que solo un alelo está metilado y el otro alelo funciona normalmente, de manera que se mantiene los niveles normales de proteína. En lo que respecta al tumor 61 encontramos su DNA metilado, sin embargo, encontramos sobre-expresión de la proteína, lo cual es contradictorio a lo esperado, aunque coincide con lo reportado en la literatura, Miyamoto y col. 2002, sugiere que esta sobre expresión se deba a la metilación aberrante en las islas CpG del promotor del gen *brca1*. Sin embargo nuestros resultados en la mayoría de los tumores analizados mostraron una disminución de la proteína BRCA1, y este resultado se podría explicar por los siguientes mecanismos: a) alteración de los mecanismos de transcripción, el que se ha reportado que la proteína p53 puede inhibir a un factor de transcripción con E2F el cual interactúa con *brca1*, b) por transferencia transcripcional, se sabe que el gen *brca1* tiene un promotor bidireccional que regula a *brca1* en dirección 5'-3' y 3'-5' al gen *nbr2*, de tal manera que se ha reportado que cuando hay sobre expresión de NBR2 este inhibe la expresión de BRCA1. Finalmente nuestros resultados muestran que la metilación del promotor del gen *brca1* es un evento poco común en los tumores de las pacientes con cáncer de mama esporádico.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los datos obtenidos mediante MATs muestran que 32 tumores (41%) presentan una disminución de la expresión de la proteína BRCA1.
2. El 33% de los tumores restantes (26 muestras) mostraron un aumento en la expresión de BRCA1, mientras que el 26% (20 casos) presentaron una expresión normal con respecto a los controles sanos.
3. De las 69 muestras de cáncer de mama analizadas, solamente cuatro (5.7%) mostraron hipermetilación aberrante en la región promotora del gen *brca1*. De estos cuatro tumores hipermetilados, solamente dos de ellos presentan una disminución en la expresión de la proteína BRCA1.
4. Los datos obtenidos en el presente proyecto muestran que la metilación del promotor del gen *brca1* es un evento poco común en los tumores de las pacientes mexicanas con cáncer de mama esporádico.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Agnantis N.J., Fatouros M., Arampatzis I., Briasoulis E., Ignatiadou E. V., Paraskevaïdis E., and Roukos D. (2004) Carcinogenesis of Cancer: Advances and Applications. *Gastric Breast Cancer*. **3**(1):13-22.
2. Berek J. Ginecología de Novak. Editorial MacGraw. Hill Internacional. 12ª edición. 2000.
3. Bishop J. (1983) Celular oncogenes and retrovirus. *Ann Rev Biochem*. **52**:301-306.
4. Birgisdottir V., Stefansson O. A., Bodvarsdottir S. K., Hilmarsdottir H., Jonasson J. G., Eyfjord J. E. (2006) Epigenetic silencing and deletion of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research*. **8**(4):1-10.
5. Burke L, Baniahmad A. Co-repressors 2000 *The FASEB J*. **14**: 1876-86
6. Catteau, A., Harris, H., Xu, C.F., Solomon E. (1999) Methylation of the *BRCA1* promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* (1999) **18**:1957-1965.
7. Cotran R. S., Robbins S. L., Kumar V. *Patología Estructural y Funcional*. 1999 *Mc-Graw Hill*, 6ª ed.
8. Colditz, G.A., Rosner, B.A., Speizer, F.E. (1996) Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer. For the Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst*, **88**: 365-71.

9. Crook, T., Crossland, S., Crompton, M.R., Osin, P., Gusterson, B.A. (1997) p53 mutations inBRCA1-associated familial breast cancer. *Lancet*, **350**: 638-9.
- 10.Deng X. C. (2006) BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cáncer evolution. *Nucleic Acids Research*. **34**:1416-1425.
- 11.Dobrovic, A. Simpfendorfer, D. (1997) Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res*. **57**: 3347-50.
- 12.Emad A. Rakha M.D., Somaia E., El-Sheikh M.Sc., Mona A., Kandil M.D., Maysa E., El-Sayed M.D., Andrew R., Green, Ian O., Ellis FRCPATH (2008) Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Human Pathology*. **39**:857-865.
- 13.Easton, D., Ford, D., Peto, J., (1993) Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv*. **18**: 95-113.
- 14.Easton, D.F., Steele, L., Fields, P., Ormiston, W., Averill, D., Daly, P.A., McManus, R., Neuhausen, S.L., Ford, D., Wooster, R., Cannon-Albright, L.A., Stratton, M.R., Goldgar, D.E.(1997) Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet*. **61**:120-8.
- 15.Eliot, M. R., Saijun F., Richard G., P., Itzhak D.,G.,(2003) BRCA1 Gene in Breast Cancer. *J Cell Physiol*. **41**:196-19.
- 16.Esteller M. (2007) Cancer epigenomics:DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Rev Genetics* **8**:286-298.

17. Esteller M., Silva J M., Dominguez G., Bonilla F., Matias, G.X., Lerma E., Bussaglia, E., Prat, J., Harkes C., Repasky, E., Gaglielson, E., Schutte, M., Baylin S., S., Herman J., (2000) Promotor Hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic Breast and Ovario Tumor. *J Natl Cancer Inst.* **92**:564-569.
18. Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y. & . (1994) BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*. **266**:120-2.
19. Hernández R., M., Menéndez H., M. (2001) Los genes supresores de tumor y el cáncer. *Rev. Cubana Oncol.* **17**(1)65-71.
20. Hidalgo A., Jiménez J. (2009) Bases genómicas del cáncer de mama avances hacia la medicina personalizada. *Salud pública de México*. **51**., 197-207.
21. Hartwell, L.H., Kastan M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*. **266**:1821.
22. Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B. & King, M.C. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. **250**: 1684-9.
23. Herman, J.G., Graff J.R., Myohanen, S, Nelkin, B.D., Baylin, S.B., (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci*. **93**: 9821-9826.
24. James R, M. M., Control of Chormatin Remodeling. Critical Reviews in Eukaryotic Expression. 2000; **10** :303-325.

25. Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S.T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodosh, L.A., Ishov, A.M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K.D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G.C., Rauscher, F.J., 3rd (1998) BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*. **16**: 1097-112.
26. Jemal A., Ram C., Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer E.J., Thun M.J (2004). Cancer Statistics, *Cancer J Clin*. **54**:8-24.
27. Jocelyn, E., Craig, L. (2000) Understanding “Active” Chromatin: A Historical Perspective of Chromatin Remodeling. *Reviews in Eukaryotic Expression*. **10**:1-12.
28. Jones, P. A., Baylin, S.B. (2007) The epigenomics of cáncer. *Cell* **128**:683-692.
29. Kerr, P., Ashworth A. (2001) New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Current Biology*. **11**:668-676.
30. Key, T.J., Verkasato P.K., Banks, E. (2001) Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*; **2**(3):1-18.
31. Knaul, F. M., Lozano, R., Arreola, O, H., Gómez, D.H. (2006) Competitividad y Salud y Observatorio de la Salud; Fundación Mexicana para la Salud.
32. Koonin, E.V., Altschul, S.F., Bork, P. (1996) BRCA1 protein products ... Functional motifs. *Nat Genet*. **13**: 266-8.
33. Knudson A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68** (4): 820–3.

34. Lund H. A., Lohuizen V.M. (2004) Epigenetics and cancer. *Genes and Development*. **18**:2315-2335.
35. MacDonald G., Stramwasser, M., Christopher, R.M. (2007) Characterization of a negative transcriptional element in the *BRCA1* promoter. *Breast Cancer Research*. **9**:1-12.
36. McPherson, K, Steel, C.M., Dixon J M (2000). Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BJM*. **321**:624-628.
37. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q. Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. & . (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science*. **266**:66-71.
38. Muller C.,R., Roskelley C.D.,(2002) Regulation of *BRCA1* expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*, **5**:45-52.
39. Miyamoto, K. (2002) Promoter hypermethylation and post-transcriptional mechanism for reduced *BRCA1* immunoreactivity in sporadic human breast cancers. *Jpn. J. Clin. Oncol*. **32**:79-84.
40. Narod S. Foulkes D. (2004) *BRCA1* and *BRCA2*: 1994 and Beyond. *Nature Rev Cancer*. **4**:665-676.
41. Newman, B., Mu, H., Butler, L.M., Millikan, R.C., Moorman, P.G., King, M.C. (1998) Frequency of breast cancer attributable to *BRCA1* in a population-based series of American women. *JAMA*. **279**:915-921.
42. Nissan, A., Spira, R.M., Hamburger T., (2004) Clinical profile of breast cancer in Arab and Jewish women in the Jerusalem area. *The Am J Surg*. **188**:62-67.

43. Pettigrew, C. A., French, J.D. Saunus J. M., Edwards, S. L., Sauer, V.A., Smart, E.C., Lundstro, T., Wiesner, C., Spurdle, B.A., Rothnagel A.J., Brown A.M. (2010) Identification and functional analysis of novel BRCA1 transcripts, including mouse Brca1-Iris and human pseudo-BRCA. *Breast Cancer Treat.* **119**:239-247.
44. Polyak, K. (2002) Breast cancer gene discovery. Expert reviews in molecular medicine. 1-16.
45. Porter, P. (2008). "Westernizing Women's Risk? Breast Cancer in Lower-Income Countries". *The New England Journal of Medicine.* **99**: 254-255
46. Rios, H. M., Hernandez, M.M., (2001) Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev. Cubana Oncol.* **17**: 65-71.
47. Strand, L. F., (1982) Fisiología humana, un enfoque hacia los mecanismos reguladores.
48. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Epidemiología, Anuarios de Morbilidad, 2000-2006. Secretaría de Salud.
49. Smith, T.M., Lee, M.K., Szabo, C.I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L. & King, M.C. (1996) Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res.* **6**:1029-1049.
50. Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N., Freemont, P.S. (1996) Does this have a familiar RING?. *Trends Biochem Sci.* **21**:208-214.

51. Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., Livingston, D.M.(1997) Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*. **90**:425-35.
52. Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y.X., Houvras, Y., Peng, Y., Wu, G.S., Licht, J.D., Weber, B.L. & El-Deiry, W.S. (1997) Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature*. **389**:187-190.
53. Taylor J., Lymboura M., Pace P.E., (1998) An important role for BRCA1 in breast cancer progression is indicated by its loss in a large proportion of non-familial breast cancers. *Int J Cancer*. **79**:334-342.
54. Tavtigian, S.V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., Merajver, S., Thorlacius, S., Offit, K., Stoppa-Lyonnet, D., Belanger, C., Bell, R., Berry, S., Bogden, R., Chen, Q., Davis, T., Dumont, M., Frye, C., Hattier, T., Jammulapati, S., Janecki, T., Jiang, P., Kehrer, R., Leblanc, J.F., Goldgar, D.E. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet*. **12**:333-337.
55. Wang, H., Shao, N., Ding, Q.M., Cui, J., Reddy, E.S. & Rao, V.N. (1997) BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene*. **15**:143-157.
56. Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. & Micklem, G. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. **378**:789-792.

57. Warnecke, P, Stirzaker, C., Melki, J., Millar, D., Paul, C., Clark, S. (1997) Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucl Acids Res*, **25**(21):4422-4426.
58. Yang, X., Yan and Davidson, N. E. (2001) DNA methylation in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. **8**: 115-127.
59. Zheng, L., Lee, W.H. (2001) The retinoblastoma Gene: A Prototypic and Multifunctional Tumor Suppressor. *Experimental Cell Research*. **264**:2-18.