



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

POSGRADO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

“ANÁLISIS DEL PATRÓN GLOBAL DE METILACIÓN
DEL DNA EN CÁNCER DE MAMA EN MUJERES
MEXICANAS”

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
(TESIS)

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Biol. ELIA SUSANA OSORIO MARTÍNEZ

Director: Dr. Diego J. Arenas Aranda
Codirección: Dra. Eva Ramón Gallegos



México D.F

2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 12 del mes de Enero del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENCB-IPN para examinar la tesis de titulada:

ANÁLISIS DEL PATRÓN GLOBAL DE METILACIÓN DEL DNA EN CÁNCER DE MAMA EN MUJERES MEXICANAS

Presentada por la alumna:

OSORIO

Apellido paterno

MARTÍNEZ

Apellido materno

ELIA SUSANA

Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	2	8	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:


Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directora de tesis


DRA. EVA RAMÓN GALLEGOS


DR. JOSÉ LUIS MUÑOZ SÁNCHEZ


DR. ADÁN VALLADARES SALGADO


Director de tesis


DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA


DR. ALFONSO MÉNDEZ TENORIO


DRA. MARÍA ISABEL BAEZA RAMÍREZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


DR. MANUEL JESÚS PIÑÓN LÓPEZ

Coordinador de
Ciencias Biológicas
Sección de Estudios
de Posgrado e Investigación

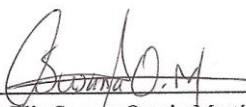



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

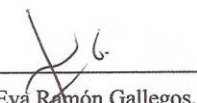
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 12 del mes de enero del año 2010, la que suscribe Osorio Martínez Elia Susana alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular con número de registro B071287, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Diego Julio Arenas Aranda y la Dra. Eva Ramón Gallegos cede los derechos del trabajo intitulado ANÁLISIS DEL PATRÓN GLOBAL DE METILACIÓN DEL DNA EN CÁNCER DE MAMA EN MUJERES MEXICANAS, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección arenasdi@gmail.com, si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Biol. Elia Susana Osorio Martínez.


Dr. Diego Julio Arenas Aranda.


Dra. Eva Ramón Gallegos.

Se agradece a las instituciones CONACYT, IMSS e ICYTDF por el apoyo otorgado para llevar a cabo este proyecto de investigación. Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría en Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Diego J. Arenas Aranda y de la Dra. Eva Ramón Gallegos del Dpto de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

INDICE

ABREVIATURAS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
INDICE DE TABLAS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 METILACION DEL DNA	2
1.2 FUNCIÓN DEL DNA METILADO	3
1.3 CÁNCER	5
1.4 CÁNCER DE MAMA	6
1.5 METILACIÓN DEL DNA: SU PAPEL EN LA CARCINOGENESIS	8
1.6 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CON INHIBIDORES DE LA METILACIÓN	10
1.7 TECNICAS PARA DETERMINAR LA METILACIÓN	10
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPOTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1 OBJETIVO GENERAL	
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 EXTRACCIÓN DE DNA POR PROTEINASA K Y CLOROFORMO-FENOL-ISOAMÍLICO	15
5.1.1 De tejido tumoral de cáncer de mama y tejido adyacente no afectado	15
5.1.2 Cuantificación y análisis de la integridad del DNA extraído	16
5.2 AMPLIFICACIÓN DE SITIOS INTERMETILADOS (AIMS).	16
5.3 PCR	17
5.4 PREPARACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN GENÓMINA COMPARADA	17
5.4.1 Marcaje con Kit RadPrime DNA Labelling System.	17
5.4.2 Preparación de la sonda	18
5.4.3 Hibridación de las sondas sobre laminillas con cromosomas en metafase	18
5.4.4 Lavado de las laminillas hibridadas	19
5.4.5 Visualización de la Hibridación	19
5.5 BUSQUEDA DE GENES ASOCIADOS A CÁNCER DE MAMA EN LA BASE DE DATOS DE MAP VIEWER.	20

6. RESULTADOS	21
6.1 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO.	21
6.1.1 Reacción enzimática de Sma I y Xma I en DNA fago lambda Hind III metilado con Sss I.	21
6.1.2 Estandarización de las condiciones de la reacción enzimática de T4 DNA ligasa en fago lambda Hind III.	22
6.1.3 Estandarización de la ligación de adaptadores MCF, Blue en DNA y subsecuente PCR.	23
6.2 PROCESAMIENTO DE TEJIDO ADYACENTE NO AFECTADO (CONTROL) Y TUMORAL CON LAS TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DEL PATRÓN DE METILACIÓN.	24
6.2.1 Cuantificación y pureza de DNA genómico Tejido Adyacente no Afectado (Control) y Tumoral extraído con proteinasa K y fenol-cloroformo-isoamílico.	24
6.3 TÉCNICA DE AIMS (AMPLIFICACIÓN DE SITIOS INTERMETILADOS)	26
6.3.1 Reacción enzimática de Sma I y Xma I en Tejido Adyacente no Afectado y Tumoral (AIMS)	26
6.3.2 PCR	26
6.4 CGH	26
6.4.1 Identificación de las regiones hipometiladas o hipermetiladas en el DNA de tumores de cáncer de mama en diferentes etapas de mujeres mexicanas mediante PCR-CGH y el análisis en la base de datos Map Viewer	28
7. DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIONES	38
9. PERSPECTIVAS	39
10. BIBLIOGRAFIA	40

ABREVIATURAS

AIMS	Amplificación de sitios intermetilados
ATP	Adenosina trifosfato
5-azaC	5-Azaciditina C
CGH	Hibridación genómica comparativa
CpG	Citosina-fostato-citocina
DAPI II	Diclorohidrato de 4'6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNMT1	DNA metil transferasa 1
DNMT3a	DNA metil transferasa 3 ^a
DNMT3b	DNA metil transferasa 3b
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HCY	Homocisteína
HDAC	Desacetilasa de histonas
KCl	Cloruro de potasio
5mC	5- Metil citosina
NaCl	Cloruro de sodio
PCNA	Antígeno nuclear de la proliferación celular
QMSP	PCR metilación específica cuantitativa
SAH	S-adenosil homocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSC	Solucion salina concentrada
Tris-HCl	Tris base-ácido clorhídrico

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la metilación	3
Figura 2. Reacción de enzimas de restricción Sma I (sensible a metilación) en DNA del fago lambda sin metilar y metilado con CpG metiltransferasa Sss I.	21
Figura 3. Reacción de enzimas de restricción Sma I (sensible a metilación) y Xma I en DNA genómico metilado con Sss I.	22
Figura 4. Reacción de enzima T4 DNA ligasa en el fago lambda tratado con Hind III.	23
Figura 5. DNA genómico metilado con Sss I cortado con enzimas de restricción Sma I, Xma I ligado a los adaptadores (MCF y Blue) y PCR con los tres pares de oligos	24
Figura 6. Integridad de DNA genómico de tejido adyacente no afectado y tumoral extraído de tejido fresco con proteinasa K y fenol-cloroformo-isoamílico	25
Figura 7. Reacción de enzimas de restricción Sma I y Xma I en DNA de tejido control y tumoral de tres muestras.	26
Figura 8. Productos de PCR con el par de Oligonucleótidos C.	27
Figura 9. Representación de los Idiogramas de cada una de las muestras para el análisis de metilación por las técnicas acopladas de AIMS-CGH.	30
Figura 10. Imágenes obtenidas en la búsqueda de la base de datos de Map Viewer.	32

INDICE DE TABLAS

Tabla1. Métodos para detección de metilación en DNA	11
Tabla 2. Concentración y pureza de las muestras de DNA genómico de tejido adyacente no afectado y tumoral	25
Tabla 3. Información clínica de las muestras de tumores mamarios empleados en este estudio y resultados obtenidos por la técnica de GCH	30
Tabla 4. Cuadro con los genes reportados en el cromosoma 16q12 de la base de datos de NCBI Map Viewer.	33

RESUMEN

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres mexicanas. Ésta se debe al crecimiento anormal de las células que recubren a los conductos y a los lobulillos de la mama; la proliferación es acelerada, desordenada y no controlada debido a factores genéticos y epigenéticos. Dentro de estos últimos, la metilación del DNA, clave en la regulación de la expresión génica, cuando se encuentra alterada está asociada a una gran variedad de neoplasias. El desbalance en el patrón de metilación del DNA se ha detectado principalmente en células cancerosas, estos incluyen la pérdida de estas secuencias normalmente metiladas (hipometilación). La metilación de DNA en células de cáncer de mama en mujeres mexicanas ha sido poco estudiada por lo que en este trabajo se analizó el patrón de metilación mediante la técnica de amplificación de sitios intermetilados/hibridación genómica comparativa (PCR-CGH). Se utilizaron muestras de tejido congelado de adenocarcinomas esporádicos de novo al tratamiento de diferentes estadios así como tejido de mama adyacente no afectado. Para la determinación de sitios intermetilados (AIMS) se extrajo el DNA de los tejidos por el método de fenol-cloroformo, después éste se expuso a las enzimas de restricción Sma I y Xma I y los fragmentos obtenidos se unieron a adaptadores y amplificaron por PCR. Posteriormente se realizó la hibridación Genómica Comparativa para identificar en todo el genoma los cambios de metilación asociados al cáncer. Se marcaron sondas de DNA muestra y control con diferentes fluorocromos los cuales se hibridaron con cromosomas en metafase, estos se visualizaron empleando un microscopio de fluorescencia y las imágenes se analizaron con el software de Isis Axioimager, Karl Zeiss. La búsqueda de genes se realizó en la base de datos de NCBI Map Viewer. Se estandarizaron las técnicas AIMS, PCR y CGH, y se analizaron 3 muestras de DNA de tejido tumoral y adyacente no afectado. El análisis en el software reveló, sólo en la muestra de la etapa II, una región hipermetilada en el cromosoma 16 cercana al centromero, al hacer la comparación en la base de datos de Map Viewer ésta corresponde al cromosoma 16q12.1. Varios genes como el gen ORCL6, GTP2, DNAJA 2 e ITFG1 han sido identificados en esta área, los cuales por su función y con base en la bibliografía consultada podrían o están relacionados con el cáncer de mama. El gen con mayor información descrita relacionado con el cáncer es el gen ORCL6, el cual está involucrado en la replicación del DNA.

ABSTRACT

Breast cancer is the first leading cause of death from malignant neoplasms in Mexican women. This is due to abnormal growth of cells lining the ducts and lobules of the breast, proliferation is accelerated, disorderly and uncontrolled due to genetic and epigenetic factors. Within the latter, DNA methylation is key in regulating gene expression is altered when it is associated with a variety of malignancies. The imbalance in the DNA methylation pattern was detected mainly in cancer cells, these include the loss of these normally methylated sequences (hypomethylation). Methylation of DNA in cells of breast cancer among Mexican women has been poorly studied in this paper analyzed the methylation pattern by the technique amplification of inter-methylated sites (AIMS / comparative genomic hybridization (PCR-CGH). We used frozen tissue samples of sporadic adenocarcinomas de novo treatment of different stages of breast and surrounding tissue unaffected. To determine intermetilados sites (AIMS) DNA was extracted from tissues by phenol-chloroform method, after it was exposed to restriction enzymes Sma I and Xma I and the fragments obtained joined adapters and amplified by PCR . The ensuing comparative genomic hybridization to identify genome-wide methylation changes associated with cancer. DNA probes were labeled control sample and with different fluorophores which were hybridized with metaphase chromosomes, these were visualized using a fluorescence microscope and images were analyzed using the Isis software Axioimager, Karl Zeiss. The search for genes was performed in the database of NCBI Map Viewer. AIMS techniques were standardized, PCR and CGH, and analyzed 3 samples of DNA from tumor tissue and adjacent unaffected. The analysis in software revealed only in the sample of stage II, a hypermethylated region on chromosome 16 near the centromere, to make the comparison in the database for the Map Viewer cromosome it. Several genes as ORCL6, GTP2, DNAJA 2 e ITFG1 gene have been identified in this area, which by function and based in the literature could or associated with breast cancer. The gene described in more information related to cancer is the gene ORCL6, which is involucrate in DNA replication.

1. INTRODUCCIÓN

La expresión genética dentro de una célula individual dicta la forma en que la célula se comportará posteriormente. Los eventos a nivel molecular pueden influir en la expresión de ciertos genes y con ello afectar negativamente la función celular a tal grado, como para iniciar un proceso patológico. Las células antes de convertirse en cancerosas, por ejemplo, deben someterse a una serie de eventos moleculares que les permiten la adquisición de varias propiedades, con comportamiento patológico. Éstas resultan en consecuencias deletéreas para el paciente en el que residen las células cancerosas, pero que paradójicamente faculta a la progenie de células anormales con una ventaja de supervivencia sobre las células normales⁴.

Las propiedades fundamentales necesarias para generar características malignas son atributos asociados a células cancerosas con la capacidad de dividirse sin limitaciones, la indiferencia a las señales positivas de crecimiento, el desconocimiento de inhibidores de factores de crecimiento, evasión de la muerte celular programada, angiogénesis y la habilidad para invadir y presentar metástasis¹. Cada una de estas características está influenciada por un gen o conjunto de genes. La incapacidad de que se exprese el gen correctamente y producir proteínas reguladoras funcionales lleva a los patrones descontrolados de las células observadas a un comportamiento típico de una neoplasia⁴.

Gran parte del centro de investigación de biología molecular se ha centrado en la investigación de la función de los cambios genéticos, que son producto de las alteraciones directas de la secuencia de bases de DNA por algún tipo de mutación como: eliminación, inserción y su subsecuente efecto en la expresión génica y del comportamiento celular. Recientemente, mecanismos alternativos de la modulación de genes como los fenómenos epigenéticos han sido objeto de escrutinio. Estos fenómenos no alteran la secuencia del gen, pero sí su expresión y se conservan después de la división celular. La metilación del DNA se reconoce como un mecanismo clave en la regulación de la expresión génica y su modificación está asociada al desarrollo de una gran variedad de cánceres².

Los mecanismos epigenéticos descritos hasta el momento son tres: metilación de DNA, modificación de histonas y de cromatina dependientes de ATP, estas modificaciones

modificaciones pueden influir en la estructura y en la conformación de la cromatina y consecuentemente en la regulación de la transcripción^{38,39,41}, pero no causan cambio en la secuencia de nucleótidos. Así, un mecanismo epigenético puede entenderse como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. Las modificaciones epigenéticas pueden implicar la metilación de residuos de citosina en el DNA y/o cambios en la estructura de la cromatina que regulan la expresión génica³.

1.1 METILACIÓN DEL DNA

La metilación del DNA es una modificación química de la estructura inducida por grupos de enzimas conocidas como DNA metil transferasas que unen covalentemente un grupo metilo (CH_3 -) al carbono 5 de la base citosina. El grupo metilo siempre se adiciona a partir de la S-adenosil metionina (SAM) y ésta es convertida a S-adenosil homocisteína (SAH) en el proceso, ésta se recicla a SAM en presencia de un folato y cobalamina dependiente de la vía. La metilación biológica en vertebrados ocurre sólo en las bases de citosina y además sólo en los unidas directamente a guanina por unión de la fosfodiesterasa, formando un par dinucleótido CpG (Fig 1)⁴.

Del 3 al 5% de los residuos de citosinas en el DNA genómico de mamíferos aparece en la forma de 5-metilcitosina (5mC)⁵, afectando en alto porcentaje a todas las regiones de dinucleótidos CpG en el genoma, estas regiones de dinucleótidos son regiones ricas en citosina y guanina, unidas por un fosfato para formar así las 5mC. La presencia de 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del DNA, que podría actuar como una señal específica para modificar la expresión génica⁶.

Estas regiones de dinucleótidos CpG no están distribuidas uniformemente se encuentran presentes una vez por cada 80 dinucleótidos, aproximadamente 60 a 90% de todas estas secuencias dispersas en el genoma están metiladas^{7,8}.

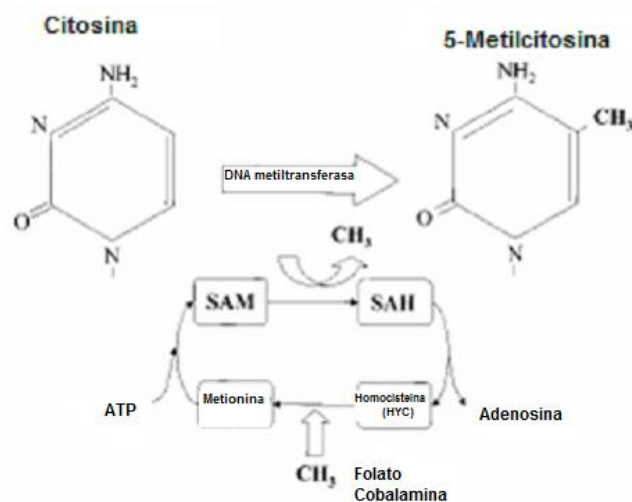


Figura 1. Ciclo de la metilación. La metilación del carbono 5' en el residuo de citosina se lleva a cabo por la enzima DNA metiltransferasa, que usa un grupo metilo de la S-adenil metionina (SAM). Esta es convertida a S-adenil homocisteína (SAH), que se transforma a homocisteína (Hcy) y adenosina. SAM es reconstituido de Hcy por metionina. El folato y la cabalamina son requeridos y proporcionados por el grupo metilo en esta reacción⁴.

1.2 FUNCIÓN DEL DNA METILADO

Las primeras descripciones documentadas de la presencia de la metilación en el DNA están más o menos relacionadas con una disminución de la expresión genética. Ahora se estableció que esta relación inversa entre la metilación del DNA y la expresión de un gene es específica para cuando la metilación ocurre en la región promotora del gen⁴.

La metilación del DNA es un proceso dinámico que es regulado eficientemente por enzimas metiltransferasas, las secuencias no metiladas pueden ser metiladas y los grupos metilo pueden perderse, por lo que los patrones de metilación de las células somáticas son el resultado de ambas actividades, metilación y desmetilación²³.

En las células de mamíferos se han identificado tres enzimas diferentes que llevan a cabo esta reacción y se han clasificado en dos grupos: las DNA metil transferasas de mantenimiento (DNMT1) y las metilasa *de novo* (DNMT3a y DNMT3b)¹³.

La acción de la metiltransferasa de DNA de mantenimiento (DNMT1) ocasiona que el DNA sea metilado al inicio de la replicación. Sólo la cadena nueva es metilada, y por esta razón los patrones son heredados de una manera semiconservativa y puedan ser perpetuados en la población celular. Por ejemplo en ratón, tiene una afinidad de 6 veces mayor por sustratos hemimetilados, por lo que se le asignó una función en el mantenimiento de los patrones de metilación ^{9,10}.

Esta enzima se expresa de forma ubicua en los tejidos somáticos y su principal actividad se observa durante la replicación del DNA, interactuando con el antígeno nuclear de la proliferación celular (PCNA), proteína que ancla a la DNA polimerasa en la horquilla de replicación ¹¹. Existen evidencias de que la DNMT1 también está implicada en ciertos tipos de metilación *de novo*, siendo específica para el dinucleótido CpG. Además, interacciona con complejos proteicos implicados en la represión transcripcional que incluyen a las desacetilasas de histonas (HDAC) ^{12,13,14}.

Las DNA metiltransferasas con actividad *de novo*, DNMT3a Y DNMT3b, adicionan un grupo metilo a la citosina del dinucleótido CpG no metilado, creando un CpG altamente hemimetilado. También reclutan a las HDAC para silenciar genes, utilizando un motivo de unión homólogo al homeodominio de plantas (PHD), que es un arreglo conservado de residuos de cisteína e histidina observado en diferentes proteínas implicadas en la regulación transcripcional ¹⁴.

Un tercer miembro de la familia DNMT3, denominado DNMT3L, el cual se cree que no codifica para una metiltransferasa funcional dada la pérdida de diferentes motivos conservados de los dominios catalítico de la enzima. Se han postulado que podría tener un papel en la regulación del establecimiento de la metilación en la impronta genómica (marcaje epigenético del genoma de un organismo diploide con respecto a su origen parental) y que la asociación con las HDAC podría ser relevante para su funcionamiento ^{13, 14}.

Las DNMT parecen ser dirigidas a regiones específicas del genoma a través de interacciones proteína-proteína, su asociación con factores de transcripción específicos, proteínas de unión a histonas metiladas o a correpresores como el complejo RB/E2F parecen ser importantes para que su actividad de DNA metiltransferasas participe en represión transcripcional¹⁴.

La metilación del DNA constituye un marcador epigenético que identifica la cadena molde durante la replicación de DNA y el origen parental de regiones improntadas, regula a los transposones, la impronta genómica y la expresión génica^{7,12,15}. Generalmente la metilación de elementos reguladores de genes tales como promotores, potenciadores, aisladores y represores suprimen su función³. La metilación en regiones no codificantes, como la heterocromatina centromérica, parece ser crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas, también se ha sugerido que la metilación constituye un mecanismo de defensa del genoma contra elementos genéticos móviles⁷.

1.3 CÁNCER.

El cáncer es una enfermedad genética que se desarrolla en diversas etapas. La transformación celular se caracteriza, entre otras cosas, por la pérdida de los controles de proliferación celular de tal manera que aparece un grupo celular clonal que mantiene las características celulares del tejido u órgano del cual se derivó. El desarrollo neoplásico continuará con la pérdida de la diferenciación celular, la inmortalidad celular y la metástasis⁴³.

Con lo que respecta al origen del cáncer, aunque está claro que es necesario que muten una serie de genes para que se desarrolle una neoplasia, aún no se sabe como inicia y cómo células somáticas sanas terminan siendo cancerosas en periodos relativamente cortos⁵⁴. Recientemente se propuso un nuevo origen para el cáncer, en donde las células madre ("stem cells") del órgano afectado o provenientes de la médula ósea serían el blanco para la transformación celular. Estas células estarían en constante replicación en el órgano blanco o migrando a éste como parte de la respuesta inflamatoria contra un mutágeno o un factor infeccioso (virus, bacteria). Esta alta tasa de replicación celular podría ocasionar errores en la replicación del DNA o factores mutagénicos dañarían genes que favorecerían la transformación neoplásica debido a que las células madre no se han diferenciado y son inmortales por la

producción de la telomerasa, deberán de sufrir un menor número de cambios terminarán siendo cancerosas que las células somáticas^{55,56,57}.

A nivel molecular el desarrollo neoplásico se caracteriza por la acumulación de mutaciones en diversos genes. Existen dos grupos de genes que asociados al desarrollo de cáncer. Los oncogenes, que son la versión mutada de los proto-oncogenes y los genes supresores de tumor⁵⁸.

En las células no neoplásicas los proto-oncogenes funcionan en los procesos de crecimiento y diferenciación celular, y se clasifican en diferentes grupos de acuerdo al papel que tienen en esos procesos. La activación de los oncogenes se da por diversos tipos de mutaciones y debido a que el cambio en un alelo es suficiente para el desarrollo neoplásico, se considera que su efecto es dominante o de ganancia de función a nivel celular. Se activan por diferentes formas: pérdida de las secuencias regulatorias de la transcripción, pérdida de las regiones codificantes, translocaciones cromosómicas y amplificaciones génicas entre otras⁵³.

En las células sanas los productos de los genes supresores de tumor están involucrados en el control del ciclo celular, en algunas rutas de señalización, algunos codifican para factores de transcripción, proteínas asociadas a los sistemas de reparación de daños en el DNA. Esta demostrado que para que un gen supresor transforme una célula normal a cancerígena se requiere que el de gen y su alelo estén mutados⁵⁹.

La versión mutada de un gen supresor puede estar asociada a neoplasias esporádicas o con historia familiar. En este último caso, la enfermedad se manifiesta de una manera dominante en una genealogía, sin embargo a nivel molecular se manifiesta como recesiva.

1.4 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama actualmente ocupa el primer lugar de un gran número de muertes entre las mujeres mexicanas de 30 a 59 años de edad, y uno de los desafíos más importantes para la salud de la mujer adulta. No se dispone de datos confiables de nivel nacional sobre la prevalencia e incidencia de la enfermedad debido a la ausencia de un registro de cáncer. Las estimaciones publicadas sugieren que en 1990 se presentaron alrededor de 6 000 nuevos casos

de cáncer de mama en México y se prevé una elevación de más de 16 500 por año para el 2020⁶⁵.

El cáncer de mama se inicia con un crecimiento anormal de las células que recubren a los conductos y a los lobulillos⁵⁰, la proliferación es acelerada, desordenada y no controlada con genes mutados, los cuales actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular perteneciente a tejidos de una glándula mamaria. Existen formas hereditarias que representan alrededor de 5-10% de todos los casos. Por otro lado, la mayoría de los casos corresponden al llamado cáncer esporádico de mama, en donde no existe alguna alteración genética heredada que sea responsable de su aparición.

Una vez que es confirmado el diagnóstico del cáncer de mama, es necesario determinar y evaluar la etapa del carcinoma, es importante porque de esta información depende la elección del tratamiento. Las etapas son las siguientes⁵⁰:

- a) Etapa 0: es la forma temprana, existen dos tipos: el carcinoma *in situ ductal* (carcinoma intraductal) y el carcinoma *in situ lobulillar*, este es sólo un indicador de riesgo a desarrollar cáncer.
- b) Etapa I: el tumor se encuentra confinado en la mama no se ha diseminado a los ganglios linfáticos.
- c) Etapa II: el cáncer puede haberse diseminado o no hacia los ganglios linfáticos
- d) Etapa III: se divide en IIIA, en este estadio existe metástasis y se ha diseminado hacia los ganglios de las axilas, la diferencia con el etapa IIIB este tumor ha invadido piel o pared del tórax, existe metástasis en los ganglios que se encuentran detrás del esternón.
- e) Etapa IV: el cáncer se ha extendido lejos de la mama y compromete a otros órganos frecuentemente huesos, pulmones, hígado o cerebro.

Existen tratamientos para los diferentes estadios en general se utilizan cuatro formas: cirugía, radioterapia, quimioterapia y tratamiento hormonal⁵⁰.

1.5 METILACIÓN DEL DNA: SU PAPEL EN LA CARCINOGENESIS.

Probablemente uno de los procesos patológicos en los que intensamente se está estudiando la participación de la metilación en DNA es en el cáncer. El proceso de carcinogénesis comprende una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que son acumuladas en la célula. Entre los cambios genéticos podemos mencionar la presencia de mutaciones en genes clave que participan en la regulación del ciclo y crecimientos celulares promoviendo el crecimiento anormal. Por otro lado, los fenómenos epigenéticos, como la metilación de citosinas, favorecen la aparición de mutaciones. El desbalance en el patrón de metilación del DNA se ha observado particularmente en cánceres esporádicos. Los cambios en la metilación que con mayor frecuencia se han detectado en células cancerosas^{16, 17}, incluye la pérdida de estas secuencias normalmente metiladas (hipometilación) y la metilación aberrante de secuencias usualmente no metiladas (hipermetilación), localizada especialmente en islas CpG, ambas asociadas con la malignidad^{18,19}.

La hipermetilación se refiere a la adición de un grupo metilo al anillo de las citocinas precedidas por guanina para formar 5-metilcitosina, islas CpG esta asociada a replicación retardada, cromatina condensada e inhibición al inicio de la transcripción, además esta fuertemente relacionado con el silenciamiento de genes²⁰, una vez establecida pasa a las células hijas durante la replicación por la actividad de la DNA metiltransferasa, así conservando el patrón general de metilación de las islas CpG²¹. Esta aberrante hipermetilación parece contribuir significativamente a la malignidad del fenotipo de cáncer de mama²².

Un decremento en la metilación de DNA (hipometilación) es muy frecuente también en cánceres humanos, sin embargo aún no se conoce bien. En experimentos realizados en donde involucra inhibidores de la metilación de DNA in vivo, in vitro y Dnmt1 en ratones knockout^{62,63}. Indicaron la importancia de la hipometilación en oncogénesis, encontraron que una alta frecuencia de DNA hipometilado se encuentra asociado a cáncer, la naturaleza de las secuencias afectadas y la conclusión de que el cáncer vinculado con DNA hipometilado pueda producirse sin una asociación con el cáncer relacionado en DNA hipermetilado son consistentes con una función independiente de ciertas secuencias de DNA en la formación del cáncer o la

progresión del tumor. La hipometilación de algunas secuencias de DNA e hipometilación de otras secuencias ha encontrado en cáncer de mama⁶⁴.

Los genes silenciados por metilación pueden ser un mecanismo importante en la carcinogénesis debido a que estos genes normalmente están involucrados en la supresión del tumor y pueden ser reprimidos. La inactivación de la expresión de los genes por metilación de las regiones promotoras de tales genes, se ha observado en líneas celulares de cáncer y tumores humanos. Por ejemplo, las proteínas receptoras de estrógenos están presentes en las células epiteliales normales del ovario pero están ausentes en el cáncer de ovario³⁹.

La hipermetilación de los genes promotores que codifican para el receptor α de estrógeno se ha observado en tres de cuatro líneas celulares humanas de ovario que carecen de proteínas receptoras de estrógeno⁴². Esto indica que la hipermetilación puede ser responsable de este fenotipo en tumores de ovario.

Otro caso es el gen de susceptibilidad al cáncer de mama, el BRCA, esta frecuentemente mutado en una forma recesiva en el cáncer de mama hereditario. Así la pérdida de la función del producto del gen sugiere que el BRCA1 normal actúa para suprimir el cáncer de mama. La mutación del BRCA1 es muy poco frecuente en cáncer de mama no hereditario. Sin embargo, la hipermetilación interesantemente esta asociada con la inactivación del BRCA del cáncer de mama no hereditario y por lo tanto este puede ser otra vía asociada a la pérdida de la función³⁹.

Se ha encontrado que la metilación de algunos genes blanco como son el retinoblastoma (Rb), inhibidores del ciclo celular como p16 y INK4a, protein-quinasas asociadas a la apoptosis como DAPK y APC en genes receptores de estrógenos³⁹.

El cromosoma 11q es uno de los marcadores más comunes con respecto a la pérdida alélica en cánceres de humanos. Estudios realizados con la técnica de Hibridación Genómica Comparativa encontraron que la pérdida en el cromosoma 11q es principal en tumores de mama se ha visto también en bases regulares, estas observaciones sugieren la presencia de uno o más genes tumorales represores en esta región. En tumores de mama hay tres regiones eliminadas en el cromosoma 11q. La región más proximal a 11q22.3-q23.1 y contiene por instancia los genes

ATM, DDX10, PPP2R1B y SDHD. La segunda región 11q23.2-q23.3 contiene a los genes DDX6, TLSC1 Y ALL1 principalmente ⁴⁰.

1.6 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS CON INHIBIDORES DE LA METILACIÓN.

Las drogas que bloquean la metilación de DNA son pronosticadas por mostrar efectos antitumor desde la inactivación de genes supresores tumorales por metilación, puede ser un importante mecanismo en carcinogénesis. La llamada metilación del DNA ocurre en la posición 5 de la citosina. Dos análogos de deoxicitidina modificados en el 5, 5-azacitidina (5-azaC) y 5-aza-deoxicitidina, han sido usados para actuar sobre la metil transferasas. Estas drogas se incorporan al DNA y/o RNA, se unen covalentemente con las metiltransferasas de DNA y aíslan su acción de tal manera que se demetilan significativamente después de varias series de replicación. Ambas drogas, en estudios clínicos, mostraron actividad anti leucémica pero no en tumores sólidos³⁹.

1.7 TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA METILACIÓN DEL DNA.

Los métodos básicos que permiten identificar patrones globales de metilación de islas CpG, también son métodos con un uso potencial en el diagnóstico clínico (Tabla 1) para el reconocimiento de patrones de metilación existen, varias técnicas como microarreglos de expresión, microarreglos para evaluar islas CpG, y “ChIP-on-chip”. Mientras varias técnicas están disponibles para detectar metilación en muestras clínicas, algunas son bastante caras o están patentadas. Los dos métodos: “quantitative methylation-specific PCR”, por sus siglas en inglés QMSP (PCR metilación específica cuantitativa) y pirosecuenciación son altamente sensitivos, cuantitativos, robustos y susceptible a amplio uso^{43,44,45,46}.

Tabla 1. Métodos para detección de metilación en DNA.

Método	Rendimiento	Material	Aplicación	Limitaciones
Metilación específica PCR (MSP)	Relativamente alto para muestras; bajo para genes	DNA de pacientes, DNA de líneas celulares, fluidos corporales (esputo, sangre, orina)	Análisis para nuevos marcadores de metilación, analizando relativamente gran número de muestras para conocer marcadores.	Cualitativo y permite falsos positivos.
MSP cuantitativo (Taqman, sybr-green)	Relativamente alto para muestras, dificultad para establecer cada gen. Requiere estandarización empírica	DNA de pacientes, DNA de líneas celulares, fluidos corporales (esputo, sangre, orina)	Análisis cuantitativo de DNA de pacientes, correlación con parámetros clínicos	Requiere optimización substancial y esta limitado a secuencias blanco.
Pirosecuenciación	Moderado para muestras y genes, alto rendimiento para secuenciar	DNA de pacientes, DNA de líneas celulares, fluidos corporales (esputo, sangre, orina)	Análisis cuantitativo de DNA de pacientes, correlación con parámetros clínicos, análisis de mas sitios CpG que MSP	Costo elevado y requiere equipo dedicado para esta técnica.
Microarreglos de expresión después de los perfiles de inversión de la metilación del DNA	Bajo para muestras, alto para genes	Líneas celulares	Descubrimiento de nuevos marcadores	Tasa grande de error tipo I y tipo II
Restricción señalada escaneo genómico	Bajo para muestras, alto para genes	Líneas celulares	Descubrimiento de nuevos marcadores	Cobertura limitada (librerías de restricción), no hay correlación con la expresión
ChIP-on-chip	Bajo para muestras, alto para genes	Líneas celulares, potencialmente en material tumoral	Descubrimiento de nuevos marcadores	Nuevo, sesgos desconocidos, no hay correlación con expresión.

Se han empleado otras técnicas, que se utilizan para el análisis del patrón global de metilación como: amplificación de sitios intermetilados (AIMS)-PCR, así como CGH, la primera de estas técnicas ha sido evaluado por su reproducibilidad, sensibilidad y ha sido empleada para el análisis de metilación diferencial, se basa en cortar sitios intermetilados con una digestión inicial de una endonucleasa sensible a metilación Sma I cortando extremos romos, una segunda digestión con una enzima que es un isoesquizómero que corta extremos pegajosos. Estos fragmentos de DNA son ligados con dos adaptadores y amplificados por PCR, usando iniciadores específicos que hibridan a la secuencia adaptadora y al sitio de restricción^{47,48}.

En la técnica de hibridación genómica comparativa (CGH) se hibridan los productos de AIMS obtenidos de células tumorales y no tumorales en cantidades equimolares, sobre cromosomas en metafase. El producto de AIMS obtenido de la neoplasia se marca con "*Spectrum Green*" y el AIMS obtenido del DNA control con "*Spectrum Red*" ^{48,49}. Seguidamente se miden las intensidades de ambas fluorescencias en cada cromosoma mediante un sistema digital de análisis de imagen. EN condiciones de normalidad se obtienen intensidades similares en el DNA problema y en el DNA control en una proporción de 1:1, en esta técnica acoplada al realizar un mapeo de los cromosomas, los cambios en el patrón de metilación dado por la presencia de señales verde o roja que indican los eventos de hipermetilación e hipometilación, los valores que determinan estos eventos esta establecido una hipermetilación en valores por arriba de 1.20 e hipometilación por debajo de 0.80, cuando se realiza el análisis en el software y se revela una coloración amarilla representa una distribución muy similar de metilación.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres en México de acuerdo con la organización mundial de la salud. Más de 1.2 millones de mujeres serán diagnosticadas con cáncer de mama en nuestro país²⁴. La mayoría de las muertes por cáncer se producen en países de bajos y medios ingresos, donde los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes⁶⁵.

La importancia del cáncer de mama radica en el hecho, de que entre las neoplasias malignas, constituye la segunda causa de muerte en las mujeres mexicanas. Mediante un ejercicio de proyección de las tendencias actuales de mortalidad por cáncer mamario en México, se mostró que, de no variar los determinantes del cáncer mamario tampoco se realizarán intervenciones preventivas eficaces, las tasas de mortalidad tendrán un notable incremento en los próximos 15 años⁵².

El cáncer de mama es una enfermedad relacionada con acumulación de mutaciones y cambios en la expresión genética de los genes. A nivel molecular existen cambios epigenéticos en el DNA, la metilación del DNA es una modificación epigenética que juega un papel importante en el control de la expresión de genes, estos cambios como la metilación inician y manejan la tumorigénesis ya que son alteraciones en neoplasias humanas como el cáncer de mama³⁴. Estos cambios son objetivos prometedores para la detección temprana ya que pueden preceder clínicamente ante el evidente cáncer puede detectarse en los niveles sensibles, en virtud de las células tumorales y potencialmente puede dar información sobre el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad^{32,33}.

Recientemente se han desarrollado técnicas que permiten evaluar la metilación global del genoma y relacionarlo con regiones en los cromosomas, lo que permite identificar genes que pueden modificar su expresión génica como resultado que causa la metilación.

Debido a que en México no se ha establecido un patrón de metilación de DNA que sea útil en el diagnóstico del cáncer de mama en este trabajo se pretende determinar éstos para los diferentes estadios del cáncer de mama.

3. HIPOTESIS

Los patrones de metilación global serán diferentes y específicos para cada estadio en los diferentes tumores de cáncer de mama de las mujeres mexicanas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el patrón de metilación en cáncer de mama en mujeres mexicanas empleando la técnica de amplificación de sitios intermetilados/hibridación genómica comparativa (PCR-CGH).

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la técnica de CGH y PCR para identificar la metilación del DNA.
- Identificar regiones hipometiladas o hipermetiladas en tejidos tumorales de cáncer de mama de diferentes estadios en mujeres mexicanas mediante técnica de PCR-CGH.
- Relacionar regiones hipometiladas e hipermetiladas con genes asociados a cáncer de mama en la base de datos de NCBI Map Viewer.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo de este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se realizó en colaboración con el Hospital de la Mujer, las muestras biológicas que se emplearon fueron de tejido fresco congelado de adenocarcinomas esporádicos de novo al tratamiento, así como tejido de mama adyacente no afectado.

El desarrollo experimental se llevó a cabo con muestras de los siguientes grupos:

- Adenocarcinomas Mamarios en Estadio II y III, así como
- Tejido de mama adyacente no afectado de cada una de las muestras.

5.1 Extracción de DNA por proteinasa K y cloroformo-fenol-isoamílico.

5.1.1 De tejido tumoral de cáncer de mama y tejido adyacente no afectado

- 1) Macerar aproximadamente 200 mg a 1 g de tejido con un mortero utilizando nitrógeno líquido.
- 2) Adicionar 1mL de Buffer de digestión (NaCl 100mM, Tris-HCl pH8 10 mM, EDTA 25mM, SDS 0.5% y proteinasa K 10mg/mL (para acelerar el proceso se puede colocar en baño maría a 65°C por 12 a 18 h).
- 3) Adicionar 500µL de fenol-cloroformo-isopropanol (25:24:1), y mezclar con vortex
- 4) Centrifugar 15 min a 15,700 g.
- 5) Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf y precipitar con un volumen igual de isopropanol, también se puede usar un volumen de acetato de amonio 7.5 M o dos volúmenes de etanol absoluto.
- 6) Centrifugar nuevamente a 13,800 g por 15 min, eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 75%

- 7) Centrifugar 15 min a 13,800 g, decantar el etanol dejar secar la pastilla y resuspender en agua estéril.

5.1.2 Cuantificación y análisis de la integridad del DNA extraído.

Se realiza por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1x (Tris base 0.089 M, Ácido Bórico 0.089M y EDTA 0.002 M pH 8) durante 60 minutos a 100 volts.

- 1) Adicionar 2µL de cada una de las muestras de DNA con 1µL de azul bromoxifeno, usando bromuro de etidio (1µg/mL) como revelador de las bandas de DNA que es un transiluminador de luz UV de onda corta.
- 2) Utilizar un marcador de peso molecular de DNA (1Kb "Plus" DNA "Ladder").
- 3) Cuantificar el DNA genómico por espectrofotometría a 260nm de absorbancia en luz UV y a 280nm para establecer la pureza con relación 260/280.

5.2 Amplificación de sitios intermetilados (AIMS).

- 1) Los sitios intermetilados se cortan usando una enzima endonucleasa *Sma I* sensible a metilación. Se utiliza 1µg de DNA genómico el cual fue digerido con 20U durante 2h a 25°C, que corta extremos romos.
- 2) Después digerir el DNA con 4U de *Xma I* durante 5 horas a 37°C, obteniendo extremos cohesivos a los cuales se le adiciona 2nmol de los cada uno de los adaptadores MCF (5'-CCGGTCAGAGCTTTGCAAT-3') y Azul (5'-ATTCGCAAAGCTCTGA'-3) a 65°C durante 2 min, posteriormente se incuban de 30-60 min a temperatura ambiente y después se les adiciona la enzima T4 DNA ligasa, esta reacción de activación de ligación se lleva a cabo a 16°C 12h.

5.3 PCR

Realizar la amplificación de las secuencias unidas a los adaptadores con los siguientes iniciadores: Blue-CCGGG-CGCG+Blue-CCGGG-CAAC (conjunto c) (los nucleótidos en la terminación 3'subrayados fueron escogidos arbitrariamente).

- 1) Utilizar 1.5 mL de cada DNA ligado (1 µg) en 25 mL de volumen conteniendo 1.1 µM de cada primer, 2U de Taq polimerasa, 125 µM de cada dNTP, Buffer PCR (Tris-Hcl 10m M pH 8.0, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM)
- 2) Las condiciones de PCR para el conjunto c son: desnaturalizar 94°C 10 min, 30 ciclos de tres pasos 94°C 15 s, 68°C 45 s, 72°C 1 min y una extensión de 72°C 5 min.

5.4 Preparación de la Hibridación Genómica Comparada.

5.4.1 Marcaje con Kit RadPrime DNA Labeling System.

- 1) Desnaturalizar 300 ng de cada DNA amplificado (tejido adyacente no afectado y tumoral) disueltos en 9µl de agua estéril calentar por 5 min a 94°C.
- 2) Trancurrido el tiempo colocar inmediatamente los tubos en hielo.
- 3) Mantener en hielo y adicionar: 16.6 µM de dATP, 16.6 µM de dGTP, 16.6 µM de dCTP, 1 µL de dUTP Spectrum Red (al DNA control) o de dUTP Spectrum Green (al DNA tumoral), 10 µL de Buffer Random Primers llevar a un volumen final de 30 µL.
- 4) Mezclar y adicionar 40 U DE Fragmentos Klenow, nuevamente mezclar fuertemente, centrifugar 15-30 segundos.
- 5) Incubar a 37 °C por 10 minutos.
- 6) Adicionar 5 µL de Buffer Stop
- 7) Colocarlos en hielo y en la oscuridad.

5.4.2 Preparación de la sonda (mezcla de sondas de control y muestra).

- 1) Realizar la mezcla de los DNA's marcados con "Random Primers", agregar: 10µl (200 ng) de DNA genómico Tumoral marcado con "Spectrum Green", 10µl (200ng) de DNA genómico Control marcado con "Spectrum Red", 10µl (10µg) de Human Cot 1-1, 2.1 µl de acetato de sodio 3M, 52.5µl de etanol absoluto.
- 2) Mezclar en vortex y depositar en hielo seco durante 15 min.
- 3) Centrifugar a 15,300 g por 30 min a 4°C para obtener la pastilla de DNA.
- 4) Remover el sobrenadante y dejar secar la pastilla por 15 min a temperatura ambiente.
- 5) Resuspender la pastilla en 3µl de agua libre de nucleasas y 7µl de buffer de hibridación para CGH.
- 6) Después desnaturalizar la mezcla por calentamiento en baño de agua a 73°C.

5.4.3 Hibridación de las sondas sobre laminillas con cromosomas en metafase.

- 1) Marcar el área de hibridación sobre las laminillas, sumergiendolas en una solución desnaturalizante a 72-73°C (49ml de formida, 7ml de SSC 20X y 14ml de agua purificada) durante 2.5 min.
- 2) Deshidratar de las laminillas por 1 min en etanol al 70% seguido por 1 min en etanol al 85% y 1 min en etanol al 100%.
- 3) Colocar las laminillas en una placa a 50°C para que el etanol se evapore.
- 4) Agregar 10µl de la sonda desnaturalizada a las laminillas en metafase.
- 5) Colocar un cubreobjetos y sellar con pegamento Isis.
- 6) Una vez selladas colocarlas dentro de una cámara húmeda e incuba a 37°C durante 72 hrs para permitir su hibridación.

5.4.4 Lavado de las laminillas hibridadas.

- 1) Retirar el sello de cada laminilla y colocarlas en una solución de lavado (0.4x SSC/0.3% NP-40) a 75°C, agitarlas por unos segundos y dejar reposar en la solución por 2 min. Se cambian a una nueva solución de lavado 2x SSC/0.3% NP-40 a temperatura ambiente, agitando por 3 a 5 segundos, dejándolas reposar por 1 min.
- 2) Sacar la laminilla y realizar un goteo de agua libre de nucleasas y se dejan secar en la oscuridad a 50°C.

5.4.5 Visualización de la hibridación.

- 1) Aplicar 15 µl de DAPI II (diclorohidrato de 4'6-diamino-2-fenilindol) sobre cada metafase y colocar un cubreobjetos a cada una de las áreas de hibridación y sellarlas.
- 2) Visualizar la hibridación con el microscopio de fluorescencia, no exponiéndolas a periodos prolongados de luz.
- 3) Con el Software software isis de Axioimager, Karl Zeiss, seleccionar de 5 a 10 metafases por paciente, se capturan las imágenes con los diferentes filtros permitiendo ver así los dos fluoróforos por separado, la contra tinción y los tres colores simultáneamente.
- 4) Clasificar los cromosomas de cada una de las metafases de acuerdo al patrón de bandeo presente en ellos.

5.5 Búsqueda de genes asociados a cáncer de mama en la base de datos de Map Viewer.

- 1) Realizar la búsqueda en la siguiente dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> para acceder a la base de datos del NCBI Map Viewer.
- 2) Seleccionar en lista de los mapas de genomas de secuenciación de diferentes organismos la información del genoma humano (sección primates) y en el área de herramientas elegir el icono de “búsqueda de la página del organismo”.
- 3) En la página que se despliegan se encuentran los 22 cromosomas y el par sexual, elegir el cromosoma de interés.
- 4) Identificar las regiones reportadas en la técnica de CGH con el idiograma que se expone en el costado izquierdo de la pantalla y seleccionar con el cursor cada área.
- 5) Detallar la región de interés para visualizar los genes de esta con el zoom en el idiograma o bien elegir sobre el cromosoma seleccionando el aumento de zoom si se requiere precisar la lista de genes.
- 6) Al final de la página se presenta información de la región, elegir ver la tabla de los genes.
- 7) Revisar la información de cada uno de los genes.

6. RESULTADOS

6.1 Estandarización de las condiciones de las técnicas empleadas para el estudio.

6.1.1 Reacción enzimática de Sma I y Xma I en DNA fago lambda Hind III metilado con Sss I.

Este fue el primer ensayo en donde se demostró la actividad de la enzima Sma I en el fago lambda Hind III, y al realizar la búsqueda de sitios de corte de esta enzima se encontraron tres sitios de reconocimiento, con esta información y con DNA de fago lambda metilado con la enzima CpG metil transferasa se observó que la enzima no llevó a cabo ningún proceso de digestión sobre éste. En la figura 2 se observa el bandeo esperado, las bandas del carril 4 deben ser iguales que las del carril 3, comprobando así que su actividad es sobre sitios no metilados.

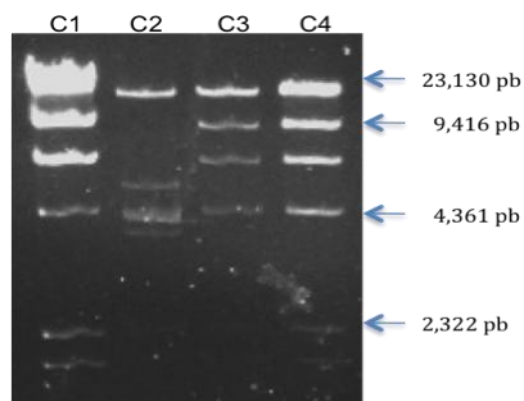


Figura 2. Reacción de enzimas de restricción Sma I (sensible a metilación) en DNA del fago lambda sin metilar y metilado con CpG metiltransferasa Sss I. Carril 1 DNA fago lambda Hind III; carril 2 DNA de fago lambda tratado con Sma I; carril 3 DNA fago lambda metilado con Sss I; carril 4 DNA genómico metilado tratado con enzima Sma I en gel de agarosa al 1%.

Para determinar la actividad de las enzimas empleadas en la técnica de AIMS (Amplificación de Sitios Intermetilados) Sma I (New England BioLabs)(corta en sitios no metilados) y Xma I (New England BioLabs) (corta en sitios metilados) se empleó la enzima CpG metiltransferasa Sss I para metilar DNA genómico que fue empleado como DNA control. En la figura 3 se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular de 1Kb y en el carril 2 y 6 las muestras de DNA genómico metilado, el corte con Sma I esta enzima se activa a una temperatura de 25°C y se inactiva a 65°C por 20 minutos, fue una incubación por dos hora (carriles 3 , 7) y otra

incubación por 16 h (carriles 4, 8), esto fue para acortar el tiempo de activación y optimizar la técnica basándonos en la información proporcionada en el instructivo en donde indica que el patrón de bandas es igual en ambos tiempos corroborándolo en el gel de agarosa al 1% se demuestra el mismo bandeo este es pequeño ya que esas son alícuotas tomadas antes de haber sido cortadas las muestras con la otra enzima. Los carriles 5 y 9 es el DNA metilado cortado la enzima Xma I (activa a 37°C por 5 hrs e inactiva a 65°C por 15 min) en donde se empieza a observar que hay un ligero barrido, no es apreciable debido a que se debió dejar mas tiempo la electroforesis del gel.

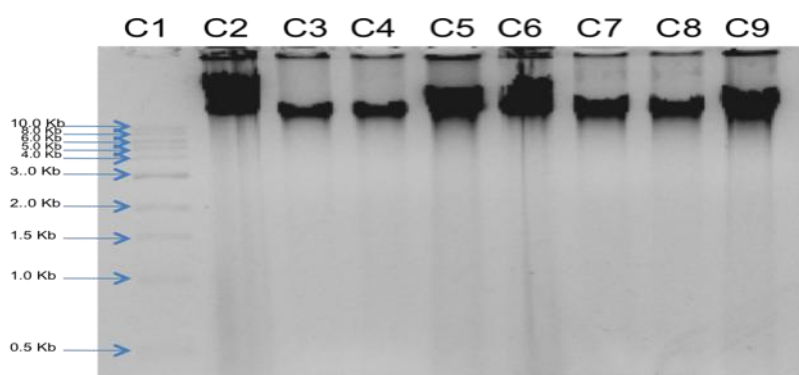


Figura 3. Reacción de enzimas de restricción Sma I (sensible a metilación) y Xma I en DNA genómico metilado con Sss I. Carril 1 M.PM marcador de peso molecular de 1kb; carril 2 DNA 1 metilado con Sss I; carril 3 DNA genómico metilado tratado con enzima Sma I incubación 1 hr; carril 4 DNA genómico metilado tratado con enzima Sma incubación 16 hrs; carril 5 DNA genómico metilado tratado con Xma I; carril 6 DNA genómico 2 metilado con Sss I; carril 7 DNA genómico metilado tratado con enzima Sma I incubación 1 hr; carril 8 DNA genómico metilado tratado con enzima Sma I incubación 16 hrs; carril 9 DNA genómico metilado tratado con Xma I en gel de agarosa al 1%.

6.1.2 Estandarización de las condiciones de la reacción enzimática de T4 DNA ligasa en fago lambda Hind III.

En la estandarización de ligación se realizó con DNA del fago lambda Hind III y la enzima T4 DNA ligasa (New England BioLabs), las condiciones para llevarla acabo en el fago lambda es a una temperatura de 16°C durante 30 minutos, en la figura 4 se observa en el primer carril el marcador de peso molecular de 1Kb, en el carril 2 las bandas de la muestra de DNA del fago lambda, en el carril 3 la ligación del DNA del fago, se observa la segunda banda más delgada en comparación con el bandeo así como la desaparición de la tercer, quinta y sexta banda y un dato importante que se muestra en el gel son las dos ultimas bandas de este carril, que

generalmente no aparecen estas bandas de 564 y 125 pb respectivamente, podrían estar uniéndose, ya que al tomar como referencia la última banda del marcador de peso de 1Kb de 0.5 Kb harían una banda de 680 Kb aproximadamente. En el carril 4 se colocó el contenido de un tubo que fue sometido a las mismas condiciones sólo que no se le adicionó DNA y en el carril 5 muestra el contenido de un tubo con las mismas condiciones pero sin la enzima T4 DNA ligasa.

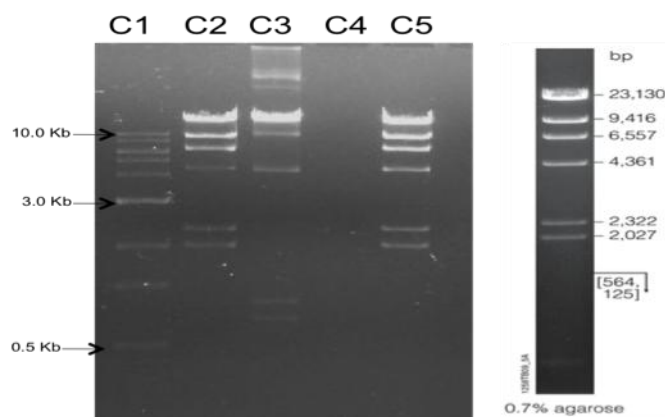


Figura 4. Reacción de enzima T4 DNA ligasa en el fago lambda tratado con Hind III. Carril 1 marcador de PM 1Kb; carril 2 DNA fago lambda Hind III; carril 3 DNA fago lambda tratado con T4 DNA ligasa; carril 4 enzima T4 DNA ligasa; carril 5 DNA fago lambda en gel de agarosa al 1%.

6.1.3 Estandarización de la ligación de adaptadores MCF, Blue en DNA y subsecuente PCR.

Una vez estandarizados los cortes de las enzimas Sma I y Xma I, así como la actividad de la enzima T4 DNA ligasa, el siguiente paso fue la unión de los adaptadores MCF y Blue (16°C por 12 hrs) a los sitios de corte realizados por Xma I para continuar con la técnica de PCR de estos fragmentos. En la figura 5 se muestra la ligación y la amplificación de PCR con los tres pares de oligonucleótidos en tres muestras diferentes, en el carril 1 el marcador de peso molecular DNA fago lambda Hind III, en los carriles 2, 5 y 8 son tres diferentes productos de PCR con el par de oligonucleótidos A; carriles 3, 6 y 9 son las muestras con el par de oligonucleótidos B y carriles 4, 7 y 10 los productos de PCR con el par de oligonucleótidos C; las muestras de DNA genómico fueron cortadas con las enzimas del protocolo de la técnica de AIMS. En la primera muestra sólo se observa bandeo en el par C, por el contrario en la segunda muestra se observa un barrido de los pares de oligonucleótidos A y C, y en la tercera muestra solo barrido en el par C, este barrido se encuentra dentro de lo establecido para llevar a cabo la técnica de CGH, en

donde se requiere un barrido de entre 300-3000 pb. Este gel es representativo de los ensayos realizados para la estandarización de PCR, observando amplificación de uno o dos de los pares de oligonucleotidos, en la mayoría amplificaba el par de oligonucleotidos C.

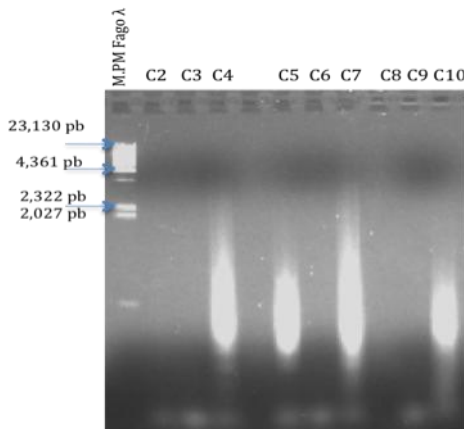


Figura 5. DNA genómico metilado con Sss I cortado con enzimas de restricción Sma I, Xma I ligado a los adaptadores (MCF y Blue) y PCR con los tres pares de oligos. Carril 1 marcador DNA fago lambda Hind III; carril 2,3 y 4 productos de PCR de muestra 1 con par de oligonucleotidos A, B y C respectivamente; carril 5,6 y 7 productos de PCR oligos A, B y C; carril 4 PCR par de oligos B; carril 5 PCR par de oligos C; carril 6 DNA genómico 2 ligado a adaptadores MCF y Blue con T4 DNA ligasa; carril 7 PCR par de oligos A; carril 8 PCR par de oligos B; carril 9 PCR par de oligos C en gel de agarosa al 1%.

6.2 TRATAMIENTO DE TEJIDO ADYACENTE NO AFECTADO (CONTROL) Y TUMORAL CON LAS TÉCNICAS PARA EL ANALISIS DEL PATRON DE METILACIÓN.

6.2.1 Cuantificación y pureza de DNA genómico Tejido Adyacente no Afectado (Control) y Tumoral extraído con proteinasa K y fenol-cloroformo-isoamílico.

La cuantificación del DNA se realizó mediante un método espectrofotométrico, el análisis de la lectura de las absorbancias pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del DNA, esta molécula tiene absorbancia máxima a 260 nm y la relación dada por el cociente de las absorbancias 260nm/280nm a un valor de 1.65 a 2 indican la calidad y pureza de la muestra. De acuerdo con esta relación, en los datos de la tabla 2 tanto las muestras como los controles tienen un valor de pureza dentro del intervalo establecido de pureza y calidad aceptable, la integridad del DNA se determinó en un gel de

agarosa al 1% (Fig 6). También se encuentra la información de los tres pares de muestras empladas en este estudio son tres muestras de tejido adyacente no afectado (control) cada una con su muestra de adenocarcinoma mamario, edad, forma de cáncer de mama, y sólo en los casos 2 y 3 se tiene información de las etapas de estos tumores.

Tabla 2. Concentración y pureza de las muestras de DNA genómico de tejido adyacente no afectado y tumoral.

CONTROL (Tejido adyacente no afectado)	Concentración ng/uL	Pureza abs 260/280 (1.79-2)	Muestra (tejido tumoral)	Concentración ng/uL	Pureza abs 260/280 (1.79-2)
1	289.99	1.92	1	638.10	1.91
2	210.39	1.84	2	382.41	1.88
3	239.91	1.83	4	700.8	1.96

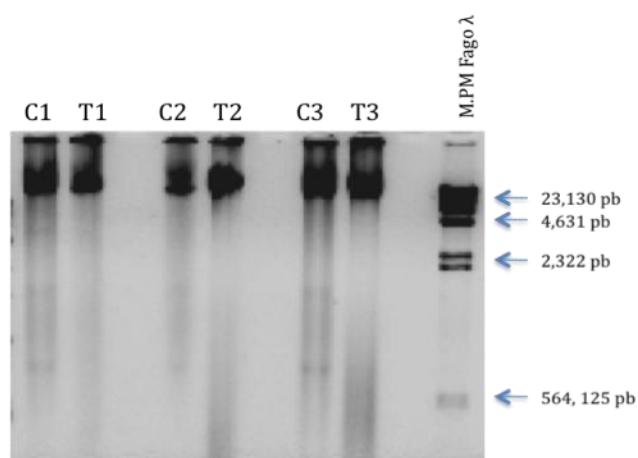


Figura 6. Integridad de DNA genómico de tejido adyacente no afectado y tumoral extraído de tejido fresco con proteinasa K y fenol-cloroformo-isoamílico. C1 control 1; C2 muestra 1; C3 control 2; C4 muestra 2,;C5 control 3; C6 muestra 3; M.PM Fago lambda, en gel de agarosa al 1%.

6.3 TECNICA DE AIMS (AMPLIFICACIÓN DE SITIOS INTERMETILADOS).

6.3.1 Reacción enzimática de Sma I y Xma I en tejido adyacente no afectado y tumoral.

De acuerdo con las condiciones estandarizadas en la activación de las enzimas empleadas para la técnica de AIMS, en la figura 7 se muestra el corte de los controles y las muestras con las enzimas Sma I que realiza cortes en sitios no metilados obteniendo fragmentos romos y Xma I en sitios metilados dando cortes con extremos cohesivos, en los carriles C1, C2 y C3 se colocaron las muestras control o tejido adyacente no afectado y en los T1, T2 y T3 las muestras tumorales, en todos los DNA's hay un barrido de entre los 4000 hasta por debajo de los 500, estos fragmentos ya pueden ser utilizados en la técnica de CGH tal como se establece para el marcaje de las sondas.

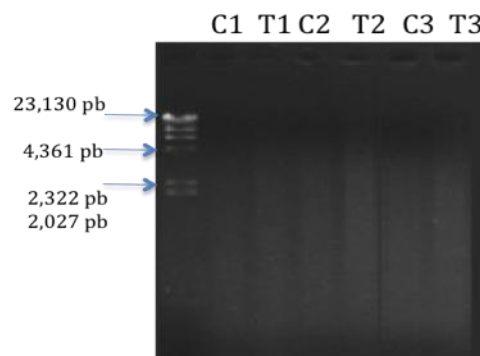


Figura 7. Reacción de enzimas de restricción Sma I y Xma I en DNA de tejido control y tumoral de tres muestras. Carril 1 DNA fago lambda Hind III, carril 2: cortes DNA control 1; carril 3: cortes DNA tumoral 1; carril 4: cortes DNA control 2; carril 5: cortes DNA tumoral 2; carril 6: cortes DNA control 3; carril 7: cortes DNA tumoral 3; en gel de agarosa al 1%.

6.3 PCR.

Después de realizar los cortes de las enzimas Sma I y Xma I, se requiere la unión de los adaptadores MCF y Blue a los sitios de corte realizados por la enzima Xma I, una vez realizado esto, con la enzima T4 DNA ligasa se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos ya unidos a los adaptadores pero sólo se seleccionó el par de oligonucleótidos C, esto de acuerdo con la estandarización de la técnica de PCR. En el carril 1 el marcador de peso molecular de DNA de fago lambda, en los siguientes carriles los productos de PCR de los controles C1, C2 y C3, y los productos de PCR de los tumores en T1, T2 y T3 los productos de PCR de las muestras de tumor

con el par de oligonucleotidos C (fig 8), nuevamente se observa el barrido dentro de lo establecido para llevar acabo el marcaje, pero como estos fragmentos ya se encuentran dentro del tamaño establecido ya no se requiere cortar con el kit de CGH, por lo cual el marcaje de las sondas fue realizado con un kit RadPrime Labelling System.

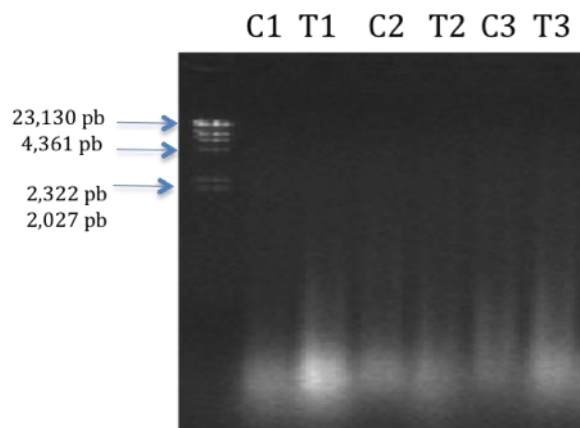


Figura 8. Productos de PCR con el par de Oligonucleotidos C. Carril 1 marcador DNA fago lambda Hind III; carril 2 PCR DNA control 1; carril 3 PCR DNA tumor 1; carril 4 PCR DNA control 2; carril 5 PCR DNA tumor 2; carril 6 DNA control 3; carril 7 PCR DNA tumor 3, en gel de agarosa al 1%.

6.4 CGH.

Después de realizar la técnica de PCR y observar que el tamaño de los fragmentos de DNA de los controles y de los tumores se encuentran dentro de los intervalos de 300-3000 pb, fue posible emplear la técnica de *Hibridación Genómica Comparativa* para detectar las regiones de nuestro interes. En el análisis de CGH se observa cada uno de los cromosomas (23) que fueron visualizados mediante el software isis de Axioimager, Karl Zeiss. El cual requiere de 10 a 15 imágenes de cada cromosoma que son capturadas mediante microscopia de fluorescencia. El análisis se realiza comparando la intensidad de la muestra marcada con un fluoroforo verde (dUTP *Spectrum Green*) y la control en rojo (dUTP *Spectrum Red*). Cuando la muestra de referencia presenta alguna variación en su secuencia, en los cromosomas se observa una barra de verde que se intepreta como ganancia y una barra en rojo que es una pérdida.

En nuestro trabajo los valores promedio de la intensidad de la fluorescencia esta dada en función de la posición distribuida a lo largo de cada cromosoma individual. El valor del umbral

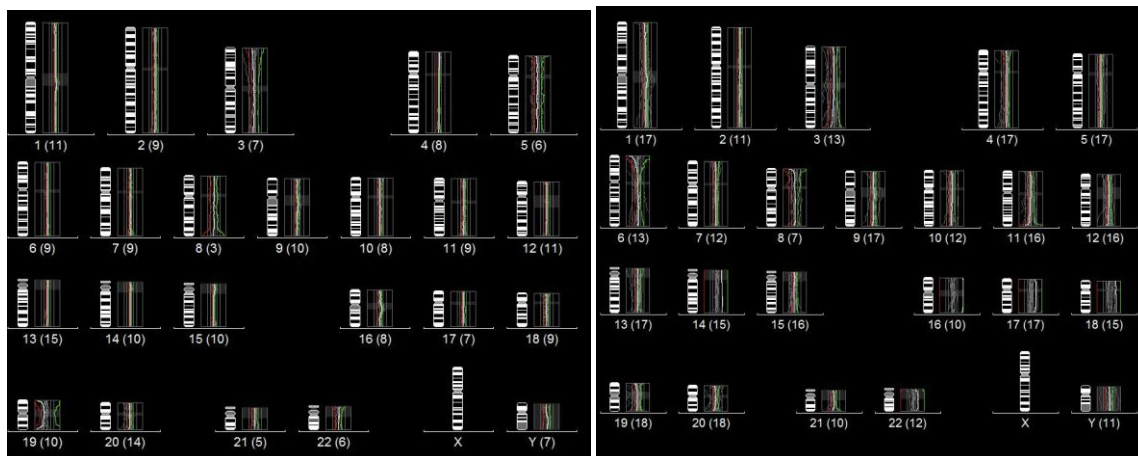
indicado es 1, teniendo un intervalo de 1 ± 0.15 , la relación de valores menores del umbral (representa la línea roja) son consideradas como hipometilación, mientras que los valores > 1.15 (línea verde a la derecha) considerado como hipermetilación.

6.4.1 Identificación de las regiones hipometiladas o hipermetiladas en el DNA de tumores de cáncer de mama en diferentes etapas de mujeres mexicanas mediante PCR-CGH y el análisis en la base de datos Map Viewer

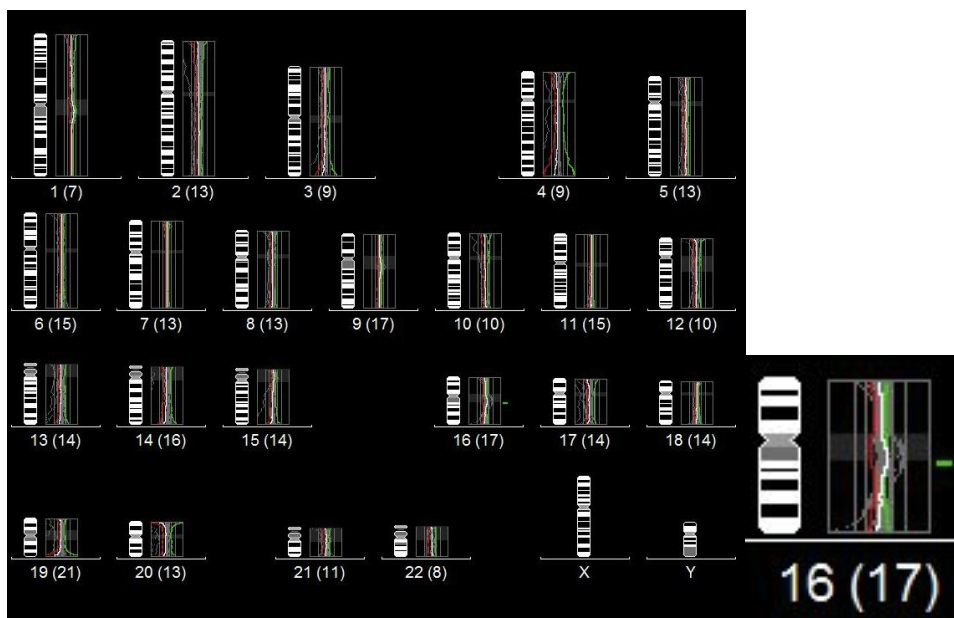
En la figura 9 podemos observar los resultados de las cuatro muestras analizadas, en la imagen 9A se muestran los resultados de las metafases analizadas entre el DNA control (rojo) y el DNA tumoral 1(verde) (estadio III ver tabla 3), en el cual no se observa alguna alteración el patrón de metilación. Para esta muestra 1 se realizó el marcaje de forma inversa con los fluoróforos es decir el DNA control (verde) y el DNA tumoral 1(rojo) lo cual sirvió como control interno de calidad y corroboró que no hay alteración en la secuencia de esta muestra (fig 9A). de igual forma no se detectó alguna modificación en los cromosomas, la muestra 3 es un caso estadio III (figura 9C), no reveló regiones modificadas, lo que sugiere que la fluorescencia emitida de los fluoróforos se encuentra equilibrada.

Los idiogramas en la figura 9B obtenidos de la muestra 2 (verde) (estadio II) con el DNA control (rojo), revelan al realizar el análisis de CGH, una barra en verde en el cromosoma 16, en los brazos largos (q) en la región cercana al centromero, lo cual nos permite inferir una ganancia de la muestra y esto lo podemos interpretar como una región hipermetilada, en otros estudios realizados y reportados (NCBI, National Cancer Institute, SKY/M-FISH & CGH Database) con CGH buscando alteraciones cromosómicas han reportado pérdidas en el brazo q, sin embargo en este trabajo el estudio se basa en modificaciones en el patrón de metilación de tumores de mama, en la ampliación de la imagen se observa la barra en color verde cercana al área de heterocromatina pericentromérica del cromosoma 16.

A) Control y Muestra 1



C) MUESTRA 2



C) MUESTRA 3

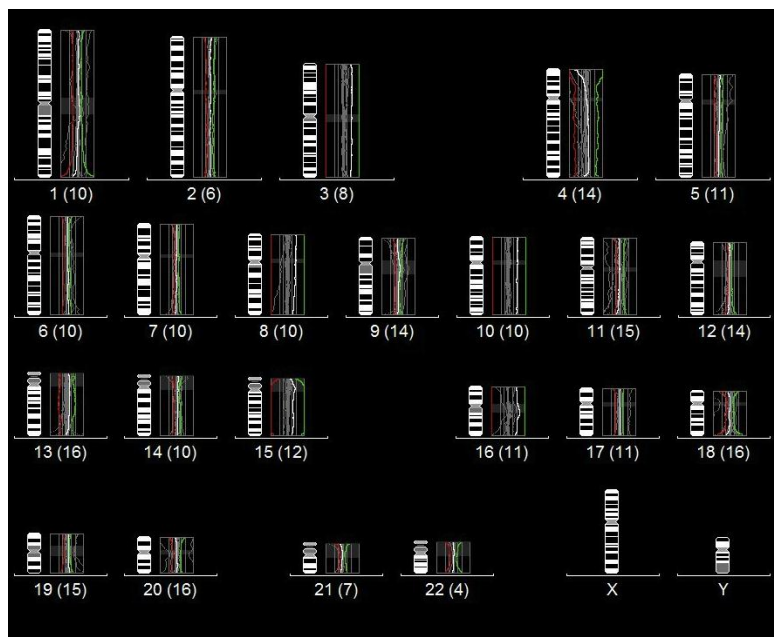


Figura 9. Representación de los Idiogramas de cada una de las muestras para el análisis de metilación por las técnicas acopladas de AIMS-CGH. A) Idiogramas del control (muestra de tumor 1 pero invirtiendo el marcaje de las sondas) e Idiogramas de la muestra 1 ; B) Idiogramas muestra 2 y ampliación de la región que revela una hipermetilación y C) Idiogramas de la muestra 3; en cada imagen esta representado el cromosoma y su idiograma, indicando la cuantificación de la fluorescencia promedio los valores promedio de la intensidad de la fluorescencia esta dada en función de la posición distribuida a lo largo de cada cromosoma individual.

TABLA 3. Información clínica de las muestras de tumores mamarios empleados en este estudio y resultados obtenidos por la técnica de GCH.

MUESTRA	EDAD	BIOPSIA	ETAPA	Hipermetilación (+) / hipometilación (-)
1	32	Carcinoma infiltrante, mama derecha	III	ND
2	34	Carcinoma infiltrante, mama derecha	II	+
3	48	Carcinoma infiltrante, mama derecha	III	ND

Finalmente, con la evidencia de la hipermetilación en el cromosoma 16q12 como hipermetilada, se realizó la búsqueda de este cromosoma en la base de datos de Map Viewer en NCBI, la cual proporciona información de genes y secuencias de una gran variedad de organismos, entre ellos el genoma humano organizado en los 22 cromosomas y el par sexual, una vez localizado el cromosoma 16 es seleccionado proporcionando información las diferentes regiones de los brazos p y q.

Comparando la imagen del cromosoma 16 obtenida de la base de datos de Map Viewer con el idiograma revelado en la muestra 2, para poder discernir la región que representa la barra en color verde (fig 10 A), se observa alineada debajo de la zona sombreada en color gris que representa el área del centromero e identificándola como la región del cromosoma 16q12.1 (fig 10 B), con esta evidencia, el siguiente paso fue buscar detalladamente qué genes se encuentran en esta región, en la tabla 4 se exponen la lista de los genes proporcionada así como una pequeña descripción de cada uno de ellos. De esta información, los genes hipotéticos o pseudogenes, o genes que se encuentran en regiones del cromosoma pero en 16q11 fueron descartados como: FLJ443980, LOCC441768, SHCBP1, LOC100287282, RAB43P, MILK3, LOC100130180, C16orf87, CKBP1, NETO2, LOC100127930 y RLP23AP72. El resto de los genes de acuerdo con la información proporcionada en la opción HGNC, los genes VPS35, ORC6L se encuentran en la región 16q12 y en la región 16q12.1 los genes GPT2, DNAJA2 y ITFG1.

De los genes q se localizan en 16q12, la función del gen VPS35, es el núcleo de un complejo multimérico, cuenta con un residuo asp conservado en el dominio N-terminal esta específicamente involucrado con una proteína internada en el Aparato de Golgi, no cuenta con región de islas CpG el mapeo revela que el gen se encuentra en el cromosoma 16q13-q21, por lo tanto también se descarta.

El gen ORCL6 en la descripción proporcionada por la base de datos de OMIM, proteína que forma parte de complejo multiproteico formado por 6 proteínas, necesarios para llevar a cabo el inicio de la replicación del DNA, dentro de otras funciones reportadas se encuentran en el ciclo celular localizándose algunos de estos componentes de ORC en cinetocoros, durante la mitosis cuando los cromosomas son segregados en la anafase, se alinean estructuras reticulares y algunos componentes del complejo se localizan en la mitad del cuerpo de cromosoma antes de separarse.

Ahora el otro grupo de genes que se encuentran en 16q12.1, el gen GPT2 es una aminotransferasa mitocondrial, son enzimas piridoxal que catalizan la transaminación reversible entre alanina y 2-oxoglutarato para formar piruvato y glutamato, tiene una función importante en gluconeogénesis y metabolismo de aminoácidos. Su transcrito se encuentra en niveles bajos en mama. El gen DNAJA 2 pertenece a la familia de proteínas conservadas DNAJ/HSP40, regulan la actividad de las chaperonas para estimular la actividad ATPasa. Otro gen es el ITFG1 codifica para una proteína inmunomoduladora de células T, cuando esta proteína se expone a las células T se secreta IFN, TNF y IL 10, induce fosforilación de MAPK3 y MAPK1.

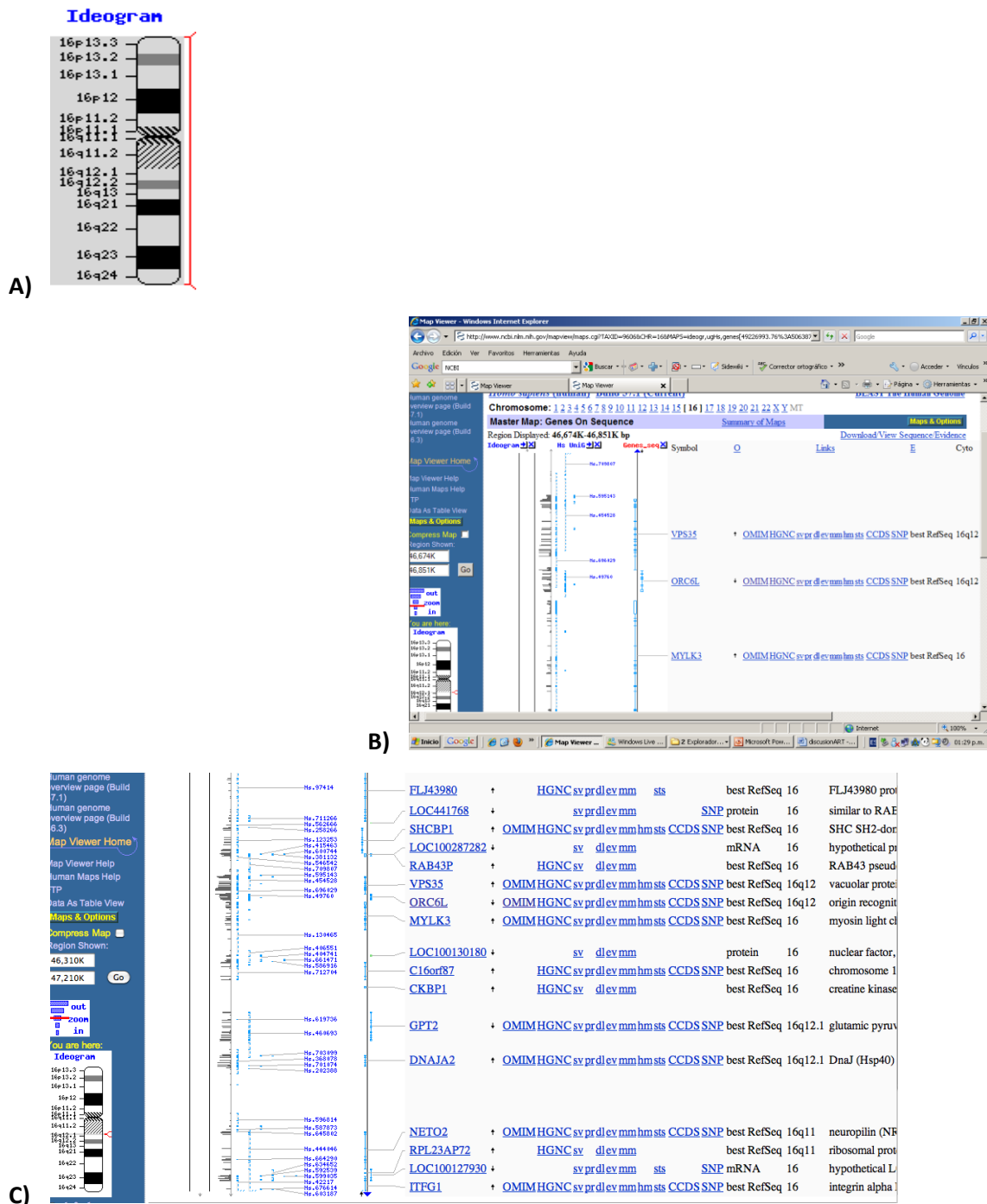


Figura 10. Imágenes obtenidas en la búsqueda de la base de datos de Map Viewer. A) Comparación del cromosoma 16 de la base de datos con el revelado en la muestra 2 con la técnica de CGH, B) Diapositiva de la región que coincide con la encontrada como hipermetilada en donde se enlistan 3 genes y C) Diapositiva con aumento en la región 16q12 detallando mayor número de genes reportados de la base de datos.

TABLA 4. Cuadro con los genes reportados en el cromosoma 16q12 de la base de datos de NCBI Map Viewer.

Homo sapiens (human) Build 37.1 (Current)										BLAST The Human Genome	
Data As Table View					Download All						
Genes On Sequence			All Sequence Maps					next			
Region Displayed: 46,200,000 - 47,200,000 bp										Download	
Total Genes On Chromosome: 2328											
Genes in Region: 17											
start	stop	Symbol	O	Links		E	Cyto	Description			
45903249	45903609	FLJ43980	-	HGNC	sv pr dl ev mm sts	best RefSeq	16	HJ43980 protein			
45905445	45905648	LOC441768	+	sv pr dl ev mm		SNP	protein	16	similar to RAB31, member RAS oncogene family		
45914455	45935311	SHCBP1	-	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16	SHC1 SH2-domain binding protein 1		
45955773	45956572	LOC100287282	+	sv dl ev mm			miRNA	16	hypothetical protein LOC100287282		
45955789	45956897	RAB43P	-	HGNC	sv dl ev mm		best RefSeq	16	RAB43 pseudogene		
45993589	45723144	VPS35	-	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16q12	vacuolar protein sorting 35 homolog (S. cerevisiae)		
45723558	45732905	ORC6L	+	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16q12	origin recognition complex, subunit 6 like (yeast)		
45735194	45782221	MYLK3	-	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16	myosin light chain kinase 3		
45823907	45825990	LOC100130180	+	sv dl ev mm			protein	16	nuclear factor, erythroid-derived 2, like 3 pseudogene		
45835939	45855074	C16orf87	-	HGNC	sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16	chromosome 16 open reading frame 87		
45875271	45878532	CKBP1	-	HGNC	sv dl ev mm		best RefSeq	16	creatine kinase B pseudogene 1		
45918308	45955201	GPT2	+	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16q12.1	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2		
45989274	47007525	DNAJA2	-	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16q12.1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2		
47115442	47177908	NETO2	-	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16q11	neuropilin (CD226) and tolloid (CD113)-like 2		
47177931	47195558	LOC100127930	+	sv pr dl ev mm sts		SNP	miRNA	16	hypothetical LOC100127930		
47184043	47184477	RPL23AP72	-	HGNC	sv dl ev mm		best RefSeq	16q11	ribosomal protein L23a pseudogene 72		
47189257	47495018	ITFG1	-	OMIM	HGNC sv pr dl ev mm hm sts	CCDS	SNP best RefSeq	16	integrin alpha 8 (ITGA8) repeat containing 1		

7. DISCUSIÓN

Las técnicas empleadas en este estudio son técnicas acopladas que permiten obtener información del patrón de metilación del DNA, y juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión génica.

La técnica de AIMS es un nuevo protocolo que se ha desarrollado como una herramienta que permite obtener un patrón global de metilación en el análisis de muestras de tumores, en trabajos previos con esta técnica han evaluado su reproducibilidad y sensibilidad así como ser viable su aplicación a una gran serie de muestras porque esta técnica es simple y de bajo requerimiento de material^{49,60}. Este método es especialmente poderoso en la detección de secuencias hipometiladas que con frecuencia están relacionadas a genes supresores de tumor⁴⁹. La aplicación de la tecnología de CGH permite analizar cambios en el número de copias de una secuencia de DNA en el genoma completo detectando pérdidas o ganancias de regiones completas o regiones subcromosomales. Ha permitido la identificación de desequilibrios en varias enfermedades como el cáncer, que ocurre como resultado de una progresiva acumulación de modificaciones genéticas y cambios epigenéticos⁶⁶. La relación de los cambios epigenéticos en el DNA como la metilación en cáncer, es importante pues se ha observado una baja metilación en oncogenes, y por otro lado hipermetilación en genes supresores de tumor bien en genes cuya función está relacionada con moléculas de adhesión, reparación de DNA e inhibidores de metastasis siendo importantes para el inicio de la tumorigénesis⁶⁷.

Esta técnica presenta algunas limitantes no se pueden evaluar regiones heterocromáticas, teloméricas, pericentroméricas y en los cromosomas 1p32-pter, 16p, 19 y 22, ya que pueden permitir interpretaciones de falso-positivo⁶⁶. Aunque se conoce que la heterocromatina está formada por secuencias en tándem ricas en islas CpG y que se encuentra metilado, lo que confiere mantener la estructura compacta que puede impedir la acción de enzimas de restricción. También se ha descrito que secuencias repetidas con frecuencia se encuentran hipometiladas en células cancerosas, como las secuencias de DNA satélite y en heterocromatina constitutiva, en particular en el centromero de los cromosomas 1 y 16 en varios cánceres entre ellos el de mama⁶⁴.

En el laboratorio se ha adaptado este protocolo para el análisis del patrón global de metilación del DNA en cáncer de mama de mujeres mexicanas. La importancia de este protocolo se basa en los diferentes cortes de DNA para el subsecuente análisis. Por lo tanto fue importante estandarizar las condiciones de activación de las enzimas para DNA genómico, partiendo de las especificaciones proporcionadas por la marca de éstas, se utilizó como control el DNA del fago lambda y DNA metilado, obteniendo imágenes que demuestran su actividad en ambos DNA's (fig 3 y 4), encontrando las temperaturas y tiempos adecuados para la obtener una máxima digestión de las enzimas, ya que en algunos trabajos reportan falsos positivos debido a una pobre digestión enzimática⁴⁹.

También es importante la actividad de la enzima T4 DNA ligasa que une a los adaptadores a los extremos cohesivos producidos por las enzimas siendo estos importantes para el inicio de PCR, la estricta amplificación de los fragmentos cortados y flanqueados por los adaptadores son de diferentes tamaño mostrando un patrón de barrido diferente al del DNA unido a adaptadores.

El análisis de estas diferencias en los patrones permitiría mostrar claramente cambios y pequeñas variaciones en la intensidad cuando se realiza la comparación de muestras de tejido normal y tumoral. Sin embargo el descubrimiento de nuevos objetivos, debido a su carácter arbitrario permite la evaluación global de los perfiles de metilación⁴⁹. Otras técnicas de biología molecular empleadas para el análisis permiten el análisis específico y requieren el diseño de iniciadores específicos o diseñados especialmente.

En nuestro estudio combinación de técnicas como AIMS-CGH-PCR observamos una región hipermetilada en el cromosoma 16 en el brazo q cercana al centromero, apoyados en la base de datos del NCBI Map Viewer fue posible delimitar la región dando como resultado una hipermetilación en el cromosoma 16q12.1. Después se obtuvo una lista de genes que han sido reportados dentro de esta región, de los cuales la gran mayoría fueron descartados por ser genes hipotéticos, seudogenes o bien se encontraban en una región diferente a la 16q12.

Inicialmente dos genes se localizaban en el locus 16q12, pero en la información de mapeo el gen VPS35 se encuentra en el locus 16q13-21, por lo cual fue descartado. El otro gen encontrado en este locus es ORC6L como se mencionó anteriormente, codifica para proteína

que forma parte de un complejo de origen de reconocimiento que se requiere para la replicación. También ha sido reportado con otras funciones como ser importante en silenciamiento transcripcional además se ha sugerido que participa en el control del ciclo celular⁶⁸. La información acerca de este gen en cánceres humanos es limitada⁶⁹. En estudios realizados en cáncer de colon han confirmado que su expresión se encuentra elevada comparada con tejidos normales, en otro estudio evaluaron el impacto al reducir Orc6 en el control del ciclo celular, demostrando que las células se mantenían en gran parte en la fase G1 sin regresar al ciclo⁷⁰. Otro hallazgo reportado por Gavin son los niveles aumentados de p53 forforilado en el residuo ser-15 cuando se encuentra baja la expresión de Orc6. Ahora en base a estos resultados podríamos reflejarlos a nuestros resultados, si este se encuentra hipermetilado, se estaría reprimiendo la transcripción de esa proteína que juega un papel importante durante la replicación y en el ciclo celular, entonces el gen se encuentra silenciado y por lo tanto, se estaría bloqueando el proceso de tumorigenesis.

Respecto a los genes que se encuentran en el locus 16q12.1, el gen GPT 2 gen codifica para una proteína que cataliza la transaminación reversible entre alanina y 2-oxoglutamato para formar piruvato y glutamato. En tejido de mama se encuentra en niveles de expresión bajos⁷¹ y no se encontraron reportes que indiquen estar relacionado con cáncer, pero si se ha investigado que esta involucrado en modificaciones epigenéticas como la acetilación de histonas de la cromatina, en un trabajo publicado por Aagaard-Tillery et al. encontraron alteraciones en la estructura de la cromatina por modificaciones covalentes en las histonas en etapas fetales, reportando un incremento en la expresión del gen GPT2 y DNAJA2 en una dieta materna de alto contenido en grasas⁷².

En el gen DNAJA 2, pertenece a una familia de co-chaperonas poco estudiado, se sabe que estimulan el dominio-J ATPasa de las HSPA (proteínas de choque térmico) conteniendo el extremo N-terminal regiones ricas en glicina/fenilalanina, una región rica en cisteína^{73,74}. Estudios recientes ha revelado que miembros de la familia DNAJ en varios tipos de cáncer confiriendo resistencia a terapias citotóxicas, tienen funciones en procesos de regulación del ciclo celular, procesos inmunológicos, activación transcripcional y señales de transducción. Y si bien algunas proteínas de esta familia están estudiadas y asociadas a cáncer no se encontró información acerca de la proteína Dnja 2⁷⁵.

Al realizar la búsqueda de información del gen ITFG1, este gen codifica para una proteína integral conteniendo secuencias repetidas FG-GAP, la expresión de las proteínas integrinas está involucrada en procesos de adhesión y señales de transducción en cáncer de mama⁷⁶. La reducida expresión de integrinas α y β en etapas tempranas en células de tumores de mama está correlacionada con un aumento en invasión y metastasis, Berry et al., en su trabajo no confirmó esta correlación en estas integrinas⁷⁷.

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se estandarizaron en el Lab. de Genética Humana UIMGH del CMN siglo XXI, las técnicas de CGH y PCR para identificar la metilación del DNA en muestras de cáncer de mama utilizando el método de fenol-cloroformo-isoamilico para extraer el DNA del tejido tumoral mamario de alta pureza y en cantidades suficientes (1 a 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para el diagnóstico.
- ✓ El número de muestras fue insuficiente para realizar una correlación, sin embargo, en 1 de 3 muestras se pudo observar una hipermetilación en el cromosoma 16q, esto deja ver la sensibilidad de la misma.
- ✓ La hipermetilacion de las regiones 16p12 y 16p12.1 está involucradas con los genes ORC6L, GTP2, DNAJA 2 e ITFG1.
- ✓ El gen con mayor información descrita relacionado con cáncer es el gen ORCL6.

PERSPECTIVAS

Aumentar el número de muestras de tejido tumoral y adyacente no afectado de diferentes etapas para realizar el análisis del patrón de metilación.

Utilizar otro conjunto de iniciadores diferentes para continuar con el análisis e identificar de otras regiones que se encuentren hipermetiladas o hipometiladas que permitan correlacionarlas con las diferentes etapas de los tumores y con la información clínica de cada paciente, así como la identificación de los genes en la base de datos de NCBI Map Viewer.

Validar las técnicas para el análisis del patrón de metilación mediante la amplificación de sitios intermetilados/hibridación genómica comparativa (PCR-CGH) y pueda ofrecerse a las pacientes con cáncer de mama.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Hanahan D. Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
2. Jones P.A., Laird P.W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21:163-167
3. Nakao M. Epigenetics : interaction of the methylation and chromatin. *Gene* 2001; 278:25-31
4. Wajed S.A., Laird P.W. and DeMeester T.R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Annals of surgery* 2001; 234(1):10-20.
5. Kafri T., Ariel M., Brandeis M., Shemer R. et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 1992; 6:705-714.
6. Brown T.A. *Genomes*. 2nd edition. Ed U.K.: Wiley-Liss Manchester; 2002, p 572
7. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16:6-21.
8. Ng H.H., Zhang Y., Hendrich B., Johnson C. A. et al. MBD2 a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999; 23:58-61.
9. Araujo F.D., Knox J.D., Szyf M., Price G.B., Zannis-Hadjopoulos M. Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3475-3482.
10. Razin A., Shemer R. DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet* 1995; 4:1751-1755.
11. Chuang L.S., Ian H. I., Koh T.W., NG H.H., Xu G., Li B.F. Human DNA –(cytosine-5) methyltransferase- PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 1997; 277:1996-2000.
12. Costello J.F., Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38:285-303
13. Bestor T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2395-2402.
14. Burgers W.A., Fuks F., Kouzarides T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet* 2002; 18:275-277.

15. Paulsen M., Ferguson-smith A. C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001; 195:97-110.
16. Parrella P., Poeta M.L., et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cáncer-related genes in sporadic breast tumor. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:5349-5354.
17. Baylin S.B., Herman J.G. DNA hipermethylation in tumorogenesis epigenetics joins genetics *Trends Genet* 2000; 16:168-174.
18. Ehrlich M: DNA hypomethylation , cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability , facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr* 2002; 132:2424S-2429S.
19. Merlo A., Herman J.G., Mao L., et al. 5' CpG islands methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1996; 1:686-692.
20. Birgisdottir V., Stefansson O.A., et al. Epigenetic silencing and deletion of the BCRA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research* 2006; 8(4):1-10.
21. Herman J.G., Baylin S.B. Gene silencing in cancer association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349:2042-2054.
22. Bae Y.K., Brown A., Garret E., Boruman D., et al. Hypermethylation in hystologically distinct classes of breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:5998-6005.
23. Rodriguez M., Tellez N., Cerbón M.A. DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Rev Invest Clin* 2004;56(1):56-71.
24. Hoque O.M., Feng Q., Toure P., Dem A., et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncology* 2006; 24(26):4262-4269.
25. SUIVE: Sistema Unico de Informacion para la Vigilancia Epidemiologica/DGE/SSA. Incidencia de casos nuevos de enfermedades por grupo de edad Estados Unidos Mexicanos. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas 2002 [<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>].
26. Cornelisse CJ, Kuipers-Dijkshoorn N, van Vliet M, Hermans J, Devilee P: Fractional allelic imbalance in human breast cancer increases with tetraploidization and chromosome loss. *Int J Cancer* 1992, 50:544-548.

27. Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Petersson C, Bardi G, Idvall I, Johansson B, Ingvar C, Mandahl N, Mitelman F: Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer* 1995, **12**:173-185.
28. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Olsson H, Sigurdsson H: ERBB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. *Oncogene* 1991, **6**:137-143.
29. Borg A, Baldetorp B, Ferno M, Olsson H, Sigurdsson H: c-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer* 1992, **51**:687-691.
30. Bieche I, Lidereau R: Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1995, **14**:227-251.
31. Phelan CM, Borg A, Cuny M, Crichton DN, Baldersson T., et al. Consortium study on 1280 breast carcinomas: allelic loss on chromosome 17 targets subregions associated with family history and clinical parameters. *Cancer Res* 1998, **58**:1004-1012.
32. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**:210-219.
33. Laird P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**:253-266.
34. Muller H.M., Widschwendner A., Fiegl H. et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients an independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003; **63**:7641-7645.
35. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; **3**:415-428.
36. Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., Herman J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; **61**:3225-3229.
37. Feinberg A.P. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004; **14**:427-432.

38. Bandyopadhyay D. Medrano E.E. The emerging role of epigenetics in cellular and organismal aging. *Exp Gerontol* 2003; 38:1299-1307.
39. Pecorino L. *Molecular Biology of cancer. Mechanisms, targets and therapeutics.* Oxford University Press. Reimp 2006.
40. Allinen A. DNA damage response genes and chromosome 11q21-q24 candidate tumor suppressor genes in breast cancer. Department of Clinical Genetics, University of Oulu, P.O.Box 5000, FIN-90014 University of Oulu, Finland, University Hospital of Oulu, P.O.Box 10, FIN-90029 OYS, Finland Oulu, Finland 2002.
41. Wojdacz Y.K, Hansen L.L. Techniques used in studies of age-related DNA methylation changes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067:479-487.
42. O'Doherty, A.M., Church, S.W., Russell S.E.H., Nelson, J. and Hickey, I. Methylation status of oestrogen receptor- α gene promoter sequences in human ovarian epithelial cell lines. *Br J Cancer* 2002; 86:282-284.
43. Flackler M.J, et al. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64:442-4452.
44. Curtis C.D., Goggins, M. DNA methylation analysis in human cancer. *Methods Mol Med* 2005;103:123-136.
45. Costello J.F., Smiraglia D.J., Plass C. Restriction landmark genome scanning. *Methods* 2002; 27:144-149.
46. Shames D.S., Minna J.D., Gazdar A.F. Methods for detecting DNA methylation in tumors: From bench to bedside. *Cancer Letters* 2007; 251:187-198.
47. Paz, M.F., Wei, S., Cigudosa, J.C., Rodriguez-Perales, S., Peinado, M. A., Huang, T. H. and Esteller, M. Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum Mol Genet*, 2003; 12(17):2209-2219.

48. Fraga M,F., Ballestar E, Paz M.F, Ropero S, Setien F, Ballestar M.L, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(30):10604-9.

49. Frigola J, Ribas M, Risques R.A, Peinado M.A. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res.* 2002;30(7):e28.

50. Sociedad Americana del Cancer. Breast cancer Treatment Guidelines for patients. versión VIII august 2005
http://www.nccn.org/patients/patient_gls/ spanish/pdf/NCCN_seno.pdf

51. Datos reportados e información reportada por el Instituto Nacional de Población.

52. Datos reportados e información reportada por la Organización Mundial de la Salud.

53. Vogelstein B, Kinzler K.W. The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill, New York, 1998.

54. Simpson A.J.G. The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1977; 71: 209-40.

55. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers A, Carlson J, Li H, Cai X, Fox J, Goldenring J, Wang T. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306:1568-1571.

56. Rao, Putahidis T, Ge Z, Nambiar P, Boussahmoin C, Wang Y, Horuintz B, Fox J, Erdman S. Innate immune inflammatory response against enteric bacteria *Helicobacter hepaticus* induces a mamary adenocarcionoma in mice. *Cancer Res* 2006; 66:7395-7400.

57. Katoh M, Words K. Dysregulation of stem cells signaling network due to germline mutations, snp, *Helicobacter pylori* infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer. *Cancer Biol & Therapy* 2007; 6:e1-e8.

58. De Vita V, Hellman S, Rosenberg M. Cancer: Principles and Parctice of Oncology, 5 Ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.

59. Cárdenas J, Sandoval F. Segunda Revisión del Consenso Nacional sobre el diagnóstico y el tratamiento del Cáncer Mamario. Colima, México 2005.
60. Sadikovic B, Haines T.R, Butcher D.T. and Rodenhiser D.I. Chemically induced DNA hypomethylation in breast carcinoma cell detected by the amplification of intermetiload sites. *Breast Cancer Research*. 2004; 6(4):329-336.
61. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Reprod Health Matt* 2008;16:1-11.
62. Ehrlich M. DNA hypomethylation and cancer. In Ehrlich M, ed *DNA alterations in Cancer: Genetic and Epigenetic Changes*. Natick: Bio Techniques Books, Eaton Publishing 2000:273-91.
63. Trinh BN, Long TI, Nickel AE et al. DNA methyltransferase deficiency modifies cancer susceptibility in mice lacking DNA mismatch repair. *Mol Cell Biol* 2002; 22(9):2906-17.
64. Szyf M. DNA methylation and Cancer Therapy. Ehrlich M and Jiang G ed *DNA Hypo-vs Hypermethylation in Cancer*. Academic/Plenum Publishers USA 2003:31-41.
65. Knaul FM, Nigenda G, Lozano R, Arreola-Ornelas H, Langer A, Frenk J. Breast cancer in Mexico: an urgent priority. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 2:S335-S344.
66. Walker MJ and Rapley R. Molecular Biomethods. In Wang P-H et al. *Comparative Genomic Hybridization in clinical and medical Research*. Human Press 2nd Ed. 2008: 213-25.
67. D'Alessio AC. And Szyf M. Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modification and DNA methylation. *Biochem Cell Biol*. 2006, 84:463-76.
68. Prasanth SG, Prasanth KV, Stillman B. Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science*. 2002;297:1026–1031.
69. Jin S, Tong T, Fan W, Fan F, Antinore MJ, et al. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene*. 2002;21:8696–8704.
70. Gavin EJ, Song B, Wang Y, Xi Y, Ju J. Reduction of Orc6 expression sensitizes human colon cancer cells to 5-fluorouracil and cisplatin. *PLoS ONE*. 2008; 3(12): e4054.

71. Yang, R.-Z.; Blaileanu, G.; Hansen, B. C.; Shuldiner, A. R.; Gong, D.-W. :cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. *Genomics* 79: 445-450, 2002.
72. Aagaard-Tillery KM, Grove K, Bishop J, Ke X, Fu Q, McKnight R, Lane RH. Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J Mol Endocrinol*. 2008 Aug;41(2):91-102.
73. Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., and Wang, L. The diversity of the DNAJ/HSP40 family, the crucial partners for HSP70 chaperones, *Cell Mol. Life Sci*. 2006. 63, 2560-2570.
74. Hageman J*, Vos MJ*, Carra S, and Kampinga HH. Structural and Functional Diversities between Members of the Human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ Chaperone Families. *Biochemistry*. 2008 Jul 8;47(27):7001-11.
75. Mitra A., Shvde L.A., Samant RJ. Multi-faced role of HSP40 in cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2009. 26:559-567.
76. Mizejewski GJ. Role of Integrins in Cancer: Survey of Expression Patterns. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1999. 222:124-138.
77. Berry MG, Gui GP, Wells CA, Carpenter R. Integrin expression and survival in human breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2004 Jun;30(5):484-9.