



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

TESIS DE LICENCIATURA

Perfil de metilación de la región promotora de *BRCA1* y *BRCA2* en muestras de sangre periférica de pacientes mexicanas con síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

Rojas Reyes Pablo Antonio

Directora de Tesis:

Q.F.B. Ontiveros Fragoso Verónica Zoraya

Asesora Interna:

Dra. García Rodríguez Ma. De Lourdes



México, Distrito Federal, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue elaborado en la Unidad de Genómica y Secuenciación Masiva (UGESEM), perteneciente al Instituto Nacional de Cancerología (INCan), bajo la dirección de la Q.F.B. Ontiveros Fragoso Verónica Zoraya y contó con el amable asesoramiento de la Dra. García Rodríguez Ma. De Lourdes del Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética (UNIGEN) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Abreviaturas

5mC	5 metil-citosina
ATM	Gen ataxia telangiectasia mutado
BRCA1	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 1
BRCA2	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 2
CHEK2	Gen <i>checkpoint</i> quinasa 2
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Endonucleasa I
DNMT	DNA metil transferasa
dNTP	Deoxinucleotido
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
HSO₃⁻	Bisulfito o ácido sulfito
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
MBP	Proteína de unión a metilos
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MLH1	Gen mutL Homólogo 1
mRNA	micro RNA
MS-HRM	Análisis de alta resolución de fusión sensible a la metilación
ng	nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
TF	Factor de transcripción
Tm	Temperatura <i>melting</i>

Índice

Resumen

Marco teórico

Epigenética

 Metilación del DNA

 DNA-metiltransferaras

 Inhibición transcripcional mediada por la metilación

 Cromatina y el código de histonas

Epigenética del cáncer

El cáncer como un problema de salud publica

Cáncer de mama

 Cáncer de mama esporádico y hereditario

 BRCA1 y BRCA2

 Estructura y funcionamiento

 Metilación de la región promotora de BRCA1 y BRCA2

Justificación

Objetivos

Materiales y métodos

Resultados

Conclusiones

Bibliografía

Resumen

En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó al cáncer de mama como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, 8.2 millones de decesos alrededor del mundo (GLOBOCAN, 2012). De estos, aproximadamente el 10% de los casos se atribuyen a componentes hereditarios. En este caso, las mujeres poseen un cuadro clínico particular conocido como síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario en donde el riesgo por desarrollar cáncer de mama en edades premenopáusicas alcanza hasta el 80%. A la fecha se ha señalado, principalmente, que mutaciones en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama, *BRCA1* y *BRCA2* son una causa en el desarrollo de este síndrome. Sin embargo, solamente el 25% de los casos de síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario pueden ser explicados por mutaciones en la línea germinales de los *BRCA1* o *BRCA2*.

En la última década, eventos epigenéticos de hipermetilación se han asociado con la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama como un evento paralelo a las mutaciones hereditarias, aunque no se ha podido determinar si estos cambios epigenéticos en *BRCA1* o *BRCA2* pueden ser heredados, varios estudios han buscado las relaciones entre estos dos eventos. Más recientemente se comenzó a estudiar la metilación en otros tejidos distantes al tumor como es la sangre periférica. Los distintos resultados tienen gran variabilidad pero poco a poco han contribuido a entender la relación entre la metilación y el cáncer de mama.

En este trabajo se analizó el perfil de metilación de los genes *BRCA*'s en pacientes mexicanas con síndrome de cáncer de mamá-ovario hereditario y en un grupo control de mujeres premenopáusicas sanas. Los resultados mostraron un nivel de metilación muy bajo en el grupo control que rebasó el 1%. En cambio, el gen *BRCA1* mostró distintos niveles de metilación desde 0.1 hasta el 10% y el gen *BRCA2* tuvo un nivel de metilación muy similar al grupo control. Estos resultados no son concluyentes en cuanto a la relación del cáncer de mama con la hipermetilación, sin embargo, resulta bastante interesante el amplio rango de metilación que puede poseer *BRCA1* en estos pacientes.

Marco teórico

Durante muchas décadas se atribuyó como principal causa al desarrollo de todos los tipos de cáncer a las mutaciones que sufre la secuencia del DNA en proto-oncogenes y genes supresores de tumores. En las última década, junto con las mutaciones, cambios en los perfiles epigenéticos han demostrado actuar de manera coordinada en la carcinogénesis. Este mecanismo dual había sido observado décadas antes mientras se desarrollaban los primeros estudios moleculares del cáncer, pero debido a que las mutaciones explicaban como un conjunto de genes se relacionaban de forma directa en la formación de un tumor, las investigaciones sobre los cambios epigenéticos fueron dejadas de lado. (A. Jones y Baylin B., 2007) El creciente reconocimiento en la importancia de los cambios epigenéticos en la patogénesis del cáncer ha llevado a un cambio en los enfoques que se utilizan para descubrir los genes que se ven afectados por este proceso y enfocar estos conocimientos en el desarrollo de nuevos, confiables y efectivos métodos de diagnóstico y tratamiento. (Baylin S. and Joyce E. Ohm, 2006).

Epigenética

Los cambios epigenéticos pueden ser definidos como alteraciones moleculares estables en el fenotipo celular que pueden ser heredadas durante las divisiones somáticas (y en algunas ocasiones a través de la línea germinal), que no ocasionan cambios en la secuencia del DNA (Jovana y Jo, 2010). Las modificaciones epigenéticas son parte de una serie de mecanismos que determinan la expresión del genoma, entre estos se encuentran, las más de 100 modificación pos-traduccionales de las histonas, la metilación del DNA, la impronta genómica, alteraciones de la cromatina, miRNAs reguladores, la reorganización de los nucleosomas, etc. (Bird A., 2002).

Metilación del DNA

El fenómeno epigenético más estudiado es la metilación del DNA, que es un proceso post-replicativo, es decir, que sucede después de que el DNA se ha replicado, que ocurre en su mayoría, en pequeñas secuencias del DNA (Bird A.,

2002). En los seres humanos y otros mamíferos, esta modificación se impone sólo en las citosinas que preceden a una guanina en la secuencia de ADN, *el dinucleótido CpG*. (James G. y Baylin B., 2003). La distribución en el genoma de los dinucleótidos CpG en las que se produce la metilación del ADN suele concentrarse en sitios específicos a lo largo del genoma. En contraste con la relativa escasez de CpGs en el genoma, estos dinucleótidos están agrupados en pequeños tramos de ADN denominados *islas CpG*. Estas regiones son cortas secuencias de DNA (aproximadamente 200 pares de bases) con un alto contenido de guaninas y citosinas que en su mayoría están asociadas con cortas secuencias que se encuentran en el extremo 5' terminal de aproximadamente el 60% de todos los genes en mamíferos. Estas cortas secuencias son conocidas como promotores, sitios donde la transcripción de ADN en ARN comienza mediante el montaje de la maquinaria transcripcional (Bird, 2002). La importancia y participación de estas regiones en la expresión génica será descrita más adelante. En la mayor parte del genoma, aproximadamente el 80% de los dinucleótidos CpG que no están asociados con las islas CpG están fuertemente metilados. Por otro lado, los dinucleótidos CpG que se asociación con los promotores de genes necesitan expresarse a lo largo de la vida de un individuo sano por lo que no están metilados, permitiendo así su expresión (Bird, 2002).

Durante la embriogénesis en los mamíferos, los patrones de metilación son establecidos y mantenidos por mecanismos que copian estos patrones durante la división celular. La metilación del DNA puede mantener gran cantidad de DNA no codificante en las células de organismos superiores en un estado transcripcionalmente inerte. De hecho, la mayor parte de la metilación en el ADN humano se produce en una gran porción del ADN en donde los genes no se transcriben (DNA no codificante). Este DNA fuertemente metilado se replica más tarde que el DNA no metilado, lo que significa que la metilación ayuda a asegurar la replicación tardía de la mayor parte del genoma (Allis, Reinberg, & Jenuwein, 2007). La replicación tardía se asocia con la formación de la cromatina inactiva, lo que facilita el silenciamiento transcripcional de las regiones no codificantes. Este proceso ayuda a prevenir la transcripción de grandes partes del genoma

que consisten en elementos de repetición (múltiplos de pequeños tramos de nucleótidos), secuencias virales insertadas, y transposones (secuencias de ADN que se mueven de su ubicación habitual en una nueva región del genoma). La transcripción de estos elementos podría dañar las células modificando vías esenciales para el funcionamiento celular (James G., B. Baylin, 2003).

DNA-metiltransferasas

El mecanismo de metilación ha sido descrito ampliamente en bacterias, donde la metiltransferasa 5mC (MTase) se une de manera covalente a la cadena de DNA, expone el nucleótido diana, de manera que sobresalga fuera de la doble hélice, luego, propicia el ataque covalente al nucleófilo Cys conservado en el carbono 6 de la citosina de manera que puede transferir un grupo metilo, proveniente de la S-adenosil metionina, al carbono activado 5 de la citosina; por último la enzima se libera de la cadena de DNA.

En los mamíferos, enzimas llamadas ADN metiltransferasas (DNMTs) agregan un grupo metilo, utilizando a S-adenosil-metionina como donante de metilo, al anillo de citosina para formar 5-metil-citosina. Al compararse con el proceso de metilación en bacterias puede observarse que resulta en un mecanismo conservado evolutivamente. (Fernandez FA., Huidobro C., Fraga MF., 2012). Las DNMTs humanas incluyen cuatro miembros en dos familias que son estructural y funcionalmente distintas (Figura 1). La familia Dnmt3 establece el patrón inicial de metilación en los dinucleótidos CpG, incluye a Dnmt3a, Dnmt3b y un factor de regulación llamado Dnmt3L. La Dnmt1 se encarga de mantener este patrón de metilación durante la replicación y la reparación del DNA. La Dnmt2 no es un metiltransferasa del DNA, en realidad metila la citosina 38 en el bucle anticodón del tRNA^{asp} (Cheng X., Bluementhal RM., 2008).

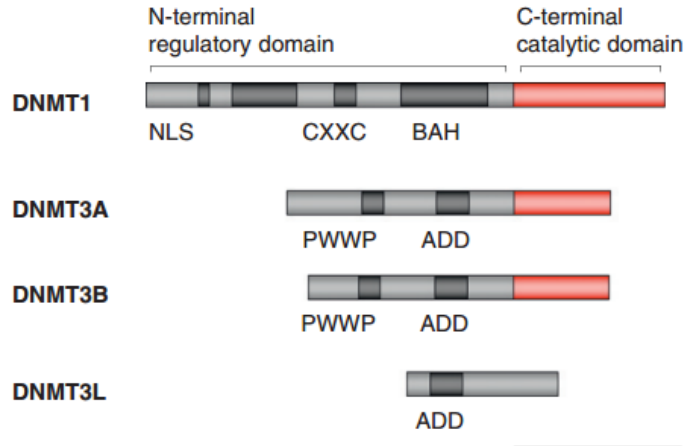


Figura 1. **Representación esquemática de las proteínas mamíferas DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L.** Abreviaciones: ADD: dominio de interacción de histonas; BAH: dominio de homología bromo adyacente.; CXXC: dominio que contiene un motivo de unión a Zn^{2+} rico en cisteínas; NLS: señal de localización nuclear; PWWP: dominio con un dominio altamente conservado prolina-triptófano-triptófano-prolina. Tomada de Fernandez FA., Huidobro C., Fraga MF., 2012.

Inhibición transcripcional mediada por la metilación

La importancia de la metilación en el ADN para la expresión génica, y en especial para el silenciamiento transcripcional (inhibición de la transcripción), se puede observar en regiones promotoras donde la metilación de las islas CpG es necesaria para el desarrollo sano de un organismo. Ejemplos importantes de estas islas CpG metiladas plenamente asociadas a muchos genes transcripcionalmente silentes están en el cromosoma X inactivo de las hembras y los alelos silenciados en la impronta genómica, que durante el desarrollo embrionario se determina que sólo un alelo del gen se exprese en los tejidos normales (Antequera y Bird, 1993) (Bird A., 2002).

El cómo la metilación del DNA está relacionada con el silenciamiento génico necesita observarse desde varios puntos (Figura 2). En primer lugar la metilación del DNA en las secuencias de unión de algunos factores de transcripción puede resultar en la inhibición de la unión al DNA. Al bloquear sitios de unión específicos, la metilación del DNA inhibe directamente la activación transcripcional (Figura 2, a). Aunque el primer mecanismo podría pensarse como el más común, es en realidad la unión de proteínas de unión a CpG-metilados (MPBs) que al reconocer directamente el DNA metilado reclutan moléculas co-represoras para

silenciar la transcripción y modificar la estructura de la cromatina (Figura 2, b). Además de sus actividades metiltransferasa de ADN, enzimas Dnmt también están vinculadas físicamente a histona metiltransferasa (HMT) las actividades de la histona desacetilasa (HDAC) y en este caso, la adición de grupos metilo al DNA está acoplada a la represión transcripcional y la modificación de la cromatina (Figura 2, c). Por último la metilación del ADN y la unión de MBP's en el cuerpo de genes también pueden tener un efecto moderador sobre la elongación de la transcripción estando implicados en la inhibición de la elongación, ya sea directamente o por sus efectos sobre la estructura de la cromatina circundante (Klose y Bird, 2006). Este vínculo con el ensamblaje de la cromatina es el objetivo de la investigación sobre la metilación del promotor y el silenciamiento de genes. Pero, ¿cómo el ensamblaje de la cromatina contribuye al estado funcional de un gen, que puede ser activado o silenciado?

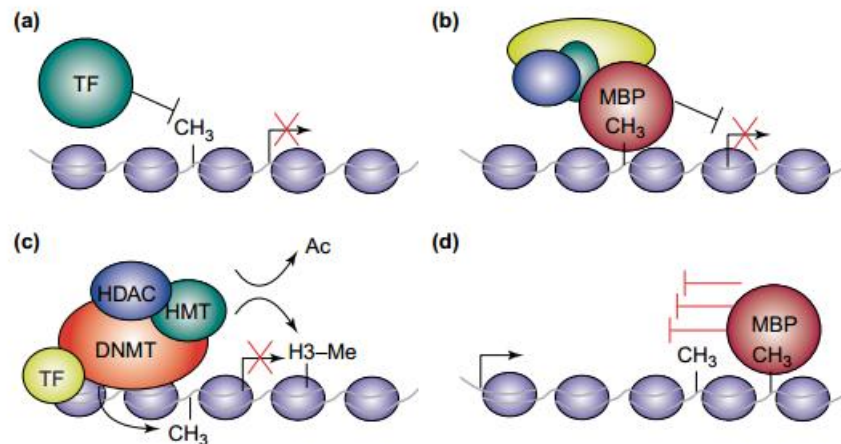


Figura 2. **Mecanismos de la represión mediada por la metilación del ADN.** (a) la metilación del ADN inhibe la unión de factores de transcripción (TF); (b) proteínas de unión a CpG-metilados (MPBs) silencian la transcripción y modifican la cromatina; (c) enzimas Dnmt reclutan histonas metiltransferasas (HMT) y median las actividades de la histona desacetilasa (HDAC); (d) la metilación del ADN en el cuerpo de genes también puede tener un efecto moderador sobre la elongación de la transcripción (Klose y Bird, 2006).

Cromatina y el código de histonas

Asociados con la metilación del DNA se encuentran modificaciones de la cola de histonas, un mecanismo que modula la estructura de la cromatina para regular la expresión de los genes. Además se ha observado que algunos mecanismos que regulan la organización de los nucleosomas están involucrados en la regulación de la metilación del DNA y la modificación de histonas (Li B., Carey M., Workman JL., 2007).

Cada cromosoma está formado por una larga molécula de DNA asociada a moléculas que pliegan y empaquetan la fina hebra de DNA formando una estructura más compacta. Tradicionalmente las proteínas que se unen al DNA de los cromosomas eucariontes se clasifican en dos grupos: las histonas y las proteínas cromosómicas no-histonas.

Las proteínas histonas son responsables del primer y más básico nivel de empaquetamiento de genoma, el nucleosoma, un complejo proteína-DNA descubierto en 1974. Cuando los núcleos interfásicos se fragmentan suavemente y se examina su contenido al microscopio electrónico, la mayor parte de la cromatina se encuentra formando una fibra de un diámetro aproximado de 30 nm. Si esta cromatina se somete a tratamientos que la desenrolle, es posible verla al microscopio electrónico como una serie de "cuentas de collar". El collar es el DNA y cada una de las cuentas es el "núcleo de una partícula nucleosomal" que está formado por DNA que envuelve el núcleo de proteínas formado por histonas (Alberts B, 2008).

Cada nucleosoma está formado por un conjunto de ocho proteínas histonas, dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4- y un DNA de doble cadena de 146 pares de bases. El octámero de histonas forma un núcleo de proteínas alrededor del cual se enrolla el DNA. Cada nucleosoma está separado del siguiente por una región de DNA puente o espaciador, de una longitud que varía de unos pocos hasta más de 80 pares de nucleótidos (Figura) (Alberts B., 2008).

Los nucleosomas, estructuras compuestas de un núcleo de proteínas histonas en torno al DNA, están estrechamente vinculados a la constitución de la cromatina. Normalmente, en los sitios de los genes activos con islas CpG no metilados en regiones promotoras, los nucleosomas están ampliamente espaciados irregularmente y de una manera favorable para el acceso de las proteínas que activan la transcripción. En contraste, cuando las islas CpG en regiones promotoras están fuertemente metilados, los nucleosomas están

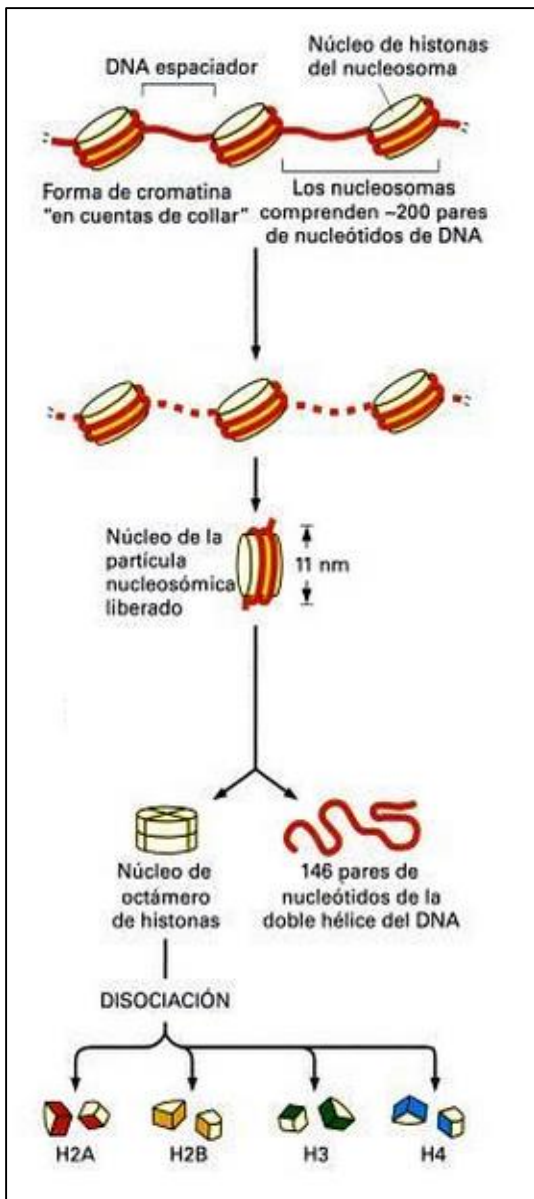


Figura 3. **Nucleosomas y proteínas histonas.** (B. Alberts, 2008)

fuertemente compactada y regularmente espaciados. Esta configuración excluye proteínas que activan la transcripción de genes o les impide actuar como activadores de genes. (Baylin S. and Joyce E. Ohm, 2006).

Otra característica de regulación de los nucleosomas está contenida en ciertos residuos de aminoácidos de las colas de las histonas. Estas colas sobresalen de las histonas y se mantienen en un estado acetilado en el caso de los genes transcritos pero en un estado desacetilado, como es el caso de genes silenciados e hipermetilados. Las histonas desacetilasas actúan para mantener el estado desacetilada en estas colas de las histonas y pueden ser dirigidos a las regiones genómicas apropiadas por DNMTs y por un grupo de proteínas de la cromatina conocidas como proteínas de unión citosina-metilo. Estas proteínas de unión de citosina-metilo reconocen ADN metilado y pueden ellos mismos reprimir la

transcripción de genes. Ellos también residen en complejos con otras proteínas, incluyendo las histonas desacetilasas, y por lo tanto pueden dirigir estas proteínas a las regiones de silenciamiento génico (Li B., Carey M., Workman JL., 2007).

Las histonas centrales que conforman el nucleosoma están sujetos a más de 100 modificaciones postraduccionales diferentes, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. Estas se producen principalmente en las posiciones específicas amino-terminal dentro de las colas de las histonas. En los últimos años ha experimentado un considerable progreso en la comprensión de la acetilación y la metilación de la lisina. Considerando que la acetilación de la lisina casi siempre se correlaciona con la accesibilidad de la cromatina y la actividad transcripcional, la metilación de la lisina puede tener efectos diferentes dependiendo de qué residuo se modifica (Figura). La metilación de la histona H3 lisina 4 (H3K4) y H3 lisina 36 se asocia con la cromatina transcrita. En contraste, la metilación de H3 lisina 9 (H3K9), H3 lisina 27 (H3K27), y lisina H4 20 (H4K20) generalmente se correlaciona con la represión. Modificaciones de las histonas pueden influir distintos entre sí y también pueden interactuar con la metilación del ADN, en parte a través de las actividades de los complejos de proteínas que se unen a las histonas modificadas o citosinas metiladas (Bernstein, BE; Meissner, A; Lander, SE, 2007).

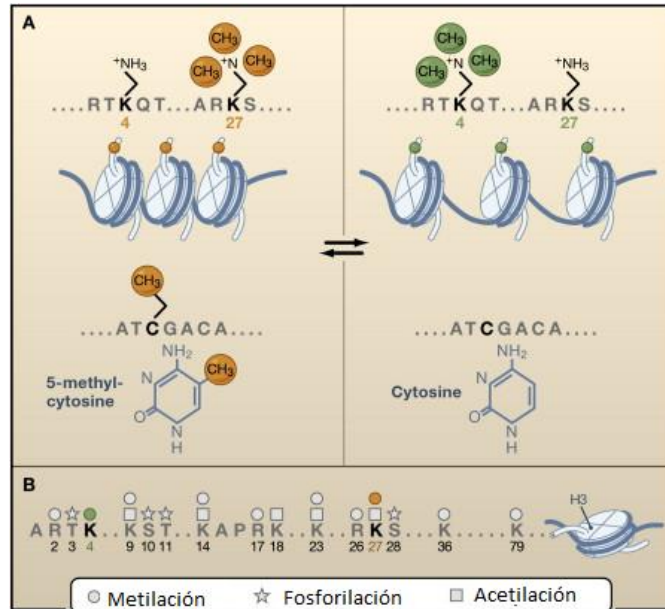


Figura. (A) ilustra las estructuras y los efectos de la metilación de la citosina (represivo / naranja) y dos marcas de las histonas: H3K27 metilación (represivo / naranja) y la metilación H3K4 (activo / verde). (B) ilustra la diversidad de las modificaciones de las histonas H3. (Tomado de Bernstein, BE; Meissner, A; Lander, SE, 2007).

Epigenética del cáncer

Como se mencionó al inicio de este trabajo, aumentos en los niveles de metilación en el DNA mejor conocido como hipermetilación del DNA, se ha asociado con la inhibición transcripcional de los genes y la compactación de la cromatina, suceso que comúnmente afecta a genes supresores de tumores. De manera inversa, la hipometilación está asociada con la reactivación de genes y la inestabilidad cromosomal que pueden conducir a la expresión de proto-oncogenes y un aumento en la tasa de recombinación y mutaciones (Baylin y Ohm, 2006; Esteller, 2007).

Clásicamente, el cáncer ha sido estudiado a partir de las mutaciones producidas en los oncogenes y genes supresores de tumores y la desregulación que estas mutaciones ejercen sobre, la diferenciación, supervivencia, ciclo celular y apoptosis. En los últimos 20 años, las investigaciones en el campo de la epigenética han demostrado que la expresión génica debida epimutaciones juega un papel importante en la aparición y desarrollo del cáncer junto con las

mutaciones. (Baylin S. and Joyce E. Ohm, 2006). Tanto de casos de cáncer esporádico y hereditario, la metilación de las islas CpG en las regiones promotoras de genes es un mecanismo para la inactivación de genes supresores de tumores, además de las mutaciones. Determinar la importancia de los niveles de metilación en genoma del cáncer ha sido una tarea confusa, ya que prácticamente todos los tipos de cáncer estudiados tienen tanto la pérdida de metilación en regiones pobres en dinucleótidos CpG que deben estar metilados y las ganancias en la metilación de islas CpG en regiones promotoras de genes, hipermetilación (Esteller M., 2007).

Metilación en oncogenes y genes supresores de tumores

Hay una diferencia fundamental entre las mutaciones génicas y el silenciamiento epigenético: los primeros son irreversibles y los segundos son potencialmente reversibles. Los cambios epigenéticos potencialmente reversibles en neoplasias presentan nuevas oportunidades para el manejo clínico de cáncer. La realización de estas posibilidades requiere el desarrollo de estrategias para revertir el silenciamiento de genes para los fines de la prevención y el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Por otra parte, los cambios moleculares asociados con el silenciamiento de genes pueden servir como marcadores para la evaluación de riesgos, el diagnóstico y en la medición del pronóstico. (James G., H., B. Baylin, S., 2003).

La interrupción de la función de un gen supresor de tumores, tal como se define por la teoría de “dos hits” de Knudson, requiere una pérdida completa de la función de ambas copias del gen implicado (Knudson , 2001)

Un ejemplo de cómo las mutaciones somáticas participan de manera paralela con modificaciones epigenéticas en el cáncer, se observan en la línea celular de cáncer de colon humano, HCT116. Estas células contienen varias mutaciones que inactivan genes supresores de tumores y/o activan oncogenes, lo que resulta en la interrupción de vías de señalización y funciones celulares clave (Toyota, M. et al. , 1999). Estas mutaciones están presentes en sólo uno de los alelos de los

genes supresores de tumores como el que codifica la proteína de reparación de errores durante la duplicación del ADN, *MLH1*, el cual se encuentra mutado en pacientes con síndrome de Lynch, lo que aumenta la posibilidad de desarrollar cáncer de colon hereditario (Hitchins M, 2005); la proteína reguladora del ciclo celular p16 (Myohanen, Baylin, & Herman, 1998); el gen que codifica el receptor del factor de crecimiento transformante- β II (*TGF β 2R*) (Parsons, R. et al, 1995); además una mutación activadora en el gen que codifica a β -catenina, que se traduce en la señalización constitutiva de Wnt y la proliferación celular (Morin, P. J. et al, 1997). Además de estas mutaciones específicas, hay al menos 14 genes silenciados epigenéticamente en estas células todos los cuales pueden ser reactivados ya sea por el tratamiento con agentes desmetilantes o con la interrupción de los genes que codifican metiltransferasas de DNA (Bachman, Herman, & Corn, 1999). La reactivación de la expresión de estos genes de control del crecimiento resulta en cambios fenotípicos que afectan la reducción de la proliferación para inducir la senescencia o la apoptosis.

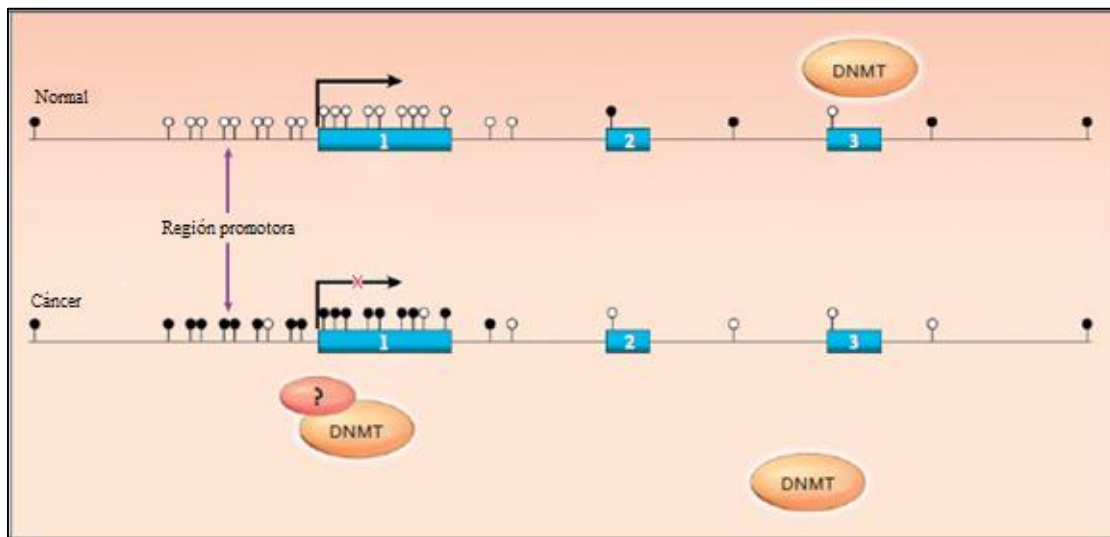


Figura. Metilación de la región promotora de los genes en vertebrados. DNMT: DNA metil transferasas. Modificado de (James G., H., B. Baylin, S., 2003).

Eventos donde se desataca la colaboración entre anomalías genéticas y epigenéticas se produce en los genes *MLH1* y *CDKN2A* (el gen que codifica p16) en células HCT116. Mientras que un alelo de cada uno de estos genes está mutado en estas células, el alelo de tipo salvaje se mantiene silenciado por la

hipermetilación de su región promotora (Hitchins M, 2005). Estudios en pacientes con cáncer colorrectal demostraron un estado de metilación constitucional del gen *MLH1*, en estos pacientes los tumores tenían un fenotipo característico al de los individuos con Síndrome de Lynch y mutaciones germinales del gen *MLH1*. (Gazzoli, Loda M, 2002). Por otra parte, del mismo modo a las mutaciones en el gen *VHL*, fundamental para la patogénesis del cáncer renal que se presenta en el 60% de los tumores esporádicos, la hipermetilación de *VHL*, reportada en aproximadamente el 20% de los casos, se ha asociado a la predisposición del cáncer renal (Jones P., Baylin S., 2002).

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en las mujeres tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. La incidencia de cáncer de mama está aumentando en el mundo en desarrollo debido a la mayor esperanza de vida, el aumento de la urbanización y la adopción de modos de vida occidentales. Aun hoy en día, las estrategias de prevención no pueden eliminar la mayoría de los casos de cáncer de mama que se dan en los países de ingresos bajos y medios, donde el diagnóstico del problema se hace en fases muy avanzadas. (OMS, 2012)

Las estrategias de detección precoz recomendadas para los países de ingresos bajos y medios son el conocimiento de los primeros signos y síntomas, y el cribado basado en la exploración clínica de las mamas en zonas de demostración. El cribado mediante mamografía es muy costoso y se recomienda para los países que cuentan con una buena infraestructura sanitaria y pueden costear un programa a largo plazo.

BRCA1* y *BRCA2

En el cáncer de mama, los estudios se han enfocado a los genes de susceptibilidad de cáncer de mama, *BRCA1* y *BRCA2*. Estos son genes supresores de tumores cuyos fenotipos mutantes están altamente relacionados con la predisposición al cáncer de mama y ovario principalmente, aunque

también se han relacionado con el cáncer de trompas de Falopio, peritoneo en mujeres y cáncer mama, páncreas y próstata en varones. (Yoshida, Yoshio, 2004). Las mujeres con mutaciones de *BRCA1* tienen riesgo entre el 60 y 80% de desarrollar cáncer de mama y ovario. Así mismo, las mujeres con mutaciones en *BRCA2* tienen un riesgo de desarrollar cáncer de mama entre el 60 y 80%, y entre un 10 y 20% de cáncer de ovario (Vidal, 2008).

BRCA1 se encuentra en el cromosoma 17q21, fue aislado en 1994 por Miki *et. al.*, está compuesto por 22 exones codificantes distribuidos en cerca de 100 kb de DNA. Este gen codifica una proteína de 1863 aminoácidos. Un año después del aislamiento de *BRCA1* un segundo gen de predisposición al cáncer de mama (*BRCA2*) fue identificado en el cromosoma 13q126. *BRCA2* codifica una proteína de 3350 aminoácidos y está conformado por 26 exones codificantes (Wooster *et. al.*, 1995).

La participación en la reparación del DNA y la regulación de la transcripción en respuesta al daño al DNA se determinó tras la observación de la fosforilación de múltiples residuos de la proteína *BRCA1* (Ser 1387, Ser1457, Ser988, Ser1423 y Ser1524) por distintas proteínas cinasas (ATM, ATR y CHK2) en respuesta a radiación ionizante y ultravioleta (Yoshida, Yoshio, 2004). Subsecuentes estudios demostraron que *BRCA1* forma complejos *BRCA2*, y Rad51, la proteína humana homóloga a RecA de *E. coli*, que activan la reparación de ruptura de doble cadena por recombinación homóloga. Otros estudios han demostrado la relación de *BRCA1* con la proteína Rad50 y proteínas asociadas a la respuesta del daño al DNA, MRE11 y NBS1 (Figura) (Yoshida, Yoshio, 2004).

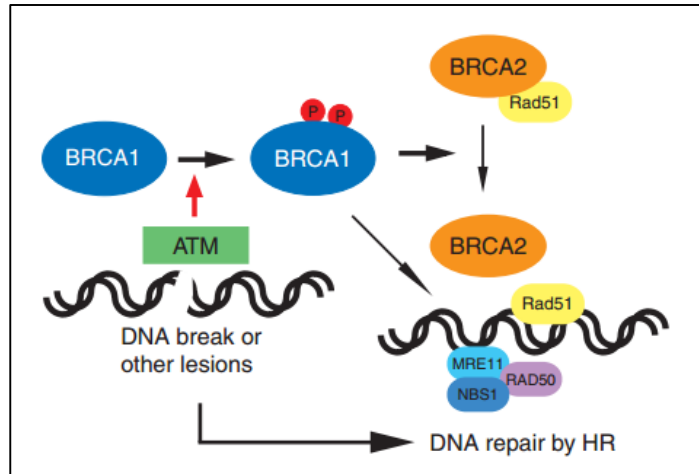


Figura. Participación de *BRCA1* y *BRCA2* en la reparación de ruptura de doble cadena por recombinación homóloga. Tomado de Yoshida, Yoshio, 2004.

Metilación de la región promotora de *BRCA1* y *BRCA2*

Mancini *et. al.*, fueron los primeros en asociar la hipermetilación de uno de los alelos de *BRCA1* con la pérdida de la función del gen en carcinoma mamario esporádico. Un grupo de investigación independiente confirmó un año posterior al trabajo de Mancini, la relación entre la hipermetilación del gen *BRCA1* con el cáncer de mama y ovario, además relacionó la hipermetilación de este gen con un fenotipo tumoral negativo para los receptores de estrógeno y progesterona (Catteau, Harris, & Solomon, 1999). En cambio, el estado de metilación del gen *BRCA2* no ha mostrado diferencias entre tejidos normales de individuos y casos de cáncer de mama esporádicos (Collins, Wooste, & Stratton, 1997) (Bosviel R, *et. al.*, 2012). Solamente Wei *et. al.*, han reportado la metilación de ambos alelos en casos esporádicos de cáncer de mama.

Otro estudio ha reportado la hipermetilación de *BRCA1* en tumores negativos a mutaciones y lo propone como un mecanismo de pérdida de función de este gen, además reportó la metilación de uno alelos de *BRCA1* en muestras positivas a mutaciones lo que sugiere a la hipermetilación como el segundo hit para la pérdida de la función del gen (Tapia & cols., 2008). Sin embargo, los resultados presentados en todas estas publicaciones son muy variados y los resultados no han sido completamente concluyentes.

En el 2007 un grupo de investigación buscaba encontrar por técnicas de inmunohistoquímica distintos genes posiblemente relacionados con el desarrollo de cáncer de mama en 50 muestras de tumores negativas para mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* (tumores no *BRCAs*), se observó que 21 de estos 50 tumores presentaban hipermetilación de *BRCA1* y fue posible estudiar la metilación de este gen en 19 muestras de sangre periférica; los resultados mostraron que 7 de estas muestras de sangre (37%), presentaban hipermetilación de la región promotora de *BRCA1* (Honrado *et. al.*, 2007). Un año después, otro grupo de investigación propuso que la hipermetilación de *BRCA1* podría conducir al desarrollo de cáncer de mama con tumores que mostraban un fenotipo típico *BRCA1*. Su estudio fue desarrollado en siete pacientes con cáncer de mama sin mutaciones en *BRCA1* detectables, tres de estos pacientes presentaron algún grado de hipermetilación en *BRCA1* (uno con 10% y dos con 1%) y sus tumores respectivos mostraban fuertemente metilado a este gen. Aunque en sus conclusiones ellos aseguraban mostrar una relación entre la hipermetilación de *BRCA1* y un fenotipo relacionado con los tumores (Snell, Krypuy *et. al.*, 2008), el pequeño grupo de estudio y el bajo nivel de metilación encontrado es un motivo por el cual este resultado debía ser aceptado con reservas (Gupta *et. al.*, 2014). Los dos estudios anteriores, suponían que la hipermetilación de *BRCA1* podía, de manera análoga a una mutación, inactivar un alelo del gen ya sea como un evento de primer o segundo “*hit*” según el modelo de Knudson aunque ninguno ofrecía pruebas contundentes sobre esto.

Los estudios posteriores tenían como objetivo encontrar una relación directa entre la metilación de *BRCA1* y un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama en distintos grupos de poblaciones de estudio. Uno de estos estudios consistió en analizar en 7 mujeres con cáncer de mama esporádico diagnosticado antes de los 40 años el perfil de metilación de *BRCA1* en sangre y 73 muestras de tumor de estas mujeres. En este estudio se encontró hipermetilación de *BRCA1* en 13 de las 73 muestras (27.3%) y de 2 muestras de sangre de estas pacientes (28.5%). Se incluyeron 73 muestras de sangre periférica como grupo control y 8 de ellas (10%) presentaron algún nivel de hipermetilación. De manera

interesante, se observó que no había diferencias significativas entre la metilación de *BRCA1* en sangre de las mujeres de estudio y el grupo control. Pese a esto, los autores indican que la hipermetilación del gen *BRCA1* puede conducir al desarrollo de cáncer de mama (Al-Moggharabi, Al-Qasem y ABoussekhra, 2011).

El mismo año en Australia, se comprobó que existía una relación entre el estado hipermetilado de *BRCA1* y el fenotipo típico de los tumores que acarrean mutaciones, somáticas o germinales, en este gen (Wong *et. al.*, 2011). Para esto se seleccionaron 255 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama antes de los 40 años y que no tenían mutaciones en *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *ATM* y *PALB2* detectables. Se dividieron en tres grupos según su fenotipo tumoral (Tabla), el primer grupo (52 pacientes) presentaban 5 de las 9 características fenotípicas de los tumores *BRCA1*, el segundo 4 (39 pacientes) y el tercero 3 (164 pacientes).

En el grupo 1 el 36% de los individuos presentaban niveles altos de hipermetilación, el segundo y el tercero, 10 y 5%, respectivamente. Además, en los tumores respectivos del grupo 1 el gen *BRCA1* se encontraba fuertemente metilado. El grupo 3 no tenía una diferencia significativa con el grupo control utilizado. En conclusión, un fuerte estado de metilación podía conducir al desarrollo de cáncer de mama y los tumores resultantes exhibían un fenotipo similar al de los tumores con mutaciones en el gen *BRCA1*. Lo anterior es una prueba certera de que el silenciamiento transcripcional de *BRCA1* por la metilación de su promotor tenía alguna relación directa con la etiología del cáncer de mama. Aunque es necesario recalcar que los sujetos de estudio utilizados no tuvieron una selección inicial sobre el fenotipo histológico, subtipos moleculares, historia familiar, etc., por lo que no se podía asociar este resultado con alguna población específica de casos de cáncer de mama.

Características clínicas de los tumores *BRCA1* (Wong *et. al.*, 2011).

Índice mitótico alto

Grado nuclear maligno

Poca o nula formación de túbulos

Patrón de crecimiento trabecular (primario o secundario)

Patrón de crecimiento sincitial

Márgenes de empuje prominentes alrededor del tumor (> 50%)

Márgenes circunscritos

Necrosis

Moderado o intenso infiltrado linfocitario

De manera contradictoria a lo encontrado por Wong *et. al.*, ese mismo año otro estudio analizó el perfil de metilación de *BRCA1*, *APC* y *RASSF1A*. Sus resultados en sangre periférica y muestras de tumor de 25 pacientes con cáncer de mama negativas para mutaciones en estos genes exhibían niveles de metilación muy bajos, 4.5 y 2.7% para *BRCA1* y *APC*, respectivamente, no se observó metilación alguna en el gen *RASSF1A*. A pesar de que en los tumores se observaban una marcada metilación de los genes *BRCA1* y *APC*, las pruebas estadísticas y la opinión de los autores sugerían que no había relación entre la metilación de estos genes y el desarrollo de cáncer de mama y que la metilación observada en sangre era un evento independiente (Wojdacz *et. al.*, 2011). Cabe resaltar que este mismo año Wojdacz y su grupo de trabajo publican un estudio en donde no se encontraba diferencia significativa entre los niveles de metilación en pacientes con cáncer de mama esporádico y grupos control.

El último estudio publicado, hasta la elaboración de este escrito, se enfoca en pacientes con cáncer de mama esporádico con el tipo histológico medular o el subtipo molecular triple negativo, o ambos (Gupta *et. al.*, 2014). A diferencia de

los estudios anteriores, este estudio está dividido en tres grupos. El primero son 30 pacientes con cáncer de mama y con mutaciones germinales en *BRCA1*, el segundo grupo consiste en 36 pacientes sin mutaciones detectadas y por último un grupo control de mujeres no afectadas. En los resultados, ninguna de las pacientes del grupo uno tiene algún nivel detectable de metilación; 15 de las pacientes del grupo 2 tiene algún nivel positivo de hipermetilación y tan sólo dos mujeres del grupo control presentan un nivel detectable de hipermetilación. Los resultados de este estudio arrojan información valiosa sobre la participación de la metilación en *BRCA1* y la evolución del cáncer. La hipermetilación del gen *BRCA1* puede representar el primer “*hit*” para el desarrollo del cáncer pero nunca ser el segundo “*hit*” en pacientes con mutaciones germinales. Aunque sí podría representar el mecanismo de pérdida de la heterocigocidad en pacientes con mutaciones somáticas (Rice *et. al.*, 2000; Baldwin *et. al.*, 2000; Birfisdottir *et. al.*, 2006).

El único estudio relacionado con la metilación de *BRCA2* es de Bosviel, Michard *et. al.*, 2012, en este trabajo se reportan niveles bajos de hipermetilación (<10%) en sangre periférica de pacientes con cáncer de ovario.

Poco se sabe sobre la relación funcional de la metilación del promotor de *BRCA1*, principalmente, o *BRCA2* con la evolución del cáncer o sobre el mecanismo por el cual estos genes son metilados. Recientemente se han propuesto tres posibles hipótesis (que no han sido estudiadas), que podrían explicar esta relación funcional (Gupta *et. al.*, 2014).

1. Los cambios en los patrones de metilación en las células sanguíneas son inducidos por componentes específicos de algunos micronutrientes que producen alteraciones similares en otros tipos de tejidos del individuo.
2. La metilación de un locus específico en las células sanguíneas podría estar reflejar un evento constitutivo y, por lo tanto, está presente en otros tipos de tejido (p. ej. tejido mamario), donde la función del gen alterado aumenta el riesgo de cáncer.

3. La metilación aberrante de las células sanguíneas indica la disfunción de las propiedades fisiológicas de la sangre y por lo tanto, los impactos sobre el riesgo del cáncer.

En su trabajo Gustap *et. al.*, además de exponer estas hipótesis, aclara que debido a la diferencia en el tamaño de los grupos de estudio, las distintas técnicas utilizadas, las pruebas estadísticas y la interpretación de los resultados, existe una gran diferencia en los resultados obtenidos. En un mismo trabajo podemos observar que distintas técnicas ofrecen distintos resultados (Snell, Krypuy *et. al.*, 2008); que los grupos de estudio no están definidos (Wong *et. al.*, 2011), o son muy pequeños (Honrado *et. al.*, 2007). Sumado a esto el desconocimiento sobre los mecanismos moleculares que conllevan a la hipermetilación de *BRCA1* plantea una interrogante sobre la correcta interpretación de los resultados. Sin embargo, la mayoría de los autores señala que la hipermetilación detectable en sangre periférica puede utilizarse como un marcador molecular útil para el diagnóstico temprano de cáncer de mama con la finalidad de poder ofrecer al paciente tratamientos de quimio-prevención, cirugía preventiva o seguimiento.

Justificación

En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó al cáncer como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, 8.2 millones de decesos alrededor del mundo (GLOBOCAN, 2012). La etiología por la que se desarrolla el cáncer de mama es poco conocida pero, aproximadamente un 10% de los casos diagnosticados se asocian a mutaciones en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama, *BRCA1* y *BRCA2*. Aun cuando las mutaciones expliquen un porcentaje de los pacientes con síndrome de cáncer de mama, quedan por establecer las

causas del desarrollo carcinogénico en aquellos en lo que no se detectan mutaciones.

Estudios sobre la hipermetilación de la región promotora de *BRCA1* y *BRCA2* han demostrado, que la predisposición al desarrollo de cáncer de mama es causada por mutaciones en la línea germinal, además también existe alguna asociación del silenciamiento epigenético de los promotores de estos genes. El estudio sobre la metilación de *BRCA1* y *BRCA2* no se ha realizado aún en pacientes mexicanas con síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario así que este trabajo piloto abre la posibilidad de establecer un nuevo método de análisis para estos pacientes y la posibilidad de aportar información sobre la etiología del cáncer de mama en esta población.

Objetivos

Describir el perfil de metilación de *BRCA1* y *BRCA2* en muestras de sangre periférica obtenida de pacientes mexicanas con síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario a través del análisis Methylation-Sensitive High Resolution Melting y compararlo con un grupo de mujeres control pre menopáusicas sin diagnóstico de cáncer de mama.

Objetivos particulares

- Seleccionar DNA purificado a partir de muestras de sangre periférica de un grupo de pacientes negativos para mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*.
- Estandarizar las condiciones del análisis MS-HRM.
- Establecer el perfil de metilación de *BRCA1* y *BRCA2* en un grupo control y en los pacientes del estudio.
- Comparar el grupo control y de pacientes para establecer las diferencias y similitudes entre el perfil de metilación.

Materiales y métodos

Grupo de estudio

Este estudio fue enfocado en pacientes con cáncer de mama negativas para mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* incluidos en el proyecto “Identificación de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* mediante secuenciación masiva en pacientes mexicanos con síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario” del Instituto Nacional de Cancerología. El criterio de inclusión fue la presencia de por lo menos dos de las siguientes características, que sustentaban la sospecha clínica del diagnóstico de síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario:

- Presentación de cáncer de mama a temprana edad (pre-menopausia).
- Dos tumores primarios de mama o cáncer de mama y ovario/tubas uterinas/peritoneo, en una misma paciente.
- Historia familiar de afectadas con dos tumores primarios de mama o cáncer de mama u/y ovario/tubas uterinas/peritoneo, en una misma paciente, en parientes de 1er, 2do o 3er grado en la misma rama (materna o paterna), o de afectados con otros de los tumores relacionados a mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* como cáncer de trompas de Falopio, peritoneo o páncreas.
- Fenotipo tumoral triple negativo en pacientes pre-menopaúsicas.

Además incluimos en el estudio a dos pacientes positivas con mutaciones confirmadas en *BRCA1* (*debo anotar el tipo de mutación que se encontró o en su defecto únicamente el gen BRCA1 o 2 en el que se presenta la mutación*). Por último se incluyó un grupo control conformado por mujeres pre-menopáusicas sin cáncer de mamá u ovario y sin antecedentes de familiares directos afectados con cáncer relacionados con *BRCA1* o *BRCA2*.

Aislamiento de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica en los pacientes y grupo control

En cada paciente de este estudio se tomó una muestra de sangre periférica. Tras la obtención de las muestras se procedió a la purificación de ácidos nucleicos en el MagNA Pure Compact Instrument de Roche utilizando el kit de aislamiento de ácidos nucleicos y siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera resumida el equipo purifica el DNA en tres etapas que incluyen: 1) la lisis de

glóbulos rojos con búfer de lisis y digestión proteica utilizando la Proteinasa K; 2) separación del DNA con el uso de perlas magnéticas que forman complejos que se unen de manera selectiva al DNA y 3) el lavado y elusión del DNA (Figura).

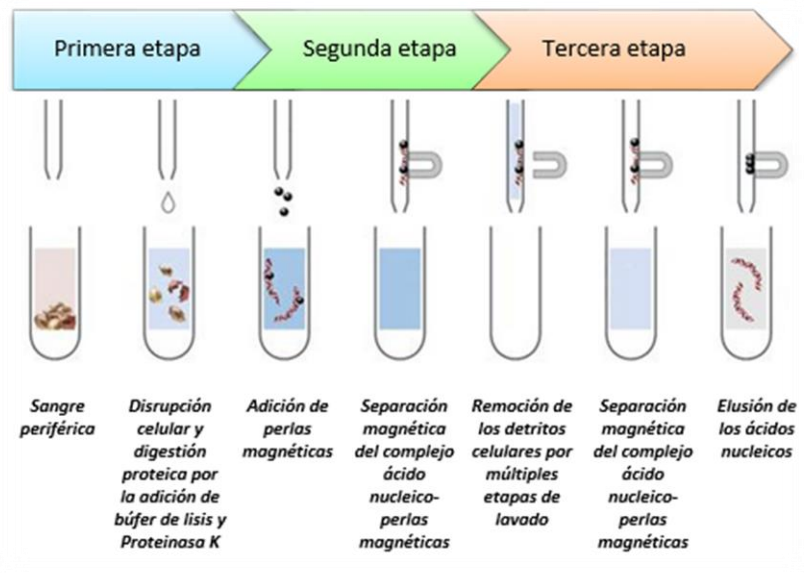


Figura. Purificación automatizada de ácidos nucleicos.

En el caso del grupo control, el DNA fue purificado utilizando el método de extracción por *salting-out* con el protocolo "Aislamiento de DNA mamífero" descrito por Sambrook & Russell. Este método aprovecha el cambio en solubilidad que experimentan las proteínas cuando son sometidas a modificaciones en la concentración salina del medio, en presencia de altas concentraciones de sales, la solubilidad de las proteínas disminuye y terminan por precipitar, este es el fundamento fisicoquímico de la precipitación salina, *salting-out* (Huan-Xiang Zhou, 2005).

Este método necesita de la elaboración previa de un búfer de lisis celular elaborado con 3 reactivos. El primero fue 10 ml de Tris-Cl 0.5 M (pH 8.0) que se preparó disolviendo 60.55 gr de Tris base en 500 ml de H₂O estéril, el pH se ajustó agregando 12 ml de HCl concentrado, después se aforó el volumen a 1 litro. El segundo reactivo fue 1 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0), que fue preparado mezclando

93.05 gr de EDTA y 250 ml de H₂O estéril, el pH se ajustó añadiendo 1.3 ml de HCl concentrado, después se aforó a un volumen de 500 ml y se esterilizó por autoclavado, la concentración final del EDTA fue de 0.5 M. El último reactivo de este búfer fue 2.5 ml de SDS 20% que se preparó disolviendo 100 gr de SDS grado electroforesis en 300 ml de H₂O estéril, se calentó a 68°C, el pH fue ajustado a 7.2 con 20 µl HCl, el SDS resultante fue 20%. Por último se añadió 486.5 ml de H₂O estéril.

Un segundo búfer de lisis de glóbulos rojos se elaboró con 20 ml de Tris-Cl 5M el pH se ajustó a 7.6 con 30 ml de HCL concentrado y el volumen se aforó a un litro. También se elaboró una solución de acetato de potasio con 60ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de H₂O estéril. La solución resultante es 3M con respecto al potasio y 5M con respecto al acetato. Para eluir el DNA se preparó búfer TE, pH 7.6 (Tris-HCl, 10 mM 0.1mM EDTA pH 7.6)

El primer paso consistió en la disrupción de los glóbulos rojos incubando 3 ml de sangre periférica con 10 ml de búfer de lisis de glóbulos rojos por 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación la muestra fue centrifugada a 4 000 g por 10 minutos, el sobrenadante fue desechado y se realizaron 2 lavados posteriores con 5 ml de búfer de lisis de glóbulos rojos con 5 minutos de incubación a 37 °C, con la misma velocidad y tiempo de centrifugación. Cuando el botón de células blancas se observó limpio, se agregaron 3 ml de búfer de lisis celular a 0 °C y se re-suspendió la muestra con varias agitaciones, después se agregaron 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y la muestra se incubó por 20 horas a 55 °C. Terminado el tiempo de incubación se agregaron 1.2 µl de RNAsa libre de DNAsa (10 mg/ml) con el fin de eliminar el RNA de la purificación, la muestra fue incubada a 37 °C por 1 hora. Transcurrida la incubación la precipitación de las proteínas se realizó con 1 ml de solución de acetato de potasio y se mezcló la muestra con un fuerte vortex, inmediatamente la muestra fue centrifugada a 4 °C, 10 000 g por 10 minutos, el sobrenadante con el DNA fue recuperado en un tubo que contenía 10 ml de isopropanol al 100%, se mezcló varias veces por inmersión y fue centrifugado de nuevo a 4 000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y se agregaron

3 ml de etanol al 70% a 4°C, la muestra fue centrifugada a 4 000 g por 10 minutos. Por último el botón de DNA fue re-suspendido en búfer TE 1X (pH 7.6) y para ayudar a la solubilización del DNA la muestra fue incubada a 65 °C por 1 hora.

Cuantificación y pureza del DNA extraído

Después de la purificación del DNA de los pacientes y del grupo control el rendimiento de DNA (ng) y la pureza (relación de absorbancia a 260/280) de ADN genómico extraído se determinó espectrofotométricamente utilizando el Nano drop® ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, Estados Unidos de América), donde se define al DNA puro como el que tiene una relación de absorbancia 260/280 que oscila entre 1,7 y 2,0 (Chen et al., 2010).

Conversión de DNA por tratamiento con bisulfito de sodio

Desde que en 1970, dos grupos de investigación independientes describieron la conversión de citosinas a uracilos en una secuencia genómica cuando esta era tratada con bisulfito de sodio, la conversión por bisulfito se convirtió en el principal método para el análisis de la metilación. El fundamento de esta técnica está basado en la capacidad por el bisulfito para desaminar selectivamente residuos de citosinas (Hayatsu, Wataya, & Kai, 1970) (Shapiro, Servis, & Welcher, 1970).

Como se muestra en la figura, la desaminación de citosinas mediada por bisulfito se da en tres pasos. El paso 1 es una adición reversible de un grupo HSO_3^- a la citosina. El paso 2 es la liberación de NH_3 por hidrólisis, y el paso 3 es la liberación del HSO_3^- para regenerar el doble enlace entre C5 y C6, formando un uracilo. Esta reacción ocurre de manera muy lenta en las citosinas metiladas y la conversión sólo se completa en condiciones alcalinas. Esta propiedad permite que sólo la citosinas no metiladas sean convertidas, ya que la conversión mediada por bisulfito en 5-metilcitosinas produce productos resistentes a la alcalinidad (Wang, Gehrke, & Ehrlich, 1980), después la secuencia pueda ser analizada por distintas técnicas en donde los uracilos son reconocidos por oligonucleótidos como adeninas (Frommer, McDonald, & et al, 1992).

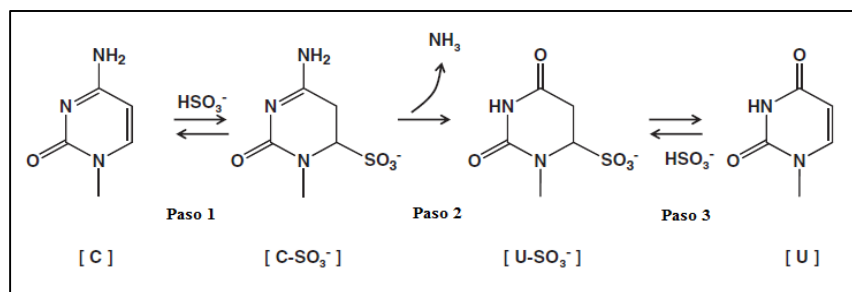


Figura. Reacción de desaminación mediada por bisulfito de citosinas para convertirlas a uracilos.

El DNA de los pacientes y del grupo control fue convertido con bisulfito utilizando el kit comercial EZ DNA Methylation-Gold Zymo Research siguiendo las instrucciones del fabricante. El primer paso de este método fue mezclar 500ng de DNA diluidos en 20 μl de agua estéril con 130 μl del reactivo de conversión incluido en el kit; dado que la reacción de conversión mediada por bisulfito únicamente sucede en el DNA de cadena sencilla, es necesario desnaturalizar la doble hélice con el aumento de temperatura en un termociclador (Frommer, McDonald, & et al, 1992), el programa utilizado fue: 98 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, 53 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, 8 ciclos de: 53 $^{\circ}\text{C}$ por 6 minutos y 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos; y al final 4 $^{\circ}\text{C}$. Después de la reacción de conversión los DNAs fueron colocados en las columnas del kit en que contenían 600 μl de M-Binding Buffer. Las columnas se colocaron en tubos colectores, se mezclaron por inmersión y se centrifugaron a 10 000 g por 1 minuto. Después se desechó el sobrenadante de los tubos colectores y se agregó a la columna 200 μl de M-Desulphonation Buffer, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y de nuevo se centrifugaron a 10 000 g por 1 minuto. Por último, para diluir el DNA, las columnas se colocaron en tubos de microcentrifuga nuevos, se añadieron 110 μl de agua estéril y se centrifugaron a 10 000 g por un minuto. Al final las concentraciones de DNA fueron medidas por triplicado en un espectrofotómetro.

Análisis de oligonucleótidos utilizados

Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron fueron diseñadas para hibridar con las secuencias modificadas por bisulfito de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, estos oligonucleótidos han sido utilizados en dos estudios anteriores

(Wojdacz *et. al*, 2011) (Gustap *et. al.*, 2014). Para conocer la región donde estos oligonucleótidos se alineaban, las secuencias fueron rastreadas en la base de datos *Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Se encontró que los oligonucleótidos de *BRCA1* abarcan 79 pares de bases desde la base 65 hasta la 143 de la secuencia del exón 1. En la tabla se describe la secuencia de los oligonucleótidos y en seguida un fragmento de la secuencia del exón 1 en dónde se remarca con azul, la secuencia donde se alinea el oligonucleótido *forward* y con rojo la región donde se alinea el oligonucleótido *reverse*. Esta región se encuentra dentro de la región promotora del gen *BRCA1*.

Tabla. Secuencias de los oligonucleótidos de BRCA1	
Forward BRCA1	GGAAAAGCGCGGGAATTATAGATAAAT
Reverse BRCA1	ATCCCCCGTCCAAAAAATCTCAAC

```

1  gtacctgat ttcgtattct gagagctgc tgcttagcgg tagccocttg gtttcogtgg
61  caacggaaaa gcgcggaat tacagataaa ttaaaactgc gactgocgcg cgtgagctcg
121 ctgagacttc ctggacgggg gacagctgt ggggtttctc agataactgg gccoctgocg
181 tcaggaggcc ttcaccctct gctctgggta aagttcattg gaacagaaag aaatggattt
241 atctgctctt cgcgttgaag aagtacaaaa tgtcattaat gctatgcaga aaatcttaga

```

En el caso del gen *BRCA2* el producto de amplificación de los oligonucleótidos tiene un tamaño de 87 pares de bases, está incluido dentro exón 1 entre la base 489 hasta la 576, y se describe la región de alineamiento igual que en el caso de los oligonucleótidos de *BRCA1*. En dónde se remarca con azul, la secuencia donde se alinea el oligonucleótido *forward* y con rojo la región donde se alinea el oligonucleótido *reverse*.

Tabla. Secuencias de los oligonucleótidos de BRCA2	
Forward BRCA2	GGTAGAGATAAAAGGGTAAGAAGT
Reverse BRCA2	GCGTCTCCGCAATCCCAA

```

1 aggggggncc ccccttccca aaagnaaggg tggcccttgg naacntcctn aaaggntcaa
61 ngcnaantaa agaaagaaac acnaacaact cccaaatccc cgctttaatt cggtaagaa
121 tactaacggt tgggaatgcc ttgaacaaag gaaatttcct ttcgccaaca ctgagaaaaat
181 acccgcaagc gcccnaccn aggctgact tccgggtggg gcgtgtgctg cgtgtcgcgt
241 cacggcgca cgtggccagc gcgggcttgt ggcgcgagct tctgaaacta ggcggcagag
301 gcggagccgc tgtggcactg ctgcgcctct gctgcgcctc ggggtgtctt tgcggcggtg
361 ggtcgcgcc gggagaagcg tgaggggaca gatttgtgac cggcgcgggtt tttgtcagct
421 tactccgcc aaaaaagaac tgcgcctctg gagcgggta gtggtggtgg tagtgggttg
481 ggacgagcgc gtcttccgca gtcccagtc agcgtggcgg gggagcgctt cacgccccgg
541 gtcgctgcc cggttcttg cccttttgtc tctgccaacc cccacccatg cctgagagag
601 aggtccttgc ccgaaggcaa attttcgca agcaaattcg agccccgcc cttccctggg

```

Curva de diluciones seriadas

Se elaborará una curva de metilación estándar 0%, 0.1%, 1%, 10% y 100% con DNA control metilado y no metilado que sirvió como referencia del nivel de metilación con el DNA de los pacientes y grupo control (Figura). Para su elaboración se trató con bisulfito de sodio el DNA control no metilado (DNA Unmethylated Human Control, QIAGEN) y metilado al 100% (Methylated Human DNA Estándar, Zymo Research). De la misma manera que se hizo con el DNA de los pacientes y grupo control, se utilizaron 500ng de cada DNA control por cada tratamiento con bisulfito. Para tener una cantidad suficiente de muestras control para preparar una dilución seriada estándar (0%, 0.1%, 1%, 10% y 100% con DNA control metilado y no metilado) se realizaron 2 tratamientos para el estándar metilado (2 x 500ng) y 8 tratamientos para el estándar no metilado (8 x 500ng). Las muestras fueron diluidas en 110µl de agua estéril para obtener una concentración final de 5ng/µl. Al final del tratamiento se mezclaron los 2 tubos con el DNA metilado 100% y por otro lado los 8 tratamientos con el DNA no metilado. En 5 tubos de microcentrifuga se agregó DNA como lo indica la siguiente lista:

Tubo 1) Estándar 100% metilado. 200 µl de DNA control metilado tratado con bisulfito.

Tubo 2) Estándar 10% metilado. Agregar 180 µl de DNA control no metilado tratado con bisulfito al tubo y 20 µl de DNA del tubo 1.

Tubo 3) Estándar 1% metilado. 180 μ l de DNA control no metilado tratado con bisulfito al tubo y 20 μ l de DNA del tubo 2.

Tubo 4) Estándar 0.1% metilado. 180 μ l de DNA control no metilado tratado con bisulfito al tubo y 20 μ l de DNA del tubo 3.

Tubo 5) Estándar 0% metilado (no metilado). 180 μ l de DNA control no metilado.

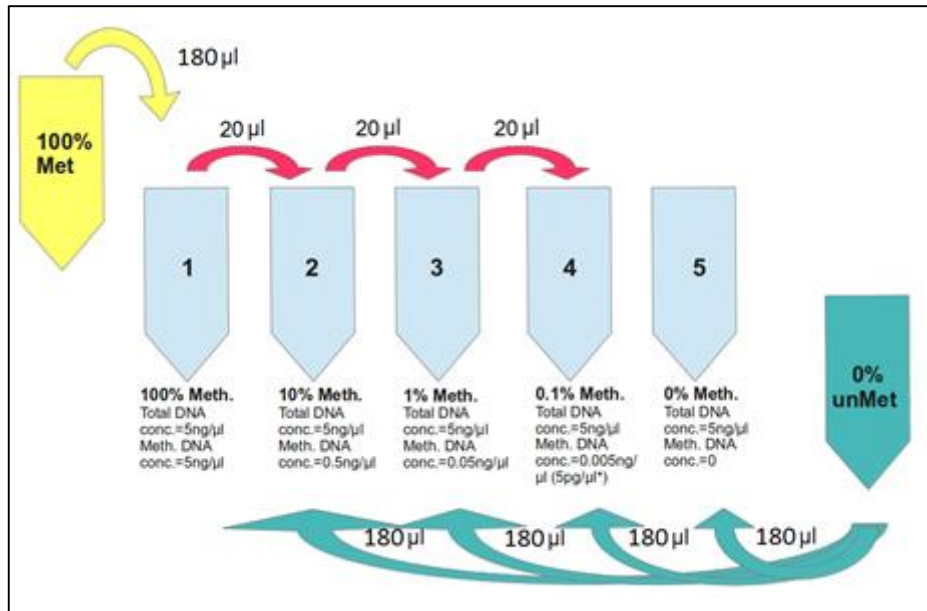


Figura. Curva de dilución seriada

Análisis de metilación *High Resolution Melting*

Para analizar el estado de metilación de la región promotora de *BRCA1* y *BRCA2* se utilizó el análisis de curvas de fusión sensible a la metilación (MS-HRM, por sus siglas en inglés). Este análisis fue diseñado inicialmente para la genotipificación de polimorfismos de nucleótidos simples (Wittwer & cols, 2003). En esta técnica una región de interés se amplifica por PCR. Luego, en el análisis *melting*, la hebra de DNA es desnaturalizada a 94 $^{\circ}$ C y vuelve a su conformación de doble cadena en una lenta disminución de la temperatura, entonces la fluorescencia de un colorante unido al DNA de doble cadena presente en el medio, es detectada continuamente por un sistema óptico que genera una curva característica (**Figura**).

El comportamiento de curvas que son similares en forma pero que son distinguibles entre sí por la diferencia en la temperatura de fusión del amplicón, T_m , (la temperatura de fusión en donde el 50% del DNA es de doble cadena, y el 50% es de una sola cadena), proporciona información valiosa para la detección del perfil de metilación (Wojdacz & Dobrovic, 2008).

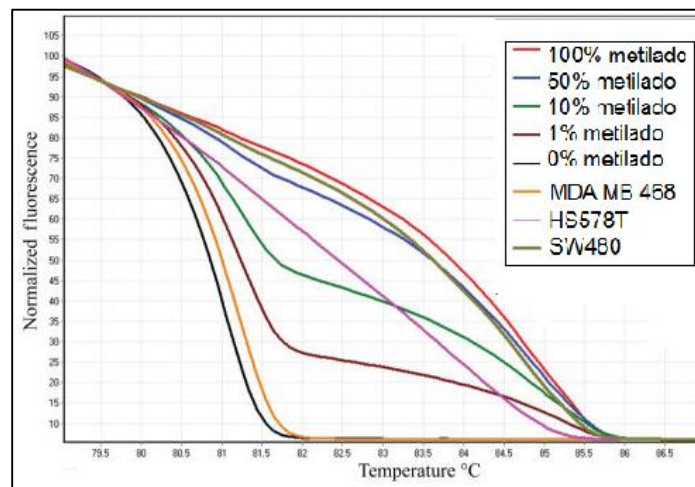


Figura. Curva MS-HRM. Se muestra una dilución seriada de niveles conocidos de metilación y tres líneas celulares, MDA MB 468, SW480 and HS578T. (Wojdacz & Dobrovic, 2008)

El análisis de los controles y los pacientes del estudio se realizó en el equipo Light Cycler 96 de Roche. Cada reacción tuvo un volumen de 20.4 μl y fueron preparadas en una placa de 96 pozos, cada una incluyó 10 μl del *Master Mix* que contiene un colorante de unión al DNA de doble cadena y dNTPs, los 1 μl de cada oligonucleótido diseñado para reconocer la secuencia convertida por bisulfito, 2.4 μl de MgCl_2 (25mM), y 6 μl de DNA (15ng) convertido por bisulfito. Después de preparar cada reacción la placa fue centrifugada a 1 500 g por 2 minutos. Cada DNA fue analizado por triplicado. La siguiente tabla muestra los parámetros que fueron utilizados para la corrida inicial de PCR en el LightCycler 96 y el análisis High Resolution Melting.

Desnaturalización inicial	10 min/95°C
Amplificación	

50 ciclos	Desnaturalización	5 seg/ 95°C
	Alineamiento	5 seg/Temperatura específica de cada primer
	Elongación	10 seg/72°C
HRM		
		1 min/95°C
50 adquisiciones por minuto		1 min/70°C a 95°C

Análisis estadístico

Debido a que el análisis HRM es una técnica semi-cuantitativa no es posible determinar el perfil exacto de metilación en cada muestra así que se formaron 5 grupos distintos según la curva de metilación realizada: 0-0.1%, 0.1-1.0%, 1.0-10%, 10-50% y 50-100%. La determinación de cada muestra se hizo visualmente fueron agrupadas según la comparación con la curva de metilación seriada.

Resultados

El objetivo del estudio fue analizar el perfil de metilación de la región promotora de los genes *BRCA1* y *BRCA2* por la técnica de *Methylation Sensitive High Resolution Melting* (MS-HRM) en 10 muestras de sangre periférica de pacientes del INCa

con diagnóstico de cáncer de mama confirmado incluidas en el proyecto “Identificación de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* mediante secuenciación masiva en pacientes mexicanos con síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario”, de las cuales 3 tenían alguna mutación confirmada en los genes *BRCA*'s y 7 eran mujeres en las que no se habían encontrado mutaciones. Además se incluyó un grupo control conformado por 10 mujeres pre-menopáusicas con edades entre los 30 y 40 años, sin diagnóstico de cáncer de mama o historia familiar de cáncer.

La extracción de DNA del grupo control se realizó por el método de *salting out* descrito previamente. Todas las muestras de los pacientes fueron purificadas de manera automatizada en el el MagNA Pure Compact Instrument de Roche. La cuantificación se realizó por triplicado y se calculó el promedio en el equipo NanoDrop 1000, todas las muestras tuvieron un rendimiento suficiente para el análisis. Una de las extracciones del grupo control, dos del grupo *BRCA*s positivos y una del grupo *BRCA*s negativos tuvieron una relación 260/280 por encima del valor de 2, pero ya que era mínima la diferencia se utilizó para el análisis MS-HRM (datos no mostrados). Las cantidades necesarias para la conversión de bisulfito se ajustaron según el promedio de la cuantificación y fue realizada según el protocolo sin dificultades.

Las curvas *melting* de *BRCA1* fueron normalizadas entre los 72.991°C-73.001°C y 80.214°C-81.282. Para *BRCA2* la normalización se realizó entre los valores 73.932°C-74.872°C y 84.402°C-85.725°C.

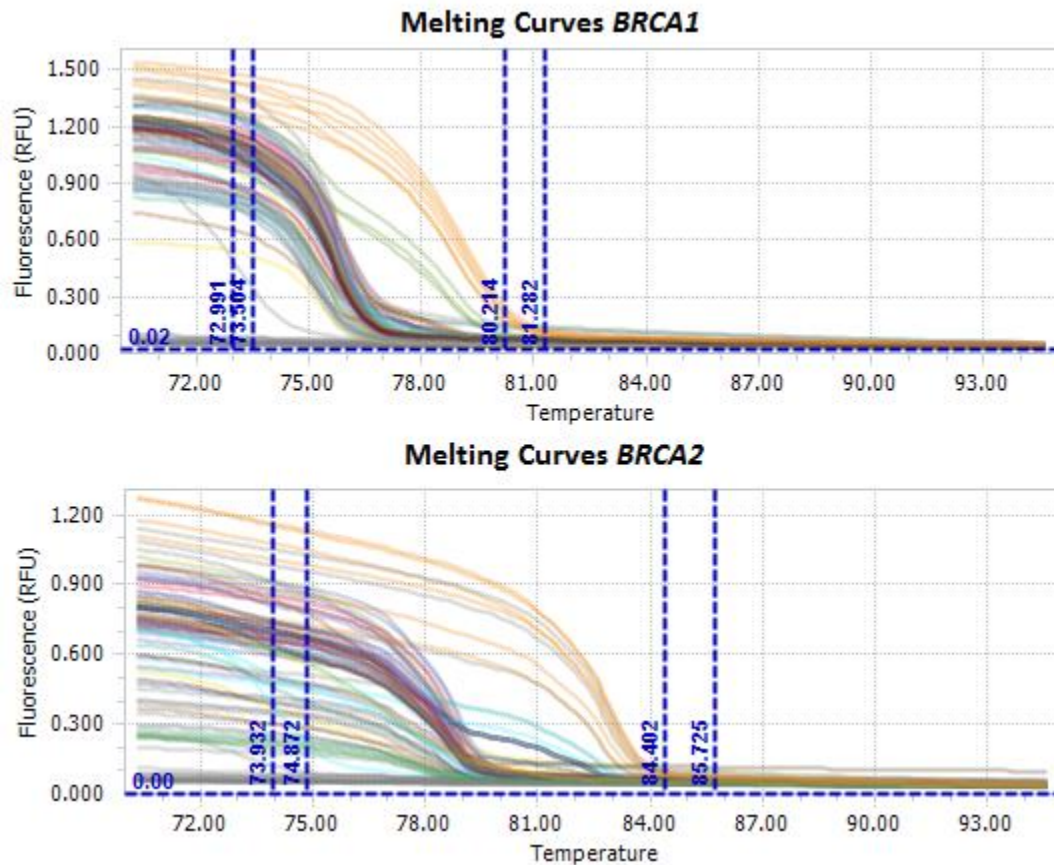


Figura. Curvas *melting* obtenidas por MS-HRM de los genes *BRCA*s.

Después de la normalización se obtiene dos figuras distintas. En la primera se analiza el gen *BRCA1* se muestra el análisis de todas las muestras divididas en tres grupos y comparadas con una curva de metilación a través de distintas concentraciones de DNA estándar 100% metilado y DNA estándar no metilado. El perfil de metilación se determinó visualmente según el comportamiento de la curva problema en comparación con las curvas de referencia. Sólo se muestra una de las tres curvas.

El primero grupo (color vino) pertenece a las 10 muestras de sangre del grupo control. Todas las muestras de este grupo tienen un comportamiento similar en el rango de DNA 0.1-1.0% metilado. En dos de las muestras el comportamiento pareciera asemejarse al rango de 1-10% metilado pero aún es insuficiente para poder ser incluidas en este grupo. En cambio ninguna muestra del grupo control se encuentra entre los niveles 0-0.1% metilado.

El segundo grupo (color rosa), conformado por tres muestras de sangre de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama y alguna mutación confirmada en genes *BRCAs*. En las tres muestras (color rosa) el comportamiento es muy similar y se encuentra entre los valores de 0.1-1.0% de metilación.

Al último se encuentran las 7 muestras (color verde), de los pacientes con diagnóstico de cáncer de mama sin mutaciones confirmadas en genes *BRCAs*. Estas 7 muestras a diferencias de las muestras de los dos primeros grupos mostraron mayor variabilidad. 3 de las muestras se ubican entre el 0-0.1% de metilación, de hecho, tienen un comportamiento casi idéntico a la curva de 0% de metilación. Dos muestras se ubican entre el 0.1-1.0% de metilación y dos muestras pueden ser ubicadas dentro del grupo 1.0-10% de metilación. Así, las 7 muestras analizadas se ubican en tres grupos distintos desde 0% hasta el 10% de metilación.

En la figura se encuentran las curvas *melting* del gen *BRCA2*. Al igual que en la figura del gen *BRCA1* los resultados se han dividido en tres grupos. El primero representado por el grupo control, el segundo por las muestras de las pacientes con alguna mutación en los genes *BRCAs* y por último el grupo de pacientes sin mutaciones detectadas en *BRCAs*.

Las 10 muestras del grupo control tiene un comportamiento similar, un perfil de metilación de 0-0.1%, de hecho ninguna curva podría ser ubicada dentro del siguiente nivel de metilación. De manera similar al grupo control, el grupo con las tres muestras de pacientes positivas de mutaciones de *BRCAs* tienen un perfil de metilación casi idéntico de 0-0.1% metilado. Por último, todo el grupo de pacientes *BRCAs* negativas presenta un perfil de metilación entre 0-0.1%. Los resultados son resumidos en la tabla.

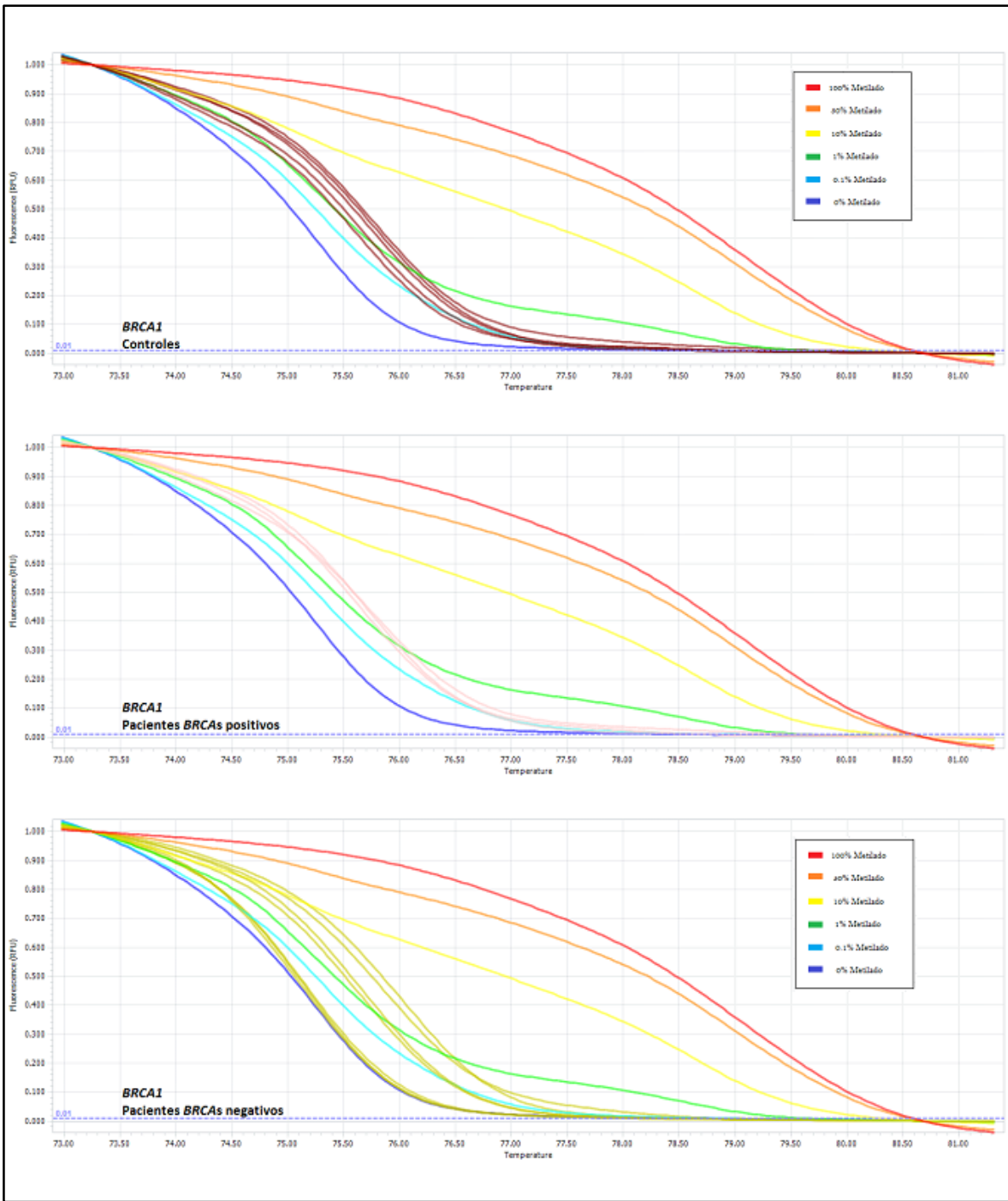


Figura. Análisis MS-HRM del gen BRCA1 para el grupo control (arriba), grupo BRCA's positivos (medio) y BRCA's negativos (abajo).

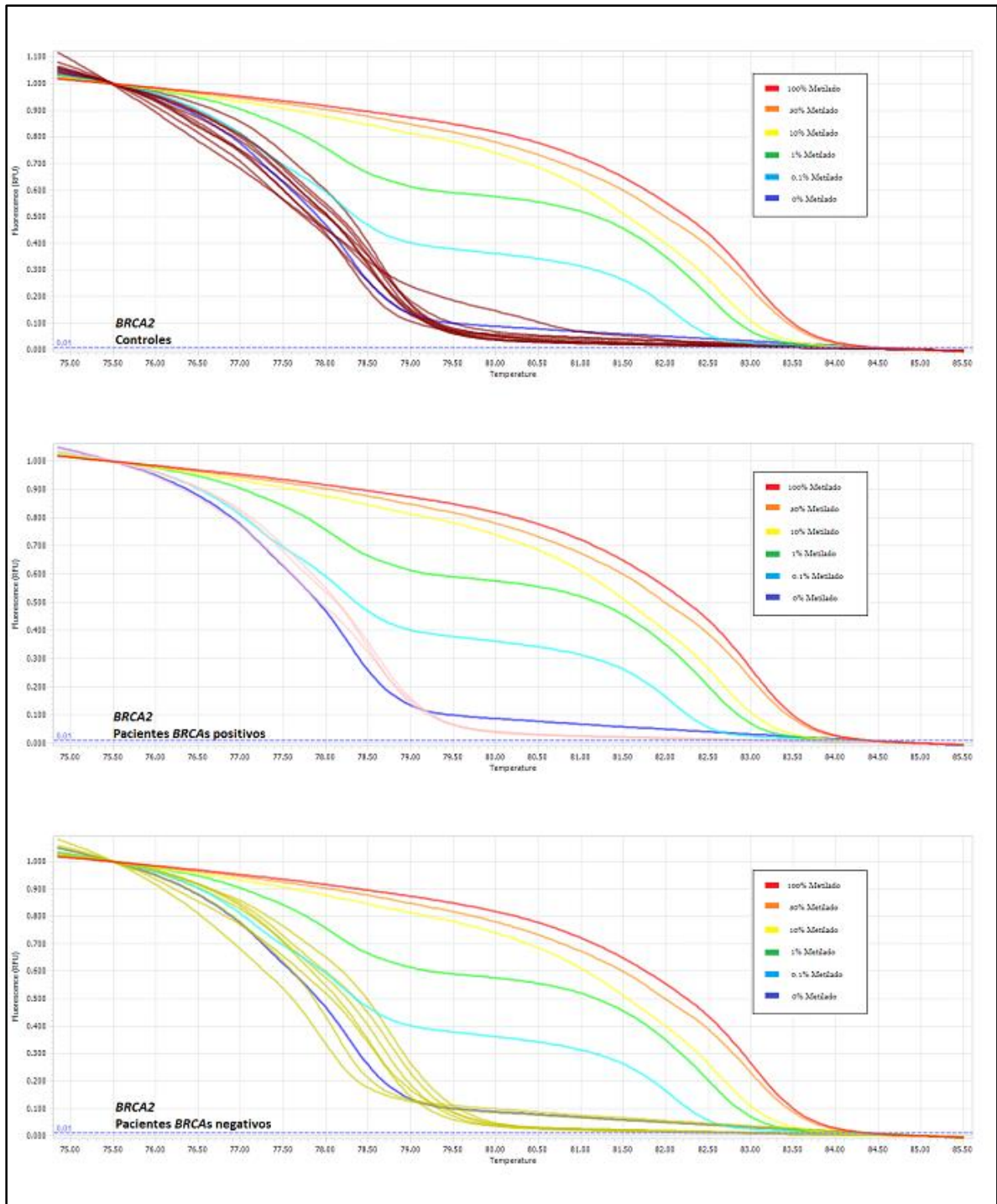


Figura. Análisis MS-HRM del gen *BRCA2* para el grupo control (arriba), grupo *BRCA*'s positivos (medio) y *BRCA*'s negativos (abajo).

Tabla. Interpretación de las curvas HRM para todos los ensayos				
	<i>BRCA1</i>		<i>BRCA2</i>	
Grupo	Muestra	% de Metilación	Muestra	% de Metilación
Controles	1	0.1-1.0	1	0-0.1
	2	0.1-1.0	2	0-0.1
	3	0.1-1.0	3	0-0.1
	4	0.1-1.0	4	0-0.1
	5	0.1-1.0	5	0-0.1
	6	0.1-1.0	6	0-0.1
	7	0.1-1.0	7	0-0.1
	8	0.1-1.0	8	0-0.1
	9	0.1-1.0	9	0-0.1
	10	0.1-1.0	10	0-0.1
<i>BRCA's</i> positivos	1	0.1-1.0	1	0-0.1
	2	0.1-1.0	2	0-0.1
	3	0.1-1.0	3	0-0.1
<i>BRCA's</i> negativos	1	0.1-1.0	1	0-0.1
	2	0-0.1	2	0-0.1
	3	0-0.1	3	0-0.1
	4	1.0-10	4	0-0.1
	5	1.0-10	5	0-0.1
	6	0-0.1	6	0-0.1
	7	0.1-1.0	7	0-0.1

Comparando la metilación de cada gen entre los grupos. El grupo control presenta un nivel de metilación muy homogéneo entre cada gen y es claro apreciar que *BRCA1* (0.1-1.0%) tiene una mayor metilación basal que *BRCA2* (0-0.1%). Estos niveles permiten estimar la metilación que puede considerarse normal en ambos genes y compararlo con los pacientes.

En los pacientes positivos para mutaciones *BRCA1* y *BRCA2* no pudo observarse diferencia de alguna muestra con el grupo control así que el *BRCA1* presenta mayor metilación que *BRCA2*. Cuando se analizó el grupo de pacientes negativos para mutaciones en *BRCA's* se encontró que *BRCA1* es bastante diferente a *BRCA2*. Mientras que el perfil de metilación del gen *BRCA1* se distribuye en los pacientes entre 0 al 10%, el gen *BRCA2* tiene un perfil de metilación similar al grupo control.

Conclusiones

En este trabajo se analizó el perfil de metilación de los genes *BRCA*'s en pacientes mexicanas con síndrome de cáncer de mamá-ovario hereditario en pacientes con y sin mutaciones confirmadas por pirosecuenciación y en un grupo control de mujeres premenopáusicas sanas. Resulta bastante interesante observar los resultados. Primero por darnos cuenta que los genes *BRCA*s tiene un estado de metilación inicial positivo, que aunque es difícil de determinar en *BRCA2*, es bastante claro en *BRCA1*, todo esto en contrariedad a lo reportado por muchos otros artículos en donde los niveles de metilación eran nulos (Snell, Krypuy *et. al.*, 2008), (Wong *et. al.*, 2011). (Wojdacz *et. al.*, 2011) (Rice *et. al.*, 2000; Baldwin *et. al.*, 2000; Birfisdottir *et. al.*, 2006).

El estado de metilación positivo de los grupos controles puede ser relacionado con el envejecimiento. Primero, durante algunos años se ha empezado a comprender que una pérdida gradual del contenido total metil-citosinas se produce con la en la mayoría de los tejidos de vertebrados, incluyendo los seres humanos. Esta hipometilación afecta predominantemente a las CpG que no pertenecen a islas y a secuencias repetitivas del genoma, a través de diferentes mecanismos dependientes de la edad (Covadonga H., Fernandez FA., Fraga FA., 2013). Más recientemente, Heyn *et al.*, corroboraron y extendieron las conclusiones anteriores que demuestran que la hipometilación asociada con la edad está presente en todos los compartimentos genómicos, incluyendo promotores, exones, intrones y regiones intergénicas.

En específico, existe mucha evidencia de que en varios genes entre los que se encuentra supresores tumorales (*COX7A1*, *LOX*, *RUNX3*, *TIG1*, *p16INK4A*, , *RASSF1*, *DUSP22*), de desarrollo y el crecimiento (*IGF-2* , *cFos*), de adhesión célula-célula (*CDH1*), participantes del metabolismo (*ELOVL2*, *SLC38A4*, *SLC22A18*, *MGC3207*, *ECRG4*, *ATP13A4*, *AGPAT2*, *LEP*), involucrados en la reparación del ADN (*MLH1*) y control de la transmisión de la señal (*FZD1*, *FZD7*) en donde exhibieron patrones de metilación del DNA alterados en el envejecimiento, exhibiendo características a veces tejidos y células de tipo

específico, con las consiguientes diferentes resultados funcionales (Lister *et. al.*, 2013) (Covadonga H., Fernandez FA., Fraga FA., 2013).

Tomados en conjunto, dos alteraciones específicas de la metilación del ADN ocurren durante el envejecimiento: una disminución global de 5-metilcitosina e hipermetilación de loci específicos (principalmente islas CpG de promotores). Lo que puede explicar el nivel de metilación positivo en nuestros grupos controles que se mantiene bajo y constante a través de todas las mujeres estudiadas.

El resultado más interesante de este trabajo resultó ser la variabilidad del gen *BRCA1*, el cual mostró distintos estados de metilación en los pacientes negativos para mutaciones. Aunque es claro que debido a la limitación del pequeño grupo de estudio es imposible determinar si existe una verdadera relación con el síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario resulta bastante llamativo que en tan sólo 7 pacientes hubiéramos encontrado esta variación. Gustap *et. al.*, ya se había percatado de este tipo de fenómeno a través de los distintos estudios que analizaban el perfil epigenético de *BRCA1* y *BRCA2*, por lo cual atribuye estos resultados a la posible “contelación” de causas en la etiología en el desarrollo del cáncer de mama.

Por otro lado el gen *BRCA2* no tiene diferencia alguna entre los pacientes negativos y positivos en comparación con el grupo control. Esto concuerda con la bibliografía en donde no se ha detectado hipermetilación del gen *BRCA2* en casos de cáncer de mama (Bosviel, Michard *et. al.*, 2012) y otorga credibilidad a nuestro análisis.

Aún falta por establecer la relación directa que tiene el cáncer de mama con la aberrante metilación de los genes de susceptibilidad al cáncer de mama, *BRCA1* y *BRCA2*. Sin embargo, los resultados obtenidos en este proyecto de investigación favorecen la posibilidad de seguir estudiando a este grupo de mujeres negativas para mutaciones que poseen el síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario y en perspectiva extender el análisis a sus familiares con el objetivo de conocer si este estado de metilación puede heredarse a través de la línea germinal.

Bibliografía

- Alberts, B. (2008). *Biología molecular de la célula* (5ª ed.). Omega.
- Allis, D. C., Reinberg, D., & Jenuwein, T. (2007). *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Al-Moggharabi, Al-Qasem, Al-Boussekhra, (2011) Prognostic value of mitotic counts in breast cancer of Saudi Arabian patients. *Anticancer Res*;31(1):97-103
- Antequera, F., & Bird, A. (1993). CpG islands. *EXS*;64:169-85.
- Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, Karlan BY (2000) BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res* 60:5329–5333
- Bachman, K., Herman, J., & Corn, P. (1999). Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res*; 59:798-802.
- Bernstein, BE;Meissner, A; Lander, SE. (2007) The Mammalian epigenome. *Cell*. 128:4, 669–681
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*;16:6-21.
- Birgisdottir V, Stefansson OA, Bodvarsdottir SK, Hilmarsdotti H, Jonasson JG, Eyfjord JE (2006) Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res* 8:R38
- Bosviel R, et. al. (2012). BRCA2 Promoter Hypermethylation in Sporadic Breast Cancer. *Jou Int Bio*, 12,707-710.
- Baylin S., Joyce E. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2:107-16.
- Catteau, A., Harris, W., & Solomon, E. (1999). Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18; 1957-1965.
- Cheng X., Bluementhal RM., (2008). Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. *Structure* 16.
- Chen D, Zhang W, Zhu ZD, Huang Y, Wang P, Zhou BB, Yang XN, Xiao HS, Zhang QH. (2010). Establishment of target genomic DNA capturing system for next generation sequencing. *Yi Chuan*. ;32(12):1296-303.

Collins, N., Wooste, R., & Stratton, M. (1997). Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *British Journal of Cancer* 76(9), 1150-1156.

Covadonga H., Fernandez FA., Fraga FA. (2013) Aging epigenetics: Causes and consequences. *Molecular Aspects of Medicine*. Volume 34, Issue 4. 765-781

Esteller M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*;16 Spec No 1:R50-9.

Fernandez FA., Huidobro C., Fraga MF., (2012). De novo DNA methyltransferases: oncogenes, tumor suppressors, or both? *Trends in Genetics*, Volume 28, Issue 10, Pages 474-479

Frommer, M., McDonald, L., & et al. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 1579–1583.

Gazzoli, Loda M. (2002). A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hyperhypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res*;62:3925–8.

GLOBOCAN. (2012).

Gupta S., Jaworska-Bieniek K., Narod SA., Lubinski J., Wojdacz TK., Jakubowska A. (2014). Methylation of the BRCA1 promoter in peripheral blood DNA is associated with triple-negative and medullary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*; 148(3):615-22.

Hayatsu, H., Wataya, Y., & Kai, Y. (1970). The addition of sodium bisulfite to uracil and cytosine. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 724–726.

Heyn H, Moran S, Hernando-Herraez I, Sayols S, Gomez A, Sandoval J, Monk D, Hata K, Marques-Bonet T, Wang L, Esteller M. (2013). DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res*;23(9):1363-72.

Hitchins M, W. R. (2005). MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*;129:1392–9.

Honrado, E., & cols. (2007). Immunohistochemical classification of non-BRCA1/2 tumors identifies different groups that demonstrate the heterogeneity of BRCA families. *Modern Pathology* 20, 1298–1306.

James G., H., & B. Baylin, S. (2003). Gene Silencing in Cancer in Association. *N Engl J Med*;349:2042-54.

Jones, P., & Baylin, S. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.

Jovana J., Jo AR., Jörg T., Vessela K., (2010) The epigenetics of breast cáncer. *Molecular Oncology*, 4: 3, 242-254.

Joyce A., B Baylin (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, pages 683–692.

Klose RJ., Bird AP. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006. 89-97.

Knudson , A. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*;1:157-62.

Li B., Carey M., Workman JL. (2007). The role of chromatine during transcription. *Cell* 128, 707–719

Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*;341(6146):1237905.

Mancini DN, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, O'Malley FP, Singh SM, Xing W and Archer TK. (1998). CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene*, 16, 1161-1169.

Morin, P. J. et al. (1997). Activation of β -catenin–Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790.

Myohanen, S., Baylin, S., & Herman, J. (1998). Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res.* 58, 591–593.

Narod, S., & Rodríguez, A. (2011). Predisposición genética para el cáncer de mama: genes BRCA1 y BRCA2. *Salud pública de México*, 53.

Parsons, R. et al. (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 55, 5548–5550.

Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW (2000) Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 21:1761–1765

Shapiro, R., Servis, R., & Welcher, M. (1970). Reactions of uracil and cytosine derivatives with sodium bisulfite. A specific deamination method. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 422–424.

Snell C, Krypuy M, Wong. (2008). BRCA1 promoter methylation in peripheral blood DNA of mutation negative familial breast cancer patients with a BRCA1 tumour phenotype. *Breast Cancer Res*; 10(1):R12

Tapia, T., & cols. (2008). Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. [*Epigenetics* 3:3, 157-163.

Toyota, M. et al. . (1999). Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res.* 59, 2307–2312.

Vidal, M. (2008). Cáncer de Mama Hereditario: Identificación y Elección de Pacientes para Estudio Molecular de los Genes BRCA. *Cancerología*, 3; 51-61.

Wang, R., Gehrke, C., & Ehrlich, M. (1980). Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res.* 8, 4777–4790.

Wittwer, C., & cols. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem*;49:853–860.

Wojdacz, T., & Dobrovic, A. (2008). Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res*; 35(6):e41 .

Wong, E., Fox, B., & Southey, M. (2011). Constitutional Methylation of the BRCA1 Promoter Is Specifically Associated with BRCA1 Mutation-Associated Pathology in Early-Onset Breast Cancer. *Cancer Prev Res*;4:23-33.

Wooster, R., & et. al. (1995). Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q12-13. *Science*; 265: 2088-90. .

Yoshida, K., & Yoshio, M. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulator of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* 95.

