

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE MEDICINA

**“ANÁLISIS DE LA METILACIÓN EN LOS GENES DACT2 Y PHF20L1
INVOLUCRADOS EN LA METÁSTASIS EN MUESTRAS DE CANCER DE
MAMA DE PACIENTES CON NORMOPESO Y SOBREPESO”**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIATURA EN NUTRICIÓN CLÍNICA

PRESENTA:

DEETZA REYES ORTEGA

DIRECTOR INTERNO

DC. MARTA ELENA HERNÁNDEZ CABALLERO

CODIRECTOR INTERNO

DC. MAURA CÁRDENAS GARCÍA

REVISORES

DRA. MARIA TERESA ABAD CAMACHO

JUNIO 2017

PUEBLA, PUE.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1.0. ANTECEDENTES GENERALES | 7 |
| 1.1. Cáncer | 7 |
| 1.1.1. Historia del cáncer | 7 |
| 1.1.2. Definición | 8 |
| 1.1.3. Clasificación y etiología | 9 |
| 1.1.4. Epidemiología | 10 |
| 1.2. Cáncer de mama | 11 |
| 1.2.1. Definición | 11 |
| 1.2.2. Epidemiología | 11 |
| 1.2.3. Factores de riesgo | 13 |
| 1.2.4. Alteraciones genéticas asociadas con el cáncer de mama | 15 |
| 1.2.5. Tipos de cáncer de mama y estadificación | 16 |
| 1.2.6. Nutrición y cáncer | 22 |
| 1.2.7. Obesidad y cáncer | 23 |
| 2.0. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS | 25 |
| 2.1. Metilación y cáncer | 25 |
| 2.2. DACT1 | 28 |
| 2.3. PHF20L1 | 29 |
| 2.4 Nutrición y Metilación en Cáncer | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.0. JUSTIFICACIÓN | 31 |
| 3.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 32 |
| 3.1.2. Pregunta científica | 32 |
| 4.0. OBJETIVOS | 33 |
| 4.1. Generales | 33 |
| 4.2. Específicos | 33 |
| 5.0. MATERIAL Y MÉTODOS | 33 |
| 5.1. Diseño del Estudio | 33 |
| 5.1.1. Tipo de estudio | 33 |
| 5.1.2. Características de estudio | 33 |
| 5.2. Muestreo | 34 |
| 5.2.1. Población de estudio | 34 |
| 5.2.2. Selección de muestra | 34 |
| 5.2.3. Criterios de inclusión | 34 |
| 5.2.4. Criterios de exclusión | 34 |
| 6.0. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS | 35 |
| 6.1. Conversión con bisulfito de sodio | 35 |
| 6.2. Purificación del DNA convertido por bisulfito | 36 |
| 6.3. Diseño de oligonucleótidos metilados y desmetilados para DACT2 y PHF20L1 | 37 |
| 6.4. Análisis de metilación | 38 |
| 6.5. Análisis estadístico | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 7.0. RESULTADOS | 40 |
| 7.1. Características de las pacientes con cáncer de mama y controles | 40 |
| 7.2. Extracción de DNA | 42 |
| 7.3. Conversión y purificación con bisulfito de sodio | 42 |
| 7.4. Análisis de metilación para DACT2 | 42 |
| 7.5. Análisis de metilación para PHF20L1 | 45 |
| 8.0. DISCUSIÓN | 51 |
| 9.0. CONCLUSIONES | 56 |
| 10.0. BIBLIOGRAGÍA | 57 |

RESUMEN

El cáncer de mama ha sido una de las principales causas de mortalidad en mujeres, por lo que encontrar las causas ha tomado gran importancia. Por estas razones, se tomaron en cuenta los genes DACT2 y PHF20L1 por su función en la regularización de la transcripción y proliferación celular, analizando el grado de metilación de cada gen y comparándolo con el estadio tumoral de las muestras.

Las muestras de ADN fueron tomadas de tejido de tumores mamarios esporádicos y tejido mamario sano adyacente, obtenidos del Centro Médico Nacional La Raza; las cuales fueron preparadas con el método de bisulfito de sodio para su análisis por PCR.

Al realizar el análisis estadístico por χ^2 , no se encontró cambio alguno en el estado de metilación del gen PHF20L1 en los estadios II y III; en relación a la metilación del promotor DACT2 tampoco hubo cambios significativos. Por otro lado, en cuanto al análisis por PCR específico para metilación no permite saber si todas las citosinas están metiladas porque no se hizo la revisión por secuenciación.

Es importante resaltar que la metilación es un fenómeno que puede ser afectado por el estado nutricional de las pacientes, por lo que de manera inicial se realizó el análisis de la metilación en estos dos genes, dando pie a una siguiente fase para investigar desde el punto de vista nutricional si algunos nutrimentos y componentes bioactivos de los alimentos pueden llegar a alterar la expresión genómica de los genes antes mencionados en relación a su metilación o no y de ésta manera acercarnos más a una nutrición personalizada y exitosa, que lleve a un tratamiento adecuado para pacientes con esta patología.

INTRODUCCIÓN

El cáncer ha sido una enfermedad que ha ido teniendo cada vez más presencia en nuestro entorno, y al ser multifactorial se ha tratado de esclarecer cuáles son todos los factores de riesgo que se podrían reducir o detectar a tiempo para la prevención de esta enfermedad o para evitar su traslado a órganos o tejidos adyacentes.

Al ser el cáncer de mama el segundo más común y teniendo una alta incidencia y tasa de mortalidad en la población femenina, se ha generado un interés considerable por parte de diversos investigadores para establecer cuáles son los factores de riesgo más significativos de éste tipo de cáncer, siendo los genéticos unos de los más estudiados; en especial los relacionados con mutaciones y alteraciones epigenéticas (hipometilación/hipermetilación).

Por lo mismo se han identificado varios genes y sus alteraciones epigenéticas y/o mutaciones que los relacionan con la enfermedad; en este estudio se analizaron los genes DACT2 y PHF20L1 ya que se ha demostrado su papel en la regularización de transcripción génica y en la proliferación celular, dónde se analizó su metilación o desmetilación involucrados en células tumorales en pacientes con cáncer de mama en comparación con tejido sano adyacente. Por otra parte al ser genes poco estudiados en cuanto a su relación con la patología antes mencionada, aumentó el interés por recabar nueva información que permita seguir el estudio de otros genes posiblemente involucrados.

Existieron otros factores que llamaron la atención en este estudio, desde el sobrepeso y la obesidad de más de la mitad de la población de donde se obtuvieron las muestras de ADN, siendo un factor de riesgo investigado en diversos estudios; hasta la iniciativa que da el estudio para investigar desde el punto de vista de la nutrigenómica éstos genes y generar un enfoque más específico sobre la participación de la nutrición en éste tipo de patologías.

1.0. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. CÁNCER

1.1.1. HISTORIA

El cáncer, a pesar de la idea general, tiene precedentes en varias civilizaciones antiguas, siendo la referencia más antigua hace 150 000 años en restos del Paleolítico [1,2], sin embargo hay datos que con el paso del tiempo y los cambios ambientales generados en este han hecho que esta patología incremente en incidencia, en escritos antiguos tanto mesopotámicos, egipcios y sumerios se tienen referencia a cierto tipo de lesiones ulcerosas que investigadores modernos describen como un tipo de cáncer sin embargo no hay documentación exacta o específica acerca de tumoraciones o crecimientos anormales [2].

Los griegos más específicamente Hipócrates y sus discípulos fueron los primeros en denominar un cierto tipo de lesiones como karkinos (cangrejo) eran ulceraciones de difícil control que tendían a expandirse y arborizarse como las patas de un cangrejo por lo cual se le dio su nombre [2], posteriormente Galeno fue el que trasladase al idioma latín la palabra convirtiéndola en cáncer [1].

Las teorías de su formación han cambiado mucho Hipócrates hacía referencia a que un aumento de la cantidad de bilis negro generaba la formación de tumores en el hígado, por el siglo XVII surgió una nueva teoría donde la linfa por cambios en su composición generaba la formación de tumores, posteriormente se sugirió en el siglo XVIII que los tumores brotaban de elementos del organismo [1].

No fue hasta 1855 donde Rudolph Virchow y sus discípulos pudieron hacer un diagnóstico certero con el microscopio observando que las células cancerosas no eran iguales a las sanas y así dar una idea de que las células cancerosas se originaban de otras iguales [2]. Posteriores a esta surgieron varias teorías algunas vigentes en nuestros días, como la teoría de que la inflamación crónica podría generar células cancerosas, la teoría sobre los traumatismos y la formación de

tumores y la teoría de considerarla como enfermedad infecciosa por considerarla contagiosa [1].

Todo esto nos lleva a las teorías más actuales, la primera de las cuales creada en 1915, nos habla de que hay sustancias que generan cáncer a las cuales se les denominó cancerígenas; sin embargo, no se tenía idea de cómo es que generaban esto, y la segunda, creada en 1915 donde se describía por primera vez que un virus era generador de cáncer. Ya en 1970 se descubren los oncogenes y los genes supresores de tumores abriendo una puerta inmensa hacia la verdadera causa del cáncer y al estudio genómico y epigenético del mismo [1].

1.1.2. DEFINICIÓN

El cáncer es un término muy genérico y definido de muchas maneras, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo define como “El término «cáncer» es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de los límites normales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos” [3].

La definición creada por la *American Cancer Society* es “El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y propagación descontrolada de células anormales del cuerpo” [4].

Otras bibliografías definen esta patología como “El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma invadiendo localmente y a distancia otros tejidos” [5], “El cáncer: es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos” [6].

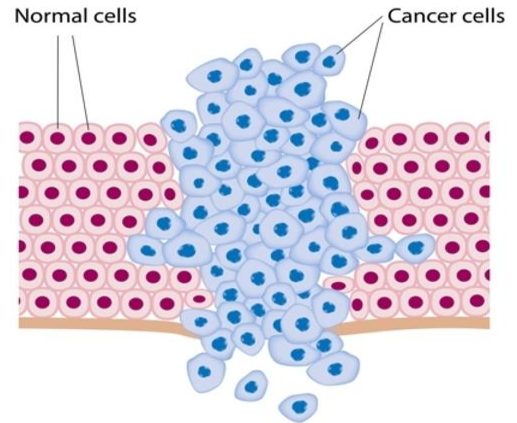


Figura 1. Células normales comparadas con las células cancerígenas. Obtenida de <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/lung-cancer>

Todas estas definiciones nos llevan a un mismo punto, que el cáncer son varias patologías generadas por un comportamiento anormal de las células las cuales se multiplican sin control y son capaces de invadir otros tejidos ya sea localmente o a distancia. Esto nos lleva a otra definición muy importante, la metástasis siendo en manera más breve la capacidad de estas células anormales, de ahora en adelante llamadas cancerígenas, de propagarse a otros tejidos y órganos adyacentes lo cual puede generar la muerte [3].

Existen diversos tipos de tumores cancerígenos y se pueden clasificar dependiendo de la célula de origen, el tipo de tejido afectado así como el tamaño, evolución e inicio del mismo [5].

1.1.3. CLASIFICACIÓN Y ETIOLOGÍA

La clasificación dependiendo del tipo de tejido los divide en carcinomas si es que provienen de tejido epitelial como piel o glándulas, los sarcomas si es que provienen de tejido mesenquimatoso como tejido conectivo, músculo o hueso y los que provienen de células sanguíneas como las leucemias y los linfomas [5].

La formación de tumores cancerígenos es debida a muchos factores que afectan el funcionamiento celular al modificar genes y generar mutaciones en ellos, tales factores pueden ser: infecciones, principalmente de virus como el Virus del

Papiloma Humano o el virus de Eipstein Barr; físicos como la radiación principalmente la ionizante capaz de generar trasposiciones o rupturas del genoma; hereditarios como alteraciones en genes que sintetizan antioncogenes (supresores), los cuales al tener una falla la probabilidad de tener cáncer aumenta y estos se heredan de generación en generación; sustancias químicas llamadas cancerígenos como el cigarrillo, el arsénico y el alcohol; y traumatismos o lesiones inflamatorias crónicas [6].

Todos los canceres tienen una fisiopatología similar, la disminución de los genes supresores de los tumores o el aumento de oncogenes son la causa de los cambios conformacionales de la célula. Cada tipo de cáncer tiene cambios fisiopatológicos característicos que los vuelven únicos.

1.1.4. EPIDEMIOLOGÍA

El número de casos nuevos de cáncer en cualquiera de sus modalidades ha ido en aumento, en 2008 se registraron 12,7 millones de nuevos casos [4] y en 2012 hubo 14 millones de casos nuevos con 8.2 millones de muertes asociadas a este padecimiento [3] y una tasa de incidencia de cáncer en la población general de 127.4 por cada 100 000 habitantes, siendo el sexo femenino el más afectado con una tasa de incidencia de 140.1 y el masculino con 114.1 [7]. Se espera que para el 2030 aumente a 21.4 millones de casos nuevos de cáncer anuales con 13.2 millones de muertes asociadas a esta enfermedad [4]. En México hubo 3758 casos incidentes en el año 2012 con una tasa de incidencia de 11.4 por cada 100 000 habitantes con una tasa de mortalidad de 5.5 muertes por cáncer por cada 100 000 habitantes [7].

Los canceres más comunes a nivel mundial en países desarrollados fueron de próstata pulmones y colorrectal en hombres, y en mujeres de mama, colorrectal y pulmonar. En países en vías de desarrollo son estómago, pulmón e hígado en hombre, y de mama, cervico uterino y de pulmón en mujeres [4]. La OMS nos refiere que a nivel mundial en 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el

hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado, mientras que en la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago [3].

En México también se tienen grandes diferencias según el sexo, para el femenino se encuentra mamario, cervico-uterino y colorectal como los cánceres más frecuentes, y para el género masculino, los cánceres más frecuentes son el prostático, pulmonar y colorectal [7].

1.2. CÁNCER DE MAMA

1.2.1. DEFINICIÓN

Es un tipo de cáncer que se genera en las glándulas mamarias tanto de hombres como de mujeres [8], las características son muy específicas dependiendo del género por lo cual solo se abarcara en mujeres [9]. Se caracteriza por la presencia de tumores los cuales pueden invadir otros tejidos adyacentes y migrar por torrente sanguíneo o linfático a otras partes del organismo, pueden originarse tanto en los conductos como en los ductos o en los lóbulos y de ahí avanzar [8].

1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo con una incidencia de 1.67 millones de casos al año, estas son cifras reportadas por la OMS del año 2013, y es el cáncer más común en mujeres con el 16% de los casos de cáncer en mujeres [3]. Las tasas de incidencia las más altas se encuentran en Europa y Norteamérica.

En cuanto a la magnitud actual del cáncer de mama en México, a partir de 2006 ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando de esa posición al cáncer cervicouterino. Durante 1999, la tasa de mortalidad por cáncer de mama fue de 15.1 por 100 000 mujeres de 25 años

o más, inmediatamente después de la registrada para el cáncer del cuello uterino. [8]

En el año 2010 la tasa estandarizada de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo que representa un incremento del 49.5% en los últimos 20 años, la mortalidad se eleva con la edad, siendo por esto un factor de riesgo muy importante [8]. La edad media al momento de morir por cáncer de mama sólo se ha incrementado en 0.5% entre 1990 y 2010, pasando de 58.4 a 58.8 en el mismo periodo [9]. La localización y diseminación del cáncer de mama al momento del diagnóstico influyen en la supervivencia de la persona, los casos en donde el tumor se encuentra confinado a la glándula mamaria (localizado), con un adecuado manejo, se confiere una supervivencia del 93% a 5 años y del 82% a 10 años [10]. El estadio del cáncer al momento del diagnóstico también nos da un factor pronóstico, se ha encontrado que en estadio I del cáncer encontramos una supervivencia del 93%, en un estadio II hay una supervivencia del 72%, en estadio III una supervivencia de 42% y en estadio IV del 18 % [8].

En México en el año 2001 se reportaron 3 971 casos (10.2 x 100 000 mujeres de 15 años o más), en 2003 se presentaron 12 433 nuevos casos de cáncer de mama (316 más que en el año anterior), la mayor parte en los grupos de 40 a 59 y de 70 años y más, patrón similar al encontrado en 2002 y en el 2009 se elevó a 13 987 casos (26.1 por 100 000) [9,10].

En México, se estima que la edad de ocurrencia se da una década antes que en las mujeres de EE.UU. y Europa, de los 33 044 casos registrados durante el periodo 2000-2006, el 50% ocurrieron en personas menores de 50 años [11].

El porcentaje promedio de diagnósticos, de acuerdo con el estadio clínico, es el siguiente: Estadios 0 y I, 7.4%; estadio II, 34.4%; estadios III y IV, 42.1%; no clasificables, 16.1% [8].

1.2.3. FACTORES DE RIESGO

Existen varias teorías acerca del origen o etiología precisa del cáncer de mama sin embargo no se ha llegado a una conclusión clara [12], hay varios factores que se pueden asociar a un riesgo mayor para contraer esta enfermedad, entre ellos tenemos los siguientes:

A. Factores biológicos

- Sexo femenino.
- Envejecimiento: A mayor edad mayor riesgo.
- Antecedente personal o familiar de cáncer de mama en madre, hijas o hermanas.
- Antecedentes de hallazgos de hiperplasia ductal atípica, imagen radial o estrellada, así como carcinoma lobulillar *in situ* por biopsia.
- Vida menstrual mayor a 40 años (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años).
- Densidad mamaria.
- Alteraciones genéticas.

B) Iatrogénicos o ambientales

- Exposición a radiaciones ionizantes, principalmente durante el desarrollo o crecimiento (*in utero*, en la adolescencia).
- Tratamiento con radioterapia en tórax.

C) Factores de riesgo relacionados con los antecedentes reproductivos

- Nuliparidad.
- Primer embarazo a término después de los 30 años de edad.
- Terapia hormonal en la perimenopausia o posmenopausia por más de cinco años.
- Uso de anticonceptivos orales medicados.

D) Factores de riesgo relacionados con estilo de vida

- Dieta:
 - 1) Elevado consumo de hidratos de carbono.
 - 2) Bajo consumo de fibra.
 - 3) Elevado consumo de grasas saturadas así como de ácidos grasos trans.
- Obesidad, principalmente en la posmenopausia.
- Sedentarismo.
- Consumo de alcohol mayor a 15 g/día.
- Tabaquismo. [9,10,11]

La promoción de las conductas favorables a la salud para la prevención del cáncer de mama puede disminuir hasta en 30% la incidencia en la población. Se debe orientar a las mujeres acerca de su responsabilidad en el autocuidado de la salud, disminuir los factores de riesgo cuando sea posible y promover los estilos de vida sanos como:

- Una alimentación rica en frutas y verduras y baja en grasas saturadas y ácidos grasos trans, así como elevar el consumo de hidratos de carbono complejos y disminuir los hidratos de carbono simples.
- Práctica de ejercicio físico moderado, que se asocia con una disminución del riesgo de cáncer de mama en la población general.
- Consumo de ácido fólico.
- Amamantar, por lo que debe incluirse entre las ventajas de la lactancia materna.
- Mantener un adecuado índice de masa magra y grasa adecuados para cada individuo, ya que si el tejido adiposo se encuentra elevado se asocia con un incremento significativo en el riesgo de cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas.

1.2.4. ALTERACIONES GENÉTICAS ASOCIADAS CON EL CÁNCER DE MAMA

BRCA1 y BRCA2: es la forma más común de cáncer de mama hereditario, es una mutación en los genes BRCA1 y BRCA2, en células normales estos genes ayudan decodificando proteínas que evitan el crecimiento descontrolado de las células, su mutación inicia en las células el crecimiento anormal, si se tiene esta mutación en algunas familias el riesgo de padecer cáncer de mama es de un 80% mientras que en otras va desde un 40 a un 65% , para las mutaciones de BRCA 2 el riesgo es de un 45%, las pacientes suelen ser jóvenes y con patologías en ambos senos, al igual que tienen un mayor riesgo de tener otro tipo de canceres como el de ovario. En los EU está asociado a la población judía Ashkenazi con mayor frecuencia, sin embargo cualquiera puede llegar a tener esta mutación.

Cambios en otros genes: existen otros tipos de mutaciones que generan este cáncer. Son menos comunes y no incrementan en mayor proporción el riesgo de padecer cáncer en comparación con los genes previamente mencionados.

ATM: Este gen repara normalmente el ADN dañado, la mutación de los dos genes causa la enfermedad de telangiectasia atáxica. La presencia de un solo gen anormal está ligado a la predisposición de cáncer de mama en algunas familias.

TP53: Gen que produce la proteína p53 de nuestro organismo ayudando a evitar el crecimiento anormal de las células. La mutación de este gen causa el Síndrome de Li-Fraumeni, los pacientes con esta enfermedad tienen mayor riesgo de padecer cáncer de mama al igual que otros tipos de canceres como la leucemia, los tumores cerebrales y los sarcomas.

Chek2: En el síndrome de Li Fraumeni la mutación en el gen chek2 puede aumentar el riesgo de cáncer de mama al doble.

PTEN: es un gen que ayuda a regular el adecuado crecimiento de las células, mutaciones de este gen en el síndrome de Cowden, aumentan la frecuencia de tumores tanto benignos como malignos así como crecimientos del tracto digestivo,

tiroides y ovarios, defectos en este gen pueden causar igual el síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba.

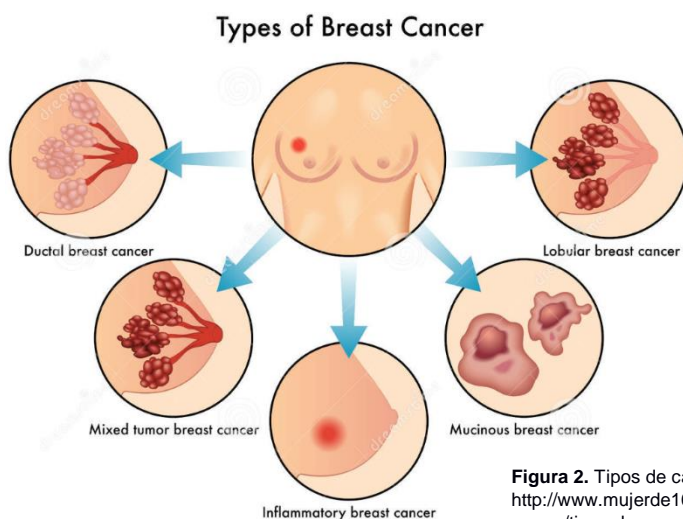
CDH1: mutaciones en este gen causan cáncer difuso gástrico, un síndrome en el cual las personas desarrollan un raro cáncer de estómago, y en mujeres aumentan el riesgo de tener cáncer lobular invasivo

STK: Los defectos de este gen llevan al síndrome de Peutz Jehgers, las personas con este síndrome tienen manchas pigmentadas en labios y boca con pólipos en el tracto urinario y gastrointestinal y aumentan el riesgo de muchos tipos de cáncer como el de mama.

PALB2: es un gen que codifica una proteína que se vincula con la proteína BRC2 con lo cual puede disminuir la función y eficacia de la proteína BRCA2 como proteína reguladora, aumentando de esta manera el riesgo de tener cáncer de mama y cáncer de ovario, y cáncer de mama en el hombre.

Las pruebas genéticas para saber la predisposición que tiene una persona son poco útiles, sin embargo las pruebas se pueden realizar, y son más comúnmente utilizadas para fines de investigación [8].

1.2.5 TIPOS DE CÁNCER DE MAMA Y ESTADIFICACIÓN



Hay diferentes tipos de cáncer de mama, esto dependiendo de las células afectadas y las observadas en el microscopio, entre ellas tenemos las siguientes:

Figura 2. Tipos de cáncer de mama. Obtenida de: <http://www.mujerde10.com/2015/10/cancer-de-mama/tipos-de-cancer-de-mama/>

Carcinoma ductal *in situ*

Es considerado como un pre cáncer o como un cáncer no invasivo ya que las células que limitan el ducto galactóforo han empezado a diferenciarse en células cancerígenas, sin invadir la membrana basal o sin diferenciarse más allá de este grupo celular, por lo cual es un cáncer no invasivo y sin capacidad de metástasis, sin embargo este puede convertirse en un cáncer invasivo, por lo cual se le ha considerado como pre cáncer. [8,12]

Carcinoma ductal invasivo

Es el tipo más común de cáncer de mama, abarcando tanto las células epiteliales del ducto así como la membrana basal y tejido adiposo adyacente al ducto afectado, la capacidad de metástasis se encuentra presente con invasión a otros órganos. [13,14]

Carcinoma lobular invasivo

Es un cáncer con capacidad de metástasis por la gran cantidad de irrigación que tiene esta zona de la mama, el cáncer inicia en los lóbulos de la glándula y es muy difícil de encontrar en la mamografía, por lo cual es uno con las mayores tasas de mortalidad. [15,16]

Cáncer de Mama inflamatorio

Comprende del 1-3% de los canceres de mama, es originada por el daño en las células de los conductos linfáticos generando edema enrojecimiento y datos de congestión y calor local, en etapas tempranas se le llega a confundir con las mastitis, sin embargo a pesar del tratamiento antibiótico no mejora y aumenta de tamaño de color y de inflamación, si se sospechara de esta patología, se corroboraría el diagnóstico con una biopsia, tiene un mal pronóstico por la confusión en el diagnóstico diferencial que podría ocasionar.

Enfermedad de Paget

Se le denomina así, cuando el cáncer ductal avanza hasta la piel generando lesiones dérmicas así como lesiones en el pezón, cambios de coloración, secreción blanquecina o hemática por el pezón y areola. [15, 16,17]

Tumor Phyllodes

Es ocasionado por la formación de masas cancerígenas de tejido conectivo adyacente a la glándula mamaria, pueden ser malignos o benignos y tienen alto grado metastásico por lo que la extirpación de la mama es necesario en la mayoría de los casos. [16]

Angio sarcoma

Es un tumor de la mama ocasionado por la diferenciación de las células de los vasos ya sea linfáticos o del torrente sanguíneo, generando linfedema en la región afectada.

Los tipos más raros, con mejor pronóstico son los siguientes:

- Carcinoma adenoide cístico
- Carcinoma adenoescamoso de bajo grado
- Carcinoma medular
- Carcinoma mucinoso
- Carcinoma papilar
- Carcinoma papilar
- Carcinoma tubular

Los siguientes subtipos son los que tienen un peor pronóstico:

- Carcinoma metaplásico
- Carcinoma micropapilar
- Carcinoma mixto [12,17,18]

Para la estadificación se utiliza el sistema TNM el cual se mencionará a continuación:

La T se utiliza para evaluar el tumor primario, se clasifica del 0 al 4 y describe el tamaño y cantidad de invasión que haya afectado, entre mayor sea el número se tiene un peor pronóstico.

TX el tumor no puede ser evaluado

Tis carcinoma in situ

T1 es un tumor de 2 cm o menos

T2 tumor mayor a 2cm pero menor de 5cm

T3 tumor mayor de 5 cm lo largo.

T4 es un tumor grande que involucra piel cavidad torácica

La N nos habla el avance que tiene el tumor invasivo en nuestro organismo

Se clasifica por la cantidad de ganglios afectados, esta se enumera del 1-3, para que se considere un nódulo metastásico, se pone al microscopio y tiene que tener más de 200 células cancerígenas o tener menos de 2 mm, si no tiene estas características, no se clasifica en un rango más alto, sin embargo se notifica si se han encontrado rastros de células cancerígenas por otros métodos de laboratorio colocando una L- o mol+ indicando el tipo de prueba que se utilizó.

Cuando el área es al menos de 2mm o de 200 células pero no es mayor a este número se le llama micrometástasis, sólo se considera de esta manera cuando no hay diseminación en ningún otro ámbito.

Áreas mayores de 2mm que afectan los tejidos adyacentes cambian la clasificación de N y pueden denominarse macro metástasis o metástasis.

NX: No hay nódulos cercanos que se puedan evaluar, como en el caso de remoción por cirugía.

NO: el cáncer no se diseminó a nódulos linfáticos cercanos.

NO i+: el área de invasión del cáncer es de menos de 2mm y menos de 200 células la abreviación significa que se encontraron células aisladas por método de inmunohistoquímica

NO mol+: no se observan células cancerígenas en los nódulos linfáticos cercanos por microscopia, pero hay muestras de células cancerígenas obtenidas con PCR RT

N1: El cáncer se ha diseminado de 1-3 nódulos linfáticos abajo del brazo o pequeñas cantidades de células se encuentran en los ganglios linfáticos mamarios en una biopsia de ganglio centinela

N1 mi: micrometástasis pequeñas áreas de diseminación de 1 a 3 nódulos linfáticos con tamaño de 2mm con al menos 200 células cancerígenas

N1a: diseminación de 1 a 3 nódulos linfáticos abajo del brazo con al menos una área mayor a 2 mm

N1b: diseminación hacia ganglios linfáticos internos de la mama solo se pueden encontrar con biopsia de ganglio en centinela

N1C: se encuentra en esta categoría los que tienen tanto N1a y N1b

N2: cáncer se ha diseminado de 4 a 9 ganglios linfáticos, o el cáncer se ha diseminado a ganglios internos mamarios.

N2a: se ha diseminado de 4 a 9 ganglios linfáticos con al menos uno mayor de 2mm

N2b: diseminación y aumento de tamaño de uno o más ganglios linfáticos mamarios internos.

N3 se divide de la siguiente manera:

N3a: diseminación del cáncer a más de 10 ganglios linfáticos axilares con al menos uno mayor a 2 mm, o el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos infraclaviculares.

N3b: es cuando el cáncer se encontró en al menos un ganglio axilar con un área mayor de 2mm o cáncer ha llegado a 4 ganglios linfáticos axilares y pequeñas muestras en ganglios mamarios interno en biopsia de ganglio en centinela

N3c: se ha diseminado a ganglios linfáticos supraclaviculares y al menos uno con un tamaño mayor de 2mm.

METÁSTASIS

La letra M solo tiene dos categorías la 0 y la 1 y se utiliza cuando ha alcanzado órganos distantes como pulmones o hueso:

MX: no se puede apreciar metástasis en lugares alejados

M0: no se encuentra metástasis en rayos X o exámenes físicos

cM0 i+: se encuentran pequeñas cantidades de células cancerígenas en sangre o médula ósea o pequeñas área de menos de 2mm se encuentran en nódulos linfáticos

M1: el cáncer se ha diseminado a órganos alejados como pulmones, hueso, cerebro o hígado

Esta estadificación es la más utilizada y dependiendo de cada grado se localiza al cáncer en un estadio que se muestra en la Tabla 1.

| ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS | | | |
|----------------------------------|-------|-------|----|
| Stage 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stage IA | T1* | N0 | M0 |
| Stage IB | T0 | N1mi | M0 |
| | T1* | N1mi | M0 |
| Stage IIA | T0 | N1** | M0 |
| | T1* | N1** | M0 |
| Stage IIB | T2 | N0 | M0 |
| | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Stage IIIA | T0 | N2 | M0 |
| | T1* | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| Stage IIIB | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| | T4 | N2 | M0 |
| Stage IIIC | Any T | N3 | M0 |
| Stage IV | Any T | Any N | M1 |

Los estadios van con valores del 0 al IV dependiendo de la clasificación del TNM. [3, 18, 19,20]

1.2.6 NUTRICIÓN Y CÁNCER

La nutrición se ha vuelto uno de los pilares esenciales en el tratamiento de los pacientes con cáncer, los cambios metabólicos en los pacientes les hace requerir una dieta especial, además que el tratamiento en si deteriora la mayor parte de mecanismos metabólicos regulativos que tiene un ser humano normal para poder realizar el adecuado manejo energético propio [21].

La alimentación en si es un factor de riesgo, el sobrepeso es considerado un factor de riesgo para los cánceres más comunes, la dieta hipercalórica y con abundantes azúcares refinados aumentan el riesgo de cánceres que intervienen con el tracto digestivo, además de otros factores como la dieta baja en fibra, el alto consumo de carnes rojas, un des balance del consumo de ácidos omega 3 y omega 6 [22]. Lamentablemente ninguna de estos factores de riesgo se sabe cómo es que llegan

a aumentar la posibilidad de desarrollar esta patología pero evitarlo puede mejorar la calidad de vida de los pacientes [21].

En el cáncer de mama hay ciertas recomendaciones que podemos sugerir a nuestros pacientes para que ayuden de otra manera a su recuperación y tratamiento, así como una forma de sentirse mejor con una alimentación balanceada y específica para ellas [23, 24,25]. Actualmente existen muchas guías que nos hablan sobre la alimentación en el cáncer de mama, pero todas coinciden que lo principal es tratar al paciente dependiendo de su estado físico, de acuerdo a sus dolencias y a sus problemas particulares, como por ejemplo si es una paciente con sobrepeso tratar de llevarla a su peso ideal con una buena nutrición, si es que ha bajado de peso aumentar el aporte calórico a base de proteínas, evitar la desmineralización ósea, así como la administración de suplementos alimentarios de ser necesarios [26.27].

1.2.7 OBESIDAD Y CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una patología con múltiples factores de riesgo, entre ellos podemos encontrar la falta de amamantamiento, la menarca temprana, la menopausia tardía, y muchos otros que han sido demostrados que influyen en la aparición de esta patología.[28,29,31] La obesidad es considerado uno de los factores de riesgo muy importantes, aumenta el riesgo de cáncer en un 12 %, otras razones importantes por las cuales se debe considerar es por su incidencia, por el riesgo a la salud del paciente, así como todo lo que conlleva, las comorbilidades asociadas, los hábitos dietéticos, la actividad deportiva, y el consumo de sustancias nocivas para el organismo.[28]

La obesidad da características únicas a las pacientes con cáncer de mama, principalmente en pacientes menores de 50 años se encontró una relación con tumores con marcadores tumorales ER- /PR- , estos datos nos sugieren una relación con la expresión del marcador tumoral con la presencia de estrógenos y la cantidad de masa adiposa.[32] También se encontró que en estas pacientes tener

una cantidad normal de estrógenos sanguíneos disminuían el riesgo de presentar cáncer, por lo cual a pesar de tener obesidad la probabilidad de aparición es menos. [30]

En México se ha encontrado que el Índice de Masa Corporal (IMC) en pacientes pre menopáusicas van inversamente asociados con el riesgo de padecer cáncer de mama, al igual que tener un tamaño grande en cintura, cadera y radio de cintura-cadera disminuía el riesgo de tener cáncer de mama en estas pacientes, posteriormente a la menopausia esto cambiaba generando mayor riesgo conforme aumenta la cintura la cadera el IMC y el Radio cintura-Cadera. [31,33]

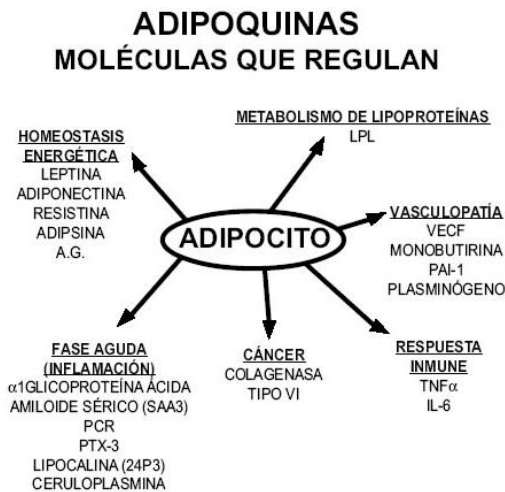


Figura 3. Tejido adiposo como órgano secretor.
Obtenido de
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482005000300004

La obesidad puede favorecer la causa de cáncer por la adiponectina la cual es un inhibidor de la proliferación celular y es inversamente proporcional a la masa corporal, lo cual nos sugiere que un aumento en la masa corporal disminuye esta hormona con lo que hay un aumento en la proliferación celular desmedida. En la obesidad debido a los altos grados de adiposidad presentada se incrementa la cantidad de Factor de Necrosis tumoral alfa, la cual al ser una citosina pro inflamatoria, puede ayudar a la formación

del tumor, aunque todavía su mecanismo no ha sido bien estudiado. [34]

La leptina es otra de las hormonas producida por persona obesas que influyen en la formación y evolución de esta patología, realizando cambios en la metilación de genes los cuales aceleran el crecimiento, la angiogénesis y la proliferación de células tumorales, además de aumentar las citosinas pro inflamatorias en el organismo. [35]

Existen otros mecanismo por los cuales, la obesidad aumenta la probabilidad de generar cáncer de mama, por lo que es necesario encontrar con la epigenética alguna relación entre el cáncer de mama y la obesidad, esto ayudaría en la importante tarea de prevenir la asociación de este factor de riesgo con el cáncer de mama así como disminuir la exposición a cualquier mujer con este tipo de factores de riesgo, además se ha demostrado que un plan alimenticio completo basado en alto contenido de fibra y bajo en grasas y azúcares refinados, como una reducción del peso, y un aumento de la actividad física aumenta de manera considerable la supervivencia en pacientes ya diagnosticados con esta patología. [29, 34,35]

La mortalidad del cáncer de mama asociado con obesidad, cambia de acuerdo a ciertos aspectos étnicos, ya que en varios estudios se ha encontrado que la mortalidad es mayor en mujeres no hispánicas y en afroamericanas, que en mujeres hispano americanas, dándose muy pocas explicaciones a esto, algunas de ellas son por genética, así como alimentación pero no se encuentra todavía la relación entre ellas. [36,37]

2.0. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. METILACIÓN Y CÁNCER

La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina 1. El ADN presenta regiones de 1000–1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas ADN–metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN [38,39]. En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación *de novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la pérdida de metilación genómica

(hipometilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad. [40]

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de la islas CpG de genes constitutivos y supresores de tumor. [38,39,40,41] Los dos niveles de metilación pueden presentarse en forma individual o simultánea; en general la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobre-expresión de genes de proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis [41].

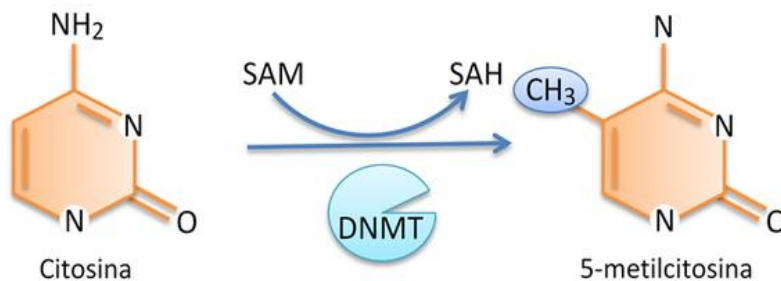


Figura 4. Metilación de ADN. Obtenida de: <https://geneticamolecularunlar.wikispaces.com/3.+MECANISMOS+DE+ALTERACI%C3%93N>

Las estrategias metodológicas para el análisis del estado metilado de las islas CpG han estado en constante evolución y actualmente se cuenta con diversas técnicas que comparten estándares universales, óptima sensibilidad y reproducibilidad [39]. El éxito de la mayoría de los métodos depende de la transformación química de las citosinas no metiladas a uracilos, por el tratamiento con bisulfito de sodio, que no afecta las 5-metilcitosinas, y marca de forma fidedigna e individual el estado metilado o no metilado de los dinucleótidos CpG. La modificación del ADN, su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o secuenciación automatizada son las técnicas más usadas con este propósito.

En los últimos años la tecnología basada en el análisis del ADN metilado es considerada una poderosa herramienta para el diagnóstico, terapia y pronóstico de enfermedad, así como en el campo de la medicina forense, farmacogenética y en estudios epidemiológicos. La asociación entre el estado hipometilado del ADN y cáncer, y posteriormente su relación con la hipermetilación se conocen desde 1983; sin embargo, en los últimos cinco años, por el impulso de las nuevas estrategias moleculares para el estudio de la metilación *de novo* de las islas CpG, el análisis del ADN metilado se ha convertido en un poderoso biomarcador para la detección temprana de cáncer [40]; además, permite clasificar los cánceres considerando los subtipos histológicos, el grado de malignidad, diferencias en la respuesta al tratamiento y los diversos pronósticos.[41] Una importante y reciente aplicación es precisamente su uso como biomonitor de respuesta a la terapia y predictor del pronóstico del cáncer [39].

En la actualidad, los cánceres de próstata, hígado, estómago, colon y mama son detectados, con alta especificidad, utilizando ADN obtenido de fluidos corporales (orina, plasma, suero, saliva, entre otros), sangre o biopsias de tejidos, mediante el análisis de la hipermetilación de genes, cuyos productos tienen diversas funciones como: proteínas tumor supresor (INK4A, INK4B, APC), enzimas (GSTP1, MGMT, DAPK1), receptores(RARB), asociadas a muerte celular programada (DAPK1), adhesión celular (CDH1) y reguladoras de cinasas (CCND2) [39].

Recientemente, Guo y colaboradores mediante la variación de los patrones de metilación de 38 genes demostraron que los linfomas de células B pequeñas pueden distinguirse en los subtipos: leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma de células del manto y linfoma folicular grado I y II [42].

La metilación del ADN es un marcador epigenético del silenciamiento de genes con aplicación en diversos campos de investigación de la genética, la biomedicina y la nutrición clínica, que mediante la aplicación de procesos metodológicos moleculares permite la distinción fidedigna e individual de los patrones de metilación de las islas

CpG. Es indiscutible el impacto del uso de biomarcadores de metilación en la detección oportuna de un gran número de cánceres humanos cuando se encuentran en estadios tempranos, lo cual incide en la planeación de una estrategia terapéutica específica. Por otra parte, de acuerdo a las características de metilación de los genes involucrados en la neoplasia permite la clasificación, el pronóstico para los pacientes así como el biomonitoreo del tratamiento y las conductas a seguir en la terapia nutricional.

2.2. DACT2

Este gen es un miembro de la familia *dapper* evolutivamente conservado, fue identificado como un antagonista de la señalización TGF- β /Nodal y es un factor importante en el desarrollo normal de los vertebrados (43,44). En el pez cebra *dpr2* (DACT2) suprime la inducción de mesodermo mediada por Nodal al promover la degradación lisosomal de los receptores de TGF- β , ALK4 y ALK5 (45). Es esencial para el movimiento de extensión convergente durante la gastrulación y actúa como un potenciador de la señalización no canónica de Wnt (46). A diferencia del pez cebra, en roedores DACT2 se expresa en las 3 capas germinales durante la gastrulación y localiza al receptor de TGF- β tipo I, ALK5, para su degradación (43). Ratones *knockout* para DACT2 mostraron re-epitelización acelerada durante la cicatrización, lo que se asocia con una respuesta potenciada a la señalización de TGF- β (47). Por todo esto se piensa que DACT2 debe tener un papel importante en el desarrollo del cáncer, aunque a la fecha se sabe poco sobre su papel en tumorigénesis.

Entre los pocos antecedentes sobre la participación de DACT2 en el proceso tumoral se encuentran los trabajos de Hou *et al*, (48) quienes observaron que a mayor cantidad de proteína DACT2 mejor era la tasa de sobrevivencia en pacientes con carcinoma esofágico de células escamosas. Mientras que la expresión restaurada de DACT2 *in vitro* reduce significativamente el crecimiento, migración e invasión de las células tumorales. Al parecer la restauración de su expresión

suprime la actividad de TGFb/SMAD2/3 por medio de la degradación a través de la vía lisosomal o el proteosoma, conduciendo a un rearrreglo de la actina F que puede depender de la participación de las proteínas cofilina y ezrina-redixina-moesina. Por otro lado, Li *et al.*, (49) analizando carcinoma nasofaríngeo encontraron metilación de reguladores de la señalización de Wnt como DACT2. Observaron silenciamiento del gen por metilación de su promotor en líneas celulares y tumores primarios pero no en células epiteliales nasofaríngeas normales. En un estudio en líneas celulares de cáncer de colon y en ratones desnudos Wang *et al* (50) obtienen datos similares a los obtenidos en otras líneas tumorales.

2.3. PHF20L1

La proteína finger PHD 20-like 1 forma parte del complejo de múltiples subunidades histona acetiltransferasa humana involucrado en la acetilación de histonas y modificación postraduccional. Es un ortólogo cercano a PHF20 y actualmente poco se sabe de su función (51).

En un análisis realizado recientemente se encontró que en cáncer de mama hay amplificación y sobreexpresión de manera prevalente en los subtipos agresivos basal-like y luminal B, por lo que se ha asociado fuertemente con mal pronóstico de sobrevivencia en pacientes con cáncer de mama. La proteína PHF20L1 contiene los dominios N terminal de Tudor y el C-terminal del homeodominio de planta PHD y la caracterización detallada de PHF20L1 en cáncer de mama reveló que el dominio Tudor puede tener un papel crítico en promover el cáncer (52). Participa en el recambio de la metiltransferasa 1(DNMT1) a través de la unión de su dominio MBT (tumor cerebral maligno) de lo que se ha deducido que su dominio MBT es un dominio lector que controla los niveles enzimáticos de DNMT1 metilado (53). Sin embargo, poco se sabe sobre su estado de metilación en los tumores.

2.4. Nutrición y Metilación en Cáncer

Dentro del campo de la nutrición clínica la genética funge un papel importante, porque los nutrimentos y los componentes bioactivos de los alimentos pueden llegar a alterar la expresión de genes a nivel transcripcional (54). La epigenética (del griego epi, en o sobre, y -genética) hace referencia al estudio de los factores que, sin corresponderse a elementos de la genética clásica, básicamente los genes, juegan un papel muy importante en la genética moderna interactuando con estos primeros. La rama de la nutrición que estudia estos procesos se conoce como nutrigenómica cuyo objetivo es entender cómo los nutrimentos que incorporamos en la dieta influyen en la homeostasis celular, alterando la actividad génica, la producción de proteínas y/o la producción de metabolitos y como la genética influye en el metabolismo de los nutrimentos. (55)

Los componentes de la dieta pueden alterar la expresión genómica de manera directa o indirecta celularmente hablando de la siguiente manera (56):

- 1.- Actuando como ligandos para la activación de factores de transcripción que favorezcan la síntesis de receptores.
- 2.- Metabolizándose por rutas metabólicas primarias o secundarias y alterando de este modo la concentración de sustratos o intermediarios.
- 3.- Influyendo de modo negativo o positivo en las rutas de comunicación intracelular, en diferentes procesos metabólicos.

Existen varios factores que influyen en las alteraciones epigenéticas (hipermetilación e hipometilación) de las células que conllevan al cáncer, entre ellas los compuestos bioactivos de los alimentos que conforman la dieta. El folato, la vitamina B12, la metionina, la colina y la betaina pueden modificar la metilación del ADN y la histona a través de la alteración del metabolismo de compuestos de Carbono-1. Resultando los dos metabolitos (S-adenosilmetionina, S-Adenosilhomocisteína) del metabolismo de los compuestos de carbono-1 los que

pueden afectar la metilación del ADN y de las histonas, y teóricamente cualquier nutrimento, componente bioactivo o condición afectar los niveles tisulares de los mismos. (54)

Por otro lado los compuestos bioactivos de los alimentos afectan de manera directa las enzimas involucradas en los mecanismos epigenéticos, como la genisteína y las catequinas presentes en el té y la soya las que afectan las metiltransferasas del ADN. (54)

Ahondando un poco más en el tema y siendo más específicos con los nutrimentos nos enfocaremos a los nutrimentos que afectan el estado metilado o desmetilado del ADN (54): Ácido fólico (leguminosas, menudencias y verduras de hoja verde), vitaminas del complejo B (leguminosas y cereales integrales), colina (yema de huevo), betaína (legumbres, leche y huevo) y la genisteína (soya y té): tiene la capacidad de donar un grupo metilo favoreciendo la metilación del ADN.

Considerando lo anterior si la dieta es pobre en estos nutrimentos, la célula no podría incorporar el grupo metil necesario para síntesis de ADN, generando una hipometilación global del ADN y la sobreexpresión de los diversos genes. (54)

Hoy en día aunque se requiere de un grado mayor de evidencia de causalidad para generar resultados de estudios epidemiológicos que posteriormente se puedan establecer como recomendaciones públicas, la genómica nutricional sigue avanzando a pasos agigantados acercándonos más a que la nutrición personalizada sea posible y exitosa. (56)

3.0. JUSTIFICACIÓN

Cada día se hace más evidente que el desarrollo y progresión de un cáncer no solo pueden estar ligados a mutaciones durante su inicio o progresión, sino también a modificaciones epigenéticas. Dado que el cáncer es un padecimiento multifactorial,

aún se desconocen todos los factores que conllevan al aumento en el índice tanto de incidencia como de mortalidad. A la fecha, existen pocos estudios sobre los patrones de metilación en cáncer de mama en México. Durante el desarrollo de este trabajo se hizo una búsqueda de genes con patrones de metilación alterados para finalmente seleccionar dos genes con una participación potencial en metástasis. DACT2 y PHF20L1. Se ha propuesto que DACT2 sirve como un marcador pronóstico que reduce la malignidad de las células tumorales en carcinoma esofágico, mientras que se ha encontrado metilado en cáncer de colon con una consecuente disminución en la supervivencia. Por otro lado, en cáncer gástrico se encontró que la metilación se asocia con la diferenciación e invasión del tumor y la formación de émbolos tumorales intravasculares. Estos antecedentes nos permiten ver el potencial de estudiar las modificaciones epigenéticas de este gen en cáncer de mama. Mientras que en el caso de PHF20L1 se sugirió que su función en la regulación de la metilación del DNA en el cáncer de mama se debe a la sobreexpresión de la proteína en subtipos tumorales agresivos y por lo tanto se encuentra implicado en una supervivencia más corta, pero su patrón de metilación apenas está comenzando a estudiarse.

3.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la asociación entre el estado de metilación de diversos genes y el desarrollo de cáncer, se eligió realizar un estudio para evaluar el patrón de metilación en genes involucrados en metástasis como DACT2 y PHF20L1 en una población de mujeres con cáncer de mama. Estos genes son potenciales marcadores de diagnóstico y/o pronóstico, por lo que es útil conocer su estado de metilación en particular en cáncer de mama debido al incremento de esta patología en la población.

3.1.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre el patrón de metilación de los genes DACT2 y PHF20L1 con el estadio tumoral en pacientes con cáncer de mama?

4.0. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Analizar la metilación en los genes DACT2 y PHF20L1 involucrados en metástasis en pacientes con cáncer de mama para determinar la relación entre metilación y el estadio tumoral

4.2. ESPECÍFICOS

- Convertir el DNA obtenido de los tejidos mediante el uso de bisulfito de sodio
- Analizar las secuencias de los promotores de DACT2 y PHF20L1 para localizar las islas CpG
- Diseñar los oligonucleótidos para el análisis de la metilación por PCR
- Determinar el estado metilado o desmetilado de las regiones promotoras de los genes DACT2 y PHF20L1 en los tejidos tumorales
- Establecer si hay relación entre el estadio tumoral y la metilación o desmetilación de los promotores de los genes DACT2 y PHF20L1
- Determinar si existe alguna relación entre la metilación de los promotores de los genes DACT2 y PHF20L1 con el sobrepeso y obesidad de las pacientes con cáncer de mama

5.0. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO DE ESTUDIO

5.1.1. Tipo de Estudio: estudio descriptivo.

5.1.2. Características de Estudio: estudio observacional, transversal, prospectivo, multicéntrico y homodémico.

5.2. MUESTREO

5.2.1. Población de estudio

Los DNA fueron obtenidos de pacientes mexicanas con padres y abuelos nacidos en México que firmaron una carta de consentimiento informado. Por lo que en este trabajo no se tuvo contacto directo con las pacientes sino solo con el material genético proveniente de las biopsias que fueron tomadas en el Centro Médico Nacional La Raza.

5.2.2. Selección de la muestra

El estudio se realizó a partir de DNA proveniente de tumores mamarios esporádicos de cualquier estadio, vírgenes a tratamiento y de DNA de tejido mamario sano adyacente como control.

5.2.3. Criterios de inclusión

El DNA provino de mujeres que cumplieron con los siguientes criterios:

- Mujeres con CM en cualquier estadio clínico, sin tratamiento previo de quimioterapia o radioterapia.
- Que acepten participar en el estudio.
- Mujeres mexicanas con padres y abuelos nacidos en México.
- Carta de consentimiento informado firmada.

5.2.4. Criterios de exclusión

- Mujeres con CM en cualquier estadio clínico, con tratamiento previo de quimioterapia o radioterapia.
- Mujeres que no acepten participar en el estudio.

6.0. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

6.1. Conversión con bisulfito de sodio

La conversión del DNA se realizó utilizando el protocolo estándar Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA (Quiagen, Valencia, CA, USA).

Las reacciones de bisulfito se prepararon en tubos para PCR de 200 μ L de acuerdo a la siguiente tabla:

| COMPONENTE | VOLUMEN POR REACCION |
|----------------------|-------------------------|
| DNAg (1 ng-2ug) | Variable (Máximo 20 uL) |
| Agua libre de RNAsas | Variable |
| Bisulfite Mix | 85 |
| Buffer DNA protect | 35 |
| Volumen total | 140 |

Tabla 2. Preparación de reacciones de bisulfito.

Una vez realizadas las reacciones los tubos se cerraron y se mezclaron. El buffer *DNA protect* cambió de color verde a color azul, lo que fue el indicativo de un buen mezclado y un pH adecuado para la reacción de bisulfito. Posteriormente se centrifugaron brevemente los tubos para bajar cualquier residuo de líquido de sus paredes. Finalmente, para llevar a cabo la conversión del DNA con el bisulfito de sodio, los tubos se colocaron en el termociclador usando las siguientes condiciones de ciclado:

| PASO | TEMPERATURA (°C) | TIEMPO (minutos) |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Desnaturalización | 95 | 5 |
| Incubación | 60 | 25 |
| Desnaturalización | 95 | 5 |
| Incubación | 60 | 85 |
| Desnaturalización | 95 | 5 |
| Incubación | 60 | 175 |
| Hold | 20 | Indefinido |

Tabla 3. Condiciones de ciclado.

6.2. Purificación del DNA convertido con bisulfito

La purificación del DNA transformado se llevó a cabo a temperatura ambiente usando el kit antes mencionado para la conversión de DNA con bisulfito, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, al DNA tratado con bisulfito se le agregaron 560 μ L de buffer BL y se resuspendió la mezcla, posteriormente la mezcla se transfirió a una columna y se centrifugó a 12 000 rpm un minuto, se desechó el filtrado. Se realizó un lavado agregando 500 μ L de buffer BW, se centrifugó a 12 000 rpm un minuto desechando el filtrado. A continuación se llevó a cabo la desulfonación del DNA convertido agregando 500 μ L de buffer DB e incubando la columna por 25 minutos para posteriormente centrifugar a 12 000 rpm un minuto desechando el filtrado. Una vez concluido este paso se hicieron dos lavados con 500 μ L de buffer BW, centrifugando a 12 000 rpm un minuto y desechando el filtrado en ambos lavados. Finalmente se hizo la elución del DNA convertido agregando 55

μL de buffer EB calentado a 60°C en dos pasos. En el primer paso se pusieron 40 μL de buffer EB y en el segundo los 15 restantes, en cada caso se incubó por 10 minutos y se centrifugó a 12 000 rpm un minuto sin desechar el filtrado que contenía el DNA.

El DNA transformado se almacenó a -20°C previa medición en el espectrofotómetro.

6.3. Diseño de oligonucleótidos metilados y desmetilados para DACT2 y PHF20L1

Los oligonucleótidos fueron creados utilizando los programas EPD y Methprimer para localizar la región promotora de los genes y la posterior ubicación de las islas CpG para el diseño de los iniciadores que incluyeran la región promotora Figuras 5 y 6.

Figura 5.

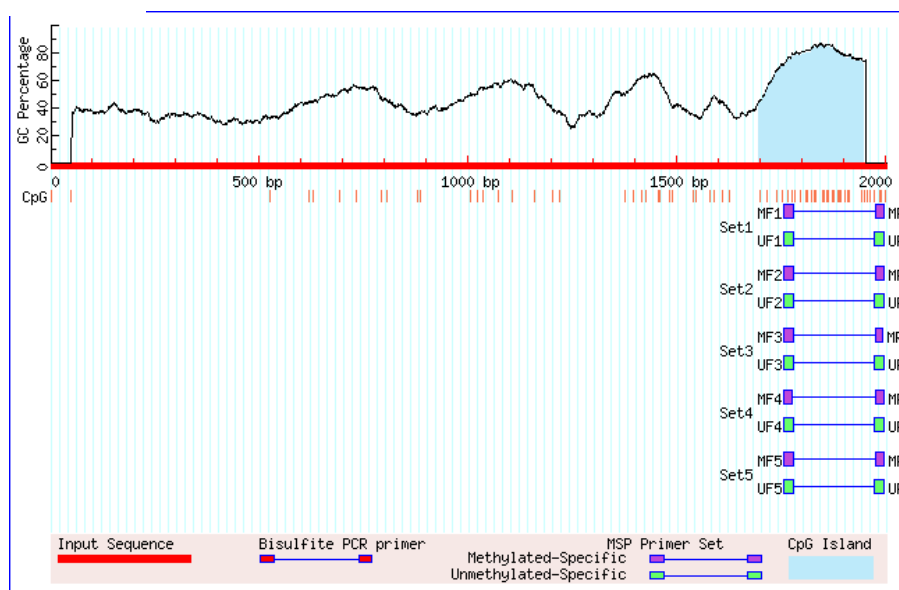


Figura 6.

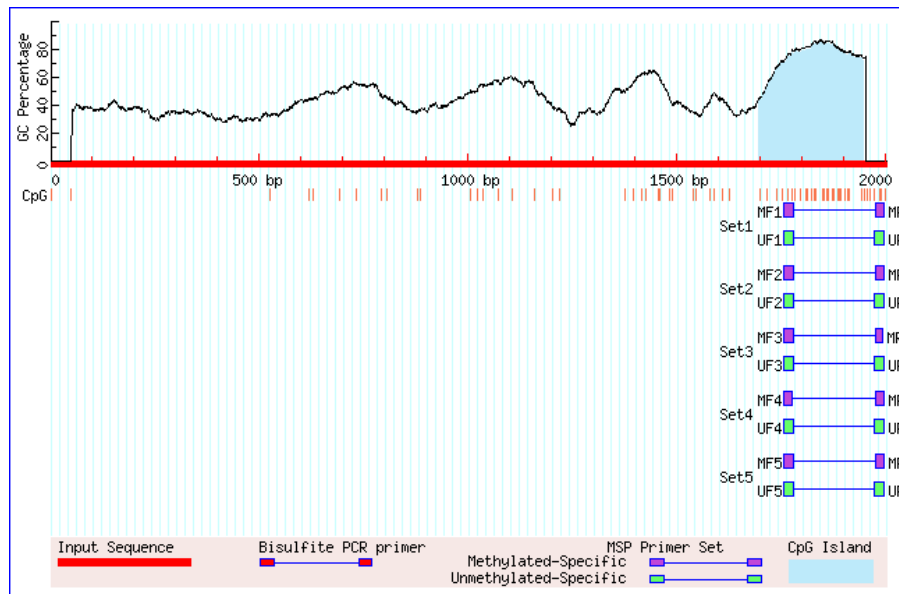


Figura 5-6. Imagen de la ubicación de la isla CpG (región marcada en azul) donde se encuentra el promotor para el gen 5) DACT2 y 6) PHF20L1.

6.4. Análisis de metilación

Para el análisis MSP se usaron 0.5 ng de DNA tratado con bisulfito por muestra para la detección de metilación. Se incluyeron también DNAs control para metilación, desmetilación y DNA genómico no tratado, se trata de controles certificados obtenidos a través de la Compañía Qiagen.

El DNA tratado con bisulfito fue amplificado con oligonucleótidos específicos para metilación y oligonucleótidos específicos de desmetilación. Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

Para DACT2

Primers metilados:

5'-GGAGGCGTTTAGTTGGTTTC-3' y 3'-ATCCCGAACTATATCGCGAA-5' para amplificar un producto de 226 pb.

Primers no metilados:

5'- AGGTGTTTAGTTGGTTTTGG-3' y 3'- AATCCCAAACCTATATCACAAA-5' para amplificar un producto de 225 pb.

Para PHF20L1**Primers metilados:**

5'-TTAAGAATAATAAATAATGTTTTTCGT-3' y 3'-
GTAACCTCACGAAAATTAACCCCG-5' para amplificar un producto de 204 pb.

Primers no metilados:

5'-AAGAATAATAAATAATGTTTTTTGT-3' y 3'-
ATAACTCACAAAATTAACCCCAA-5' para amplificar un producto de 202 pb.

La reacciones de PCR se hicieron en un termociclador Axygen Maxygen II (Axygen, USA), se usó el kit EpiTect MSP (Quiagen, USA) de la siguiente manera: Master mix 2X 5 μ L, primers sentido y antisentido 2 μ L, DNA 15 ng, agua suficiente para un volumen final de reacción de 10 μ L.

Se usaron las siguientes condiciones de ciclado:

Tabla 4. Condiciones de ciclado.

| PASO | TEMPERATURA (°C) | TIEMPO |
|--------------------------|-----------------------------|---------------|
| Desnaturalización | 95 | 10 minutos |
| Desnaturalización | 95 | 15 segundos |
| Alineamiento | 59, 53, * | 30 segundos |
| Extensión | 72 | 30 segundos |
| Extensión | 72 | 10 minutos |

| | | |
|-------------|---|------------|
| Hold | 4 | Indefinido |
|-------------|---|------------|

Los pasos sombreados se repitieron durante 40 ciclos

* Se señalan las temperaturas para DACT2 Met, DACT2 UnMet, PHF20L1 Met y PHF20L1 UnMet, respectivamente.

6.5. Análisis Estadístico

El análisis de la asociación entre metilación de DACT2 y PHF20L1 con el estadio tumoral se realizó mediante la prueba de χ^2 .

7.0. RESULTADOS

7.1. Características de las pacientes con cáncer de mama y controles.

Se obtuvieron 100 muestras de DNA, 80 de tejido tumoral y 20 de tejido sano adyacente, ya que no fue posible obtener tejido sano en todos los casos. Sin embargo, solo hubo DNA suficiente para analizar 76 muestras de tejido tumoral.

La edad de las pacientes a partir de las cuales se obtuvieron los DNAs fue de 32 como la edad mínima y 87 años como edad máxima. El promedio de edad en las mujeres incluidas en este estudio fue de 59 años. Con respecto al peso, la mayoría de ellas tuvieron sobrepeso y obesidad como se puede observar en la tabla 5.

| TABLA 5. PESO DE LAS PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA | | |
|--|-------------|----------|
| Peso | N=76 | % |
| Normal | 11 | 14.47 |
| Sobrepeso | 29 | 38.15 |
| Obesidad | 22 | 28.94 |

| | | |
|-------------|----|-------|
| Desconocido | 12 | 15.78 |
|-------------|----|-------|

Fuente: Información obtenida de cuestionarios aplicados a las pacientes.

En la tabla 6 se presentan los datos de los estadios tumorales de las pacientes de cáncer de mama de este estudio:

| TABLA 6. CARACTERISTICAS DE LOS ESTADIOS TUMORALES | | |
|---|-------------|-------------------|
| TIPO DE TUMOR | N=76 | PORCENTAJE |
| ECI | 2 | 2.63 |
| ECIIA | 10 | 13.15 |
| ECIIB | 20 | 26.31 |
| ECIIIA | 12 | 15.78 |
| ECIIIB | 21 | 27.63 |
| ECIIIC | 11 | 14.47 |

Fuente: Información obtenida del expediente clínico de las pacientes.

Las características histopatológicas de las pacientes fueron las siguientes, el diagnóstico que predominó fue cáncer ductal (Tabla 7).

| TABLA 7. VARIEDAD HISTOLÓGICA DE CANCER DE MAMA | | |
|--|-------------------|-------------------|
| Diagnóstico Histopatológico | Frecuencia | Porcentaje |
| Carcinoma ductal infiltrante | 55 | 72.4% |
| Carcinoma lobulillar | 16 | 21% |
| Otros | 5 | 6.6% |

Fuente: Información obtenida del expediente clínicos de las pacientes.

7.2. Extracción de DNA

Ya que en este proyecto se trabajó directamente con el DNA, no se hizo ninguna extracción del ácido nucleico, solo se verificó su integridad. Para verificar la integridad y calidad del DNA, se hicieron electroforesis en geles de agarosa al 1%, con Buffer TBE 1X (Invitrogen, Life Technologies, E.U.). El DNA fue cuantificado en el Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 100 Spectrophotometer).

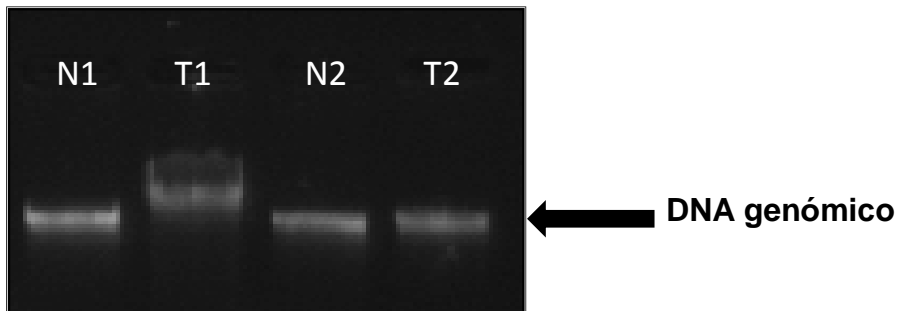


Figura 7. Imagen de un gel de agarosa al 1% donde se observan algunas muestras representativas de los DNAs con los que se trabajó, se puede observar la integridad del DNA proveniente de las muestras tumorales y de DNA sano adyacente. N: DNA sano adyacente. T: DNA de tejido tumoral.

7.3. Conversión y purificación con bisulfito de sodio

Como en la técnica de conversión del DNA con bisulfito el fundamento es que las citosinas no metiladas del DNA son transformadas en uracilo, mientras que las citosinas metiladas se mantienen sin cambio, se hizo la conversión de las muestras de DNA recolectados para conocer cuales muestras tenían cambios en la metilación de los promotores de los genes DACT2 y PHF20L1. Los DNAs fueron convertidos utilizando el kit Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA y luego fueron purificados para eliminar los restos de bisulfito.

7.4. Análisis de metilación para DACT2

Se hicieron las reacciones de PCR para amplificar las regiones de interés mediante el análisis por PCR específica de metilación (MSP).

Inicialmente se estandarizaron los controles utilizados para cada gen, para validar los resultados obtenidos con las muestras y los tejidos sanos adyacentes. En la figura 8 se pueden ver los productos amplificados para los controles del gen DACT2. Posteriormente al realizar cada corrida se incluyeron todos los controles, es decir, control de DNA genómico, control del DNA metilado, control de DNA no metilado y control negativo.

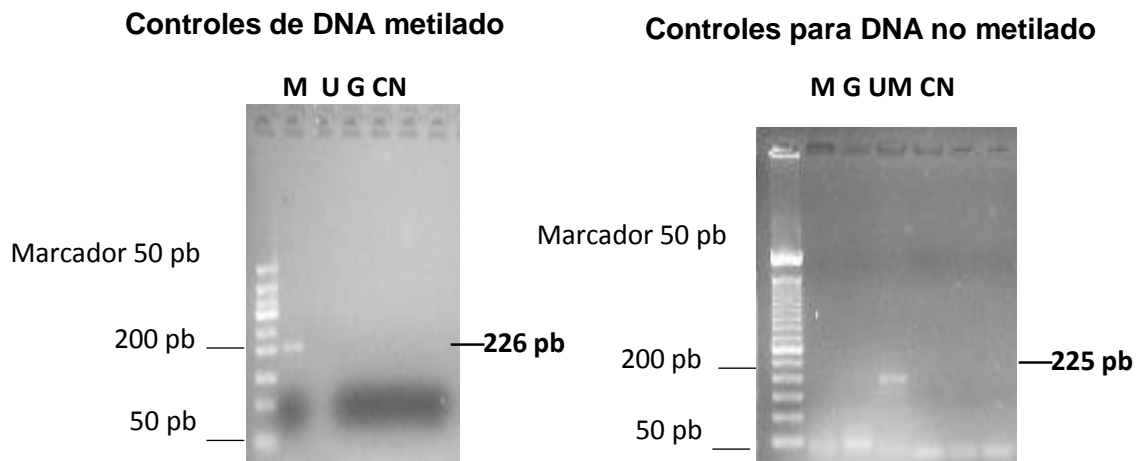


Figura 8. Controles de DNA para DACT2. Se pueden observar los controles para el DNA metilado donde se corrobora que los iniciadores dan un producto de 226 pares de bases, mientras que el caso de los controles no metilados, los iniciadores dan lugar a un ampliación de 225 pares de bases. M: metilado, U: no metilado, G: DNA genómico no transformado, CN: control negativo (sin DNA).

En la figura 9 se pueden observar unas muestras representativas amplificadas con iniciadores para identificar si hubo metilación en el promotor de DACT2 del tejido sano adyacente. Puede observarse que ninguno estuvo metilado por lo que ninguna muestra amplificó usando iniciadores metilados. Sin embargo algunas muestras si presentaron metilación. Mientras que en la figura 10 se observan algunas muestras representativas de tejido sano adyacente pero amplificadas con los iniciadores para buscar no metilación.



Figura 9. DACT2 MUESTRAS DE TEJIDO SANO ADYACENTE, REACCIONES DE MSP METILADAS. De las 13 muestras observadas no amplificaron 2 muestras, la 47A y 54A, las 11 muestras restantes amplificaron en las reacciones de MSP no metiladas.

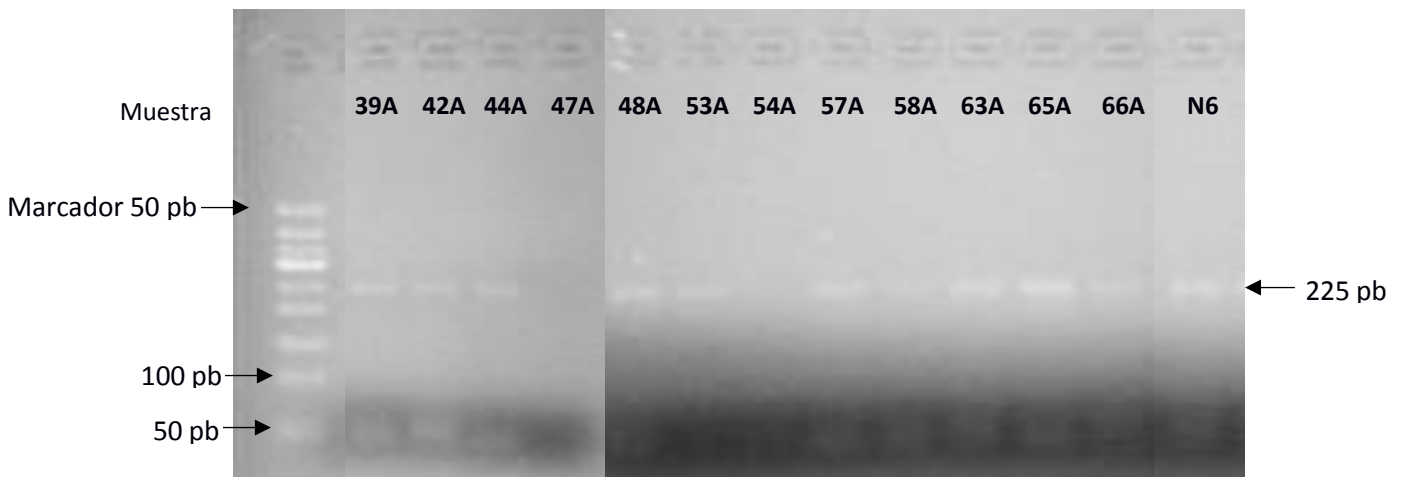


Figura 10. DACT2 MUESTRAS DE TEJIDO SANO ADYACENTE, REACCIONES DE MSP NO METILADAS. De las 13 muestras observadas no amplificaron 2 muestras, la 47A y 54A, las 11 muestras restantes amplificaron en las reacciones de MSP no metiladas.

En la figura 11 se pueden observar algunas muestras de tejido tumoral amplificadas con iniciadores para identificar si hubo metilación en el promotor de DACT2. Se observa que la mayoría de las muestras amplificadas no tuvieron metilación en la región analizada del promotor ya que no hubo amplificación del fragmento esperado de 226 pares de bases.

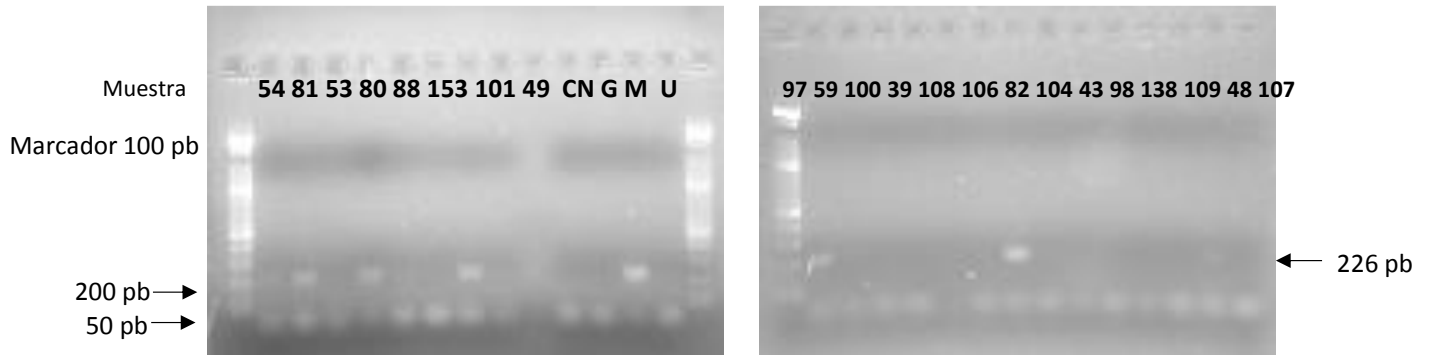


Figura 11. DACT2 MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL, REACCIONES DE MSP METILADAS. Algunas muestras presentaron amplificación al buscar metilación en la región promotora. El fragmento esperado es de 226 pares de bases.

En la figura 12 se puede observar en las muestras de tejido tumoral amplificadas con iniciadores para identificar si hubo o no metilación en el promotor de DACT2, que por el contrario la mayoría de ellas fueron no metiladas ya que amplificaron el fragmento esperado de 225 pares de bases.

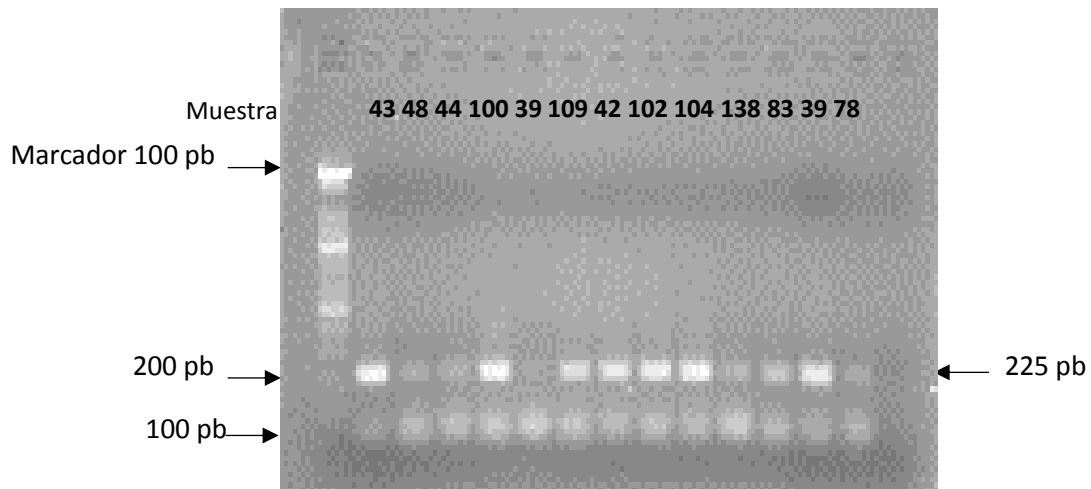


Figura 12. DACT2 MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL, REACCIONES DE MSP NO METILADAS. Las muestras presentaron amplificación al buscar no metilación en la región promotora. El fragmento esperado es de 225 pares de bases.

7.5. Análisis de metilación para PHF20L1

De la misma forma que se hizo para el gen DACT2, primero se realizó la estandarización de los controles utilizados para PHF20L1, para validar los

resultados obtenidos con las muestras y los tejidos sanos adyacentes. En la figura 13 se pueden ver los productos amplificados para los controles del gen.

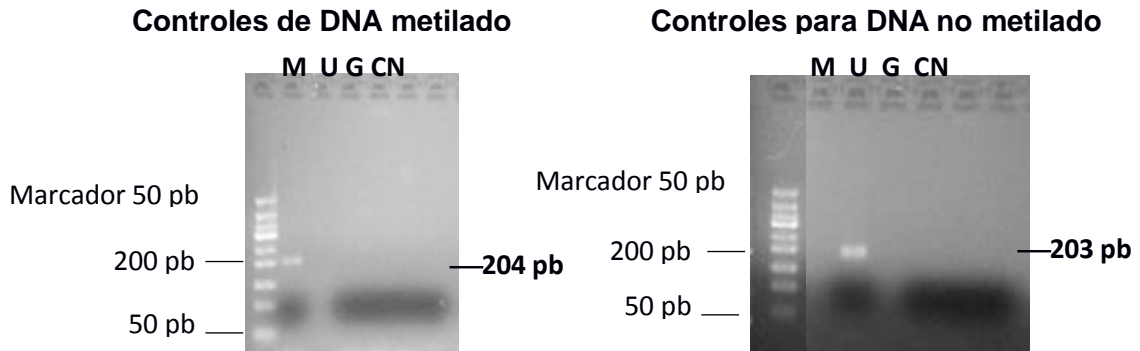


Figura 13. Controles de DNA modificado con bisulfito para PHF20L1. Se pueden observar los controles para el DNA metilado donde se corrobora que los iniciadores dan un producto de 204 pares de bases, mientras que el caso de los controles no metilados, los iniciadores dan lugar a un ampliación de 203 pares de bases. M: metilado, U: no metilado, G: DNA genómico no transformado, CN: control negativo (sin DNA).

En la figura 14 se pueden observar unas muestras representativas amplificadas con iniciadores para identificar si hubo o no metilación en el promotor de PHF20L1 del tejido sano adyacente. Puede observarse que ninguno estuvo metilado cuando las muestras fueron amplificadas usando iniciadores metilados y que si amplificaron el fragmento esperado cuando se utilizaron iniciadores para búsqueda de no metilación.

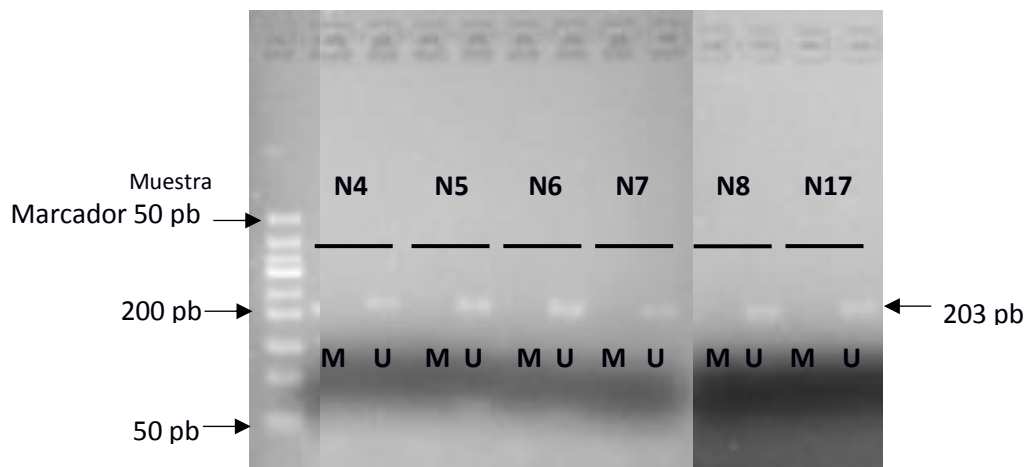


Figura 14. PHF20L1 MUESTRAS REPRESENTATIVAS DE TEJIDO SANO ADYACENTE, REACCIONES DE MSP METILADAS Y NO METILADAS. Se observa que ninguna de las muestras amplificó con iniciadores metilados, sin embargo todas amplificaron cuando se utilizaron iniciadores no metilados.

En la figura 15 se pueden observar algunas muestras amplificadas con iniciadores para identificar si hubo metilación en el promotor de PHF20L1. Se observa que

ninguna de las muestras amplificadas tuvo metilación en la región analizada del promotor ya que no hubo amplificación del fragmento esperado de 203 pares de bases.

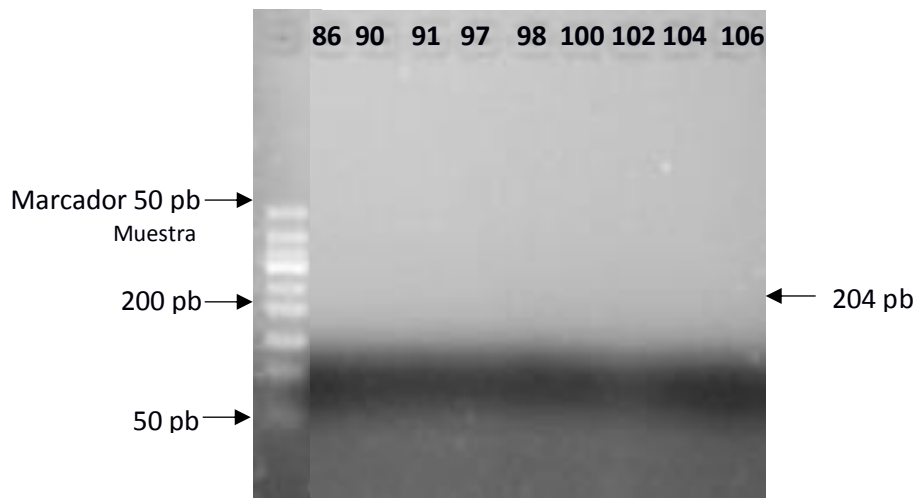


Figura 15. PHF20L1 MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL, REACCIONES DE MSP METILADAS. En esta imagen representativa puede observarse que ninguna muestra amplificó con iniciadores metilados.

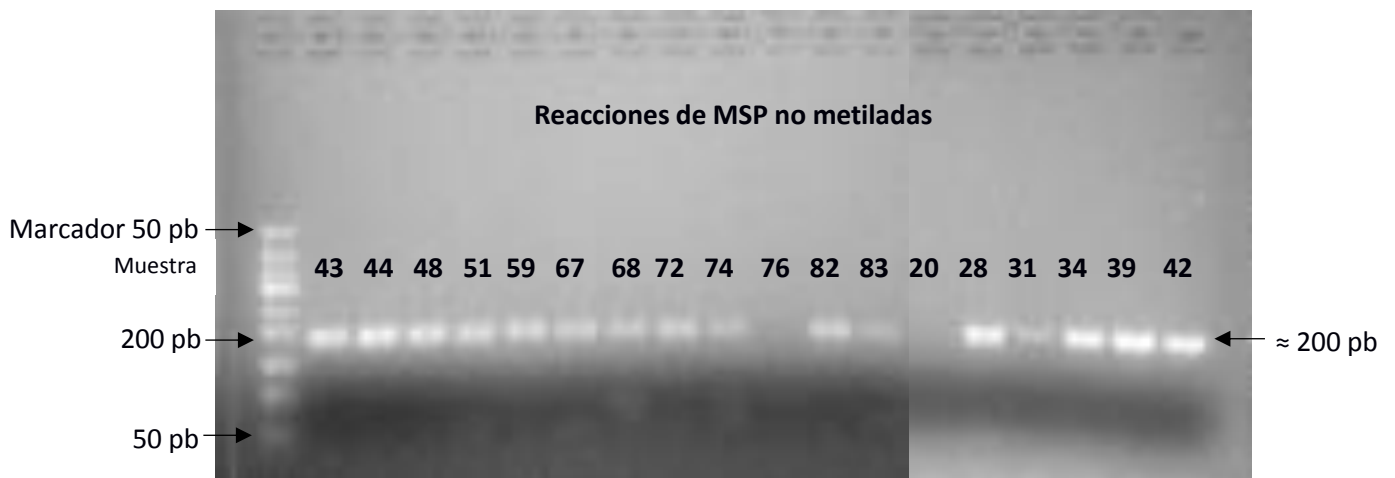


Figura 16. PHF20L1 MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL, REACCIONES DE MSP NO METILADAS. De las 18 muestras observadas no amplificaron 2 muestras, la 76 y 20, las 16 muestras restantes amplificaron en las reacciones de MSP no metiladas.

En las Tablas 8 y 9 se puede ver todos los datos de metilación y no metilación encontrados en las muestras analizadas.

TABLA 8. RESULTADOS DE METILACIÓN Y DESMETILACIÓN EN LOS PROMOTORES DE DACT2 Y PHF20L1

| GEN | ESTADO DE METILACIÓN | FRECUENCIA (%) | Estadio tumoral (%) |
|---------|----------------------|----------------|--|
| DACT2 | M | 5 (6.8) | ECIIB 1 (1.35) ECIIIA 2 (2.7) ECIIIB 2 (2.7) |
| | M/U | 21 (28.4) | ECIIA 2 (2.7) ECIIIA 3 (4.05) ECIIB 4 (5.40) ECIIIB 7 (9.45) ECIIIC 5 (6.75) |
| | U | 48 (64.8) | |
| PHF20L1 | M | 0 | |
| | M/U | 0 | |
| | U | 74 (100) | |

TABLA 9. RESULTADOS DE METILACIÓN, DESMETILACIÓN, ESTADIO TUMORAL E IMC DEL GEN DACT2

| ESTADIO TUMORAL / TIPO DE CARCINOMA | DACT 2 | IMC |
|--|--------|------|
| NORMOPESO | | |
| ECIIIA Ductal infiltrante | UMET | 23 |
| ECIIIA Ductal infiltrante | UMET | 23.2 |
| ECIIIA Lobulillar infiltrante | UMET | 24.2 |
| ECIIB Ductal infiltrante sin patrón específico | UMET | 21.6 |
| ECIIB Ductal infiltrante | MET | 23.4 |
| ECIIB Ductal infiltrante sin patrón específico | MET | 24.9 |
| ECIIIB Ductal infiltrante de patrón micropapilar invasor | UMET | 20.8 |
| ECIIIB Ductal infiltrante | MET | 21 |
| ECIIIB Ductal infiltrante | MET | 22.7 |
| SOBREPESO | | |

| | | |
|--|-------|------|
| ECI Ductal infiltrante | UMET | 29.3 |
| ECIIA Ductal infiltrante moderadamente diferenciado | UMET | 25.6 |
| ECIIA Ductal infiltrante | UMET | 26.2 |
| ECIIA Adenocarcinoma ductal infiltrante | UMET | 29.9 |
| ECIIA Ductal infiltrante moderadamente diferenciado | MET | 26.7 |
| ECIIA Ductal infiltrante | UMET | 27.2 |
| ECIIA Ductal infiltrante tipo coloide | UMET | 28.5 |
| ECIIIA Ductal infiltrante de células claras | MET | 26.3 |
| ECIIIA Ductal infiltrante de patrón no específico | UMET | 27.7 |
| ECIIIA Ductal infiltrante | MET | 28 |
| ECIIB Ductal infiltrante sin patrón específico | UMET | 25.3 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 25.4 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 25.8 |
| ECIIB Lobulillar clásico infiltrante | MET | 27.4 |
| ECIIB Ductal infiltrante de tipo apocrino | MET | 28 |
| ECIIB Ductal infiltrante sin patrón específico | UMET | 28.1 |
| ECIIB Ductal infiltrante sin patrón específico | MET | 28.6 |
| ECIIB Lobulillar infiltrante | UMET | 29.2 |
| ECIIB Ductal infiltrante moderadamente diferenciado | UMET | 29.2 |
| ECIIB Ductal infiltrante moderadamente diferenciado | UMET | 28.9 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 28.4 |
| ECIIB Lobulillar infiltrante residual | UMET | 25.6 |
| ECIIC Ductal infiltrante | UMET | 29.4 |
| ECIIC Ductal infiltrante de patrón micopapilar | UMET | 27.4 |
| ECIIC Ductal infiltrante | UMET | 25 |
| OBESIDAD | | |
| ECI Ductal infiltrante micopapilar | MET | 35.5 |
| ECIIA Carcinoma lobulillar infiltrante de patrón clásico | UNMET | 31.6 |

| | | |
|---|------|-------|
| ECIIA Ductal infiltrante | MET | 32.8 |
| ECIIA Canalicular infiltrante sin patrón | UMET | 32.9 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 30 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 31.5 |
| ECIIB Intraductal de tipo comedo | UMET | 33.3 |
| ECIIB Tubular infiltrante | UMET | 33.8 |
| ECIIB Lobulillar infiltrante de patrón clásico | UMET | 34.2 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 37.9 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 37.4 |
| ECIIB Ductal in situ tipo comedonecrosis | UMET | 30.59 |
| ECIIB Ductal infiltrante moderadamente diferenciado | UMET | 32.4 |
| ECIIB Ductal infiltrante | UMET | 32.8 |
| ECIIB Adenocarcinoma ductal infiltrante de patrón no específico | UMET | 37.8 |
| ECIIB Ductal infiltrante de patrón moderado | UMET | 30 |
| ECIIB Adenocarcinoma lobulillar infiltrante de patrón clásico | MET | 30.4 |
| ECIIB Ductal infiltrante | MET | 40.3 |
| ECIIC Lobulillar infiltrante moderadamente diferenciado | UMET | 30.5 |
| ECIIC Ductal infiltrante | UMET | 32.9 |
| ECIIC Ductal infiltrante | UMET | 34.7 |

FUENTE DE LAS TABLAS 8-9. Datos obtenidos de la investigación y de los expedientes clínicos de los pacientes.

En relación a los resultados no hubo cambios en el estado de metilación del gen PHF20L1 en los estadios tumorales (II-III) comparándolos con el tejido sano adyacente (no hubo metilación alguna); al igual que la metilación del promotor del gen DACT2 no fue significativa en los estadios tumorales (II P=0.37, III P= 0.17) ni en el tejido sano adyacente.

8.0. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es un grave problema de salud pública, cuya principal causa de mortandad es la detección tardía y por lo tanto el tratamiento del tumor en etapa avanzada. El diagnóstico temprano y la prevención son los factores con el mayor efecto en la supervivencia posterior (57). La principal causa de muerte en los pacientes con cáncer es la dispersión de las células cancerosas a órganos distantes, ya que ésta habilidad le permite a las células cancerosas invadir a los tejidos vecinos y metastatizar a través del cuerpo (58).

La metilación del DNA es una modificación epigenética que como sabemos juega un papel crítico en la regulación de la transcripción de genes, mantenimiento del genoma, desarrollo de enfermedades (59) y que la metilación aberrante de islas CpG en promotores es un sello distintivo del cáncer, conduce al silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores y contribuye al inicio y progresión de un tumor (60). Por un lado, la pérdida de función o silenciamiento transcripcional por medio de la hipermetilación se ha identificado para los genes supresores de tumores, mientras que la hipometilación ha sido atribuida a la oncogénesis y la pérdida de impronta de algunos alelos relacionados con el cáncer (62).

En tumores en etapas tempranas es común observar hipometilación global del DNA de las células tumorales e hipermetilación de promotores específicos en islas CpG, lo que ha llevado a pensar que, ésta desregulación se presenta antes de los eventos tumorales como las mutaciones de supresores y/o protooncogenes. La hipermetilación de islas CpG en un promotor conduce al silenciamiento del gen regulado por ese promotor, como ocurre con los genes supresores de tumores en las células cancerosas. Mientras que, la hipometilación de un promotor puede tener el efecto inverso en el gen regulado por ese promotor, provocando su activación aberrante, lo que tiende a ocurrir en los oncogenes y que, se asocia con activación de genes requeridos para invasión y metástasis (62-63). Comparando células normales con tejido tumoral se ha encontrado que los tumores presentan del 5-10%

de menor metilación y se ha sugerido que los cambios en la metilación aparecen entre los estados de hiperplasia y neoplasia benigna, donde el DNA esta significativamente hipometilado en comparación con el tejido normal. La causa de la hipometilación global aún no está bien comprendida (64).

Una herramienta muy útil para analizar cambios epigenéticos en los tumores ha sido la evaluación de la metilación de DNA a través de la conversión de citosinas no metiladas a uracilos mediante el tratamiento del DNA con bisulfito de sodio, básicamente ésta técnica se fundamenta en la conversión de C en U siempre y cuando la C se encuentre desmetilada, mientras que si ésta se encuentra metilada permanecerá como C no convertida. Posteriormente mediante amplificación por PCR las Cs convertidas serán reemplazadas por timinas, luego, comparando la secuencia convertida con la secuencia no convertida se puede conocer el estado de metilación de esa región (65).

En este trabajo se encontró que no hubo cambios significativos en la metilación de los genes analizados, DACT2 y PHF20L1. La literatura señala que DACT2 es un factor importante para el desarrollo embrionario (66,67), especialmente durante los movimientos gastrulatorios (66, 68, 69). Sin embargo, también es importante en la regulación de la proliferación celular, ya que está demostrado que participa en el control de la re-epitelización durante la cicatrización (70). Además hay antecedentes de investigadores que han analizado su función en algunos tipos de cánceres, aunque a la fecha se sabe poco sobre su papel en la tumorigénesis. Hou y col, (71) observaron que a mayor cantidad de proteína DACT2, mejor era la tasa de sobrevivencia en pacientes con carcinoma esofágico de células escamosas. Mientras que la expresión restaurada de DACT2 *in vitro* reduce significativamente el crecimiento, migración e invasión de las células tumorales. Por otro lado y con respecto a la metilación, solo hay 2 trabajos donde se ha estudiado la metilación de DACT2, uno es el de Li y col, 2015 (72) analizando carcinoma nasofaríngeo encontraron metilación de DACT2. Observaron silenciamiento del gen por

metilación de su promotor en líneas celulares y tumores primarios pero no en células epiteliales nasofaríngeas normales. En un estudio en líneas celulares de cáncer de colon y en ratones desnudos Wang y col (73) encuentran que DACT2 solo está metilado en células tumorales (43.3%) y líneas celulares pero no en tejido sano. En cambio en este trabajo, de todas las muestras analizadas solo se observó metilación en 5 de ellas, es decir solo el 6.8% de los tumores. Desconocemos cual haya sido la diferencia en esos resultados, debido al método que se utilizó que fue la PCR específica para metilación, no es posible saber si todas las citosinas están metiladas o no, para eso el siguiente paso sería secuenciar la región que amplificamos. También hay que considerar que no necesariamente todos los tumores se van a comportar de la misma manera y hasta ahora no tenemos el antecedente de otro trabajo hecho en muestras de cáncer de mama donde se hayan analizado cambios en la metilación del promotor.

Con respecto a PHF20L1 quien codifica para una proteína que forma parte del complejo de múltiples subunidades histona acetiltransferasa humana involucradas en la acetilación de histonas y modificación postraduccional. Es un ortólogo cercano a PHF20 del que actualmente poco se sabe de su función (74). Recientemente se encontró que en cáncer de mama hay amplificación y sobreexpresión de manera prevalente en los subtipos agresivos basal-like y luminal B, por lo que se ha asociado fuertemente con mal pronóstico de sobrevivencia en pacientes con cáncer de mama y la caracterización detallada de PHF20L1 en cáncer de mama reveló que uno de los dominios presentes en la proteína puede tener un papel crítico en promover el cáncer (75). Participa en el recambio de la metiltransferasa 1(DNMT1) a través de la unión de su dominio MBT (tumor cerebral maligno) de lo que se ha deducido que su dominio MBT es un dominio lector que controla los niveles enzimáticos de DNMT1 metilado (76). Sin embargo, poco se sabe sobre su estado de metilación en los tumores. En el análisis que realizamos de metilación de su promotor no encontramos ninguna muestra con señales de metilación, por lo que es posible que durante el proceso tumoral este gen no se vea afectado por una

modificación epigenética como lo es la metilación. También es necesario señalar que al igual que con DACT1 no es posible conocer de manera específica si todas las regiones CG están o no metiladas ya que para ello se requiere de secuenciar la región amplificada.

Los genes DACT2 y PHF20L1 analizados en este trabajo, se eligieron porque no han sido estudiados previamente, recientemente fue que se asociaron con la metástasis (la causa de mortalidad en los tumores) y se han comenzado a estudiar en líneas celulares. Dado que la alimentación es un factor epigenético importante, después de conocer el estado de metilación en estos genes, se espera en un segundo acercamiento, analizar cómo pueden interactuar estos dos factores, especialmente debido a la estrecha relación que existe entre la obesidad y el cáncer de mama.

Se sabe que un factor importante en la predisposición al desarrollo de cáncer de mama en las mujeres es el sobrepeso y la obesidad. En este trabajo se observó que los DNA provinieron principalmente de mujeres con sobrepeso y obesidad, por lo que es importante hacer énfasis en la modificación de la dieta de la población femenina en general y no solo en aquellas que ya desarrollaron el cáncer, manteniendo una masa magra y masa grasa adecuada para cada individuo y estableciendo un balance adecuado entre el consumo calórico diario y la realización de ejercicio (77). Consumiendo una cantidad adecuada de verduras y frutas ricos en fibra lo cual se ha estudiado que disminuye el riesgo de cáncer de mama en mujeres premenopáusicas (78), así como también el consumo de leguminosas en especial soya desde la adolescencia (79); prefiriendo hidratos de carbono complejos y disminuyendo el consumo de los simples; evitando los azúcares y harinas refinados, disminuyendo el consumo de carnes procesadas, embutidos y grasas saturadas, y aumentando el de omega 3 encontrado principalmente en pescados y el de ácidos grasos mono y poliinsaturados encontrados en el aceite de oliva y el de canola (77).

Sin embargo, los mecanismos que subyacen al mal pronóstico en las mujeres obesas con cáncer de mama siguen sin ser conocido. McCullough et al., (2016) en un análisis que hacen sobre la supervivencia y su relación con la obesidad en pacientes con cáncer de mama, encuentran que hay una asociación positiva entre estas condiciones al igual que con la metilación. Se sabe que la dieta puede tener un efecto sobre la metilación como en el caso de la vitamina D, sobre la cual se ha encontrado que un alto consumo de vitamina D se asocia con la disminución en los niveles de metilación en tumores en etapa temprana pero no en los de etapas tardías (80). Por otro lado el consumo de folatos se ha visto que tiene un papel complejo, debido a que un alto o un bajo consumo de estos, aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de mama (81) y un consumo moderado tiene un efecto protector. Sin embargo en cáncer colorectal, en las lesiones preneoplásicas y neoplásicas la disminución de folatos suprime la progresión del tumor y los suplementos de ácido fólico promueven la progresión (82), de ahí que aún no se tenga certeza del efecto que pueda tener la metilación. En el caso de las catequinas del té verde, las cuales son un grupo de antioxidantes naturales que suprimen las especies reactivas de oxígeno inducidas por los carcinógenos y promueven la reparación del DNA dañado, han sido ampliamente estudiadas y a la fecha no han dado resultados concluyentes. Una de las catequinas que componen al té verde, la epigalocatequina galato (EGCG) es la que tiene el efecto supresor más activo en el cáncer de mama en estudios *in vitro* e interactúa con proteínas importantes en el cáncer de mama como el receptor de estrógenos α . En general las catequinas inhiben la metilación al actuar sobre las proteínas encargadas de transferir grupos metilo al DNA, participan en la supresión de la proliferación celular y apoptosis de las células tumorales, por mencionar algunas de sus funciones. Las inconsistencias entre los resultados *in vivo* e *in vitro* se sugiere se deben a la baja biodisponibilidad oral y a la biotransformación de las catequinas *in vivo*, de ahí que la búsqueda de métodos para estabilizar las catequinas en el tracto digestivo sea importante (83), y lo mismo ocurre con otros compuestos bioactivos de los alimentos.

9.0. CONCLUSIONES

DACT2 es un gen importante de estudiar porque participa en la supresión de la tumorigénesis al promover la apoptosis celular y disminuyendo la proliferación. Es posible que las modificaciones epigenéticas no afecten el estado de metilación del promotor en las muestras provenientes de tejido tumoral de mama, ya que la metilación observada fue muy baja.

PHF20L1 tampoco tuvo cambios en el patrón de metilación de su promotor ya que ninguna muestra estuvo metilada.

Es importante resaltar que la mayoría de las personas afectadas por este tipo de cáncer tuvieron un peso fuera de lo normal, lo cual es un factor de riesgo importante debido a la función esteroideogénica que tiene el tejido adiposo, por lo tanto a mayor cantidad de tejido adiposo mayor producción de estrógenos, los cuales favorecen la proliferación celular, por lo que una modificación de la dieta así como de ejercicio podría brindar beneficios tanto a mujeres sanas para prevenirlo como en las enfermas para mejorar su estado de nutrición y evitar complicaciones relacionadas con la misma enfermedad y el tratamiento.

Finalmente cabe resaltar la importancia de éste trabajo, porque es un paso inicial en el estudio de estos genes y otros relacionados con el cáncer de mama, desde un punto de vista nutricional, tomando en cuenta qué nutrimentos y componentes bioactivos de los alimentos de la dieta pueden llegar a alterar la expresión de los genes, generando un enfoque más personalizado de la nutrición en las diversas patologías, en éste caso el cáncer de mama, pero considerando que el propio metabolismo de los compuestos bioactivos también es determinante en el efecto que puedan tener sobre la enfermedad.

10.0. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- American Cancer Society. (2014). *The History of Cancer*. Diciembre 06, 2014, de American Cancer Society Atlanta USA Sitio web: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>.
- 2.- Salaverry, O. (2013). *La Etimología del Cáncer y su curioso curso histórico*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30, 137-141, Perú.
- 3.- Organización Mundial de la Salud. (2015). *Cáncer*. Febrero, 2015, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- 4.- American Cancer Society. (2011) *Global Cancer Facts & Figures*. 2nd Edición. American Cancer Society, 1-13 Atlanta, USA.
- 5.- Goldman, A. (2005). *Manual de Enfermería Oncológica*: Ministerio de Salud Argentina.
- 6.- Secretaria de Salud, *Guía de práctica clínica para la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama*.
- 7.- Secretaria de Salud, (2015) *Boletín Epidemiológico*, Número 5 Volumen 32. México.
- 8.- American Cancer Society, (2014) *Breast Cancer*, Atlanta USA obtenido de www.cancer.org.
- 9.- Cárdenas, J.; Bargalló, E., Erazo, A., Maafs, E., Poitevin, E., (2013). *Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario*. Quinta revisión Colima.
- 10.- Secretaría de Salud (2002) *Compendio de Patología Mamaria*. México DF.
- 11.- Secretaria de Salud, (2013). *Boletín Epidemiológico*. Número 26 | Volumen 30 | Semana 26 | Del 23 al 29 de junio del 2013. México.

- 12.- American Cancer Society, (2014). *Breast Cancer Staging*. 7ma Edición: Atlanta, USA.
- 13.- Ruiz, H.; Guzmán, E.; Mora, B.; Bottinil, Z.; Medina, J.. (2010). *Cáncer ductal infiltrante en mama derecha de paciente joven con embarazo llevado a término*. Rev Venez Oncol 2010; 22(1):p.63-65.
- 14.- Guzmán, K.; Morales, K. V.; Hernández, A.W.; Gómez, E.; García, F.; Sánchez, S. H. (2012). *Carcinoma ductal infiltrante, el tipo de cáncer de mama más común*. Archivos de Medicina, 8, 5.
- 15.- Acosta, V., et al (2011). *¿Es carcinoma lobulillar infiltrante igual a carcinoma ductal infiltrante? Seguimiento a largo plazo*. Rev Venez Oncol; 23(2):p.56-65.
- 16.- López, M.A., Aguilar, U., Camarena, D.M., (2005). *Carcinoma lobulillar infiltrante de mama: etapa clínica, características radiológicas e histológicas*. Ginecol Obstet Mex; 73:p. 629-36.
- 17.- Asociación Española contra el cáncer (2014). *Cáncer de mama*. España
- 18.- Huicochea, S., González, P., Tovar, Ll., Olarte, MA., Vázquez, J., (2011). *Cáncer de mama*. Anales de Radiología de México 1 p.117:126.
- 19.- C. Álvarez, C., et Al (2014). *Actualización del cáncer de mama en Atención Primaria*. (III/IV) eSemergen. 40(8):460-472.
- 20.- Sánchez, R., Schneider, E., Martinez, G., Fonfach, C. (2008). *Cáncer de mama. Modalidades terapéuticas y marcadores tumorales*. Cuad. Cir. ; 22: p.55-63.
- 21.-Romieu I. (2011). *Dieta y cáncer de mama*. Salud Publica Mex 53:p.430-439.
- 22.- Grajales,E.G., Cazares, C., Díaz, L., Alba , V., (2014). *Factores de riesgo para el cáncer de mama en México: revisión de estudios en poblaciones mexicanas y México-americanas*. CES Salud Pública; 5: p.50-58 México
- 23.- Ledesma, N.; Ledesma, M.S., R.D., CSO, UCSF Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, Smith Integrative Cancer Center. (2010). *The*

Newsletter of Breast Cancer Connections, Your Community Resource for Information & Support Nutrition and Breast Cancer. Excerpt from the BCC Report. Volume 17, Issue 1.

24.- Howell et al. (2014). *Breast Cancer Research determination and prevention of breast cancer.* 16:446. Obtenido de la siguiente página: <http://breast-cancer-research.com/content/16/5/446Risk>.

25.- Michael, S., Donaldson, M., (2004). *Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet.* Nutrition Journal , 3:19 doi:10.1186/1475-2891-3-19.

26.- Breast Cancer Care, (2014). *Diet and breast cancer.* 5ta Edición. BCC98. London, England.

27.- World Cancer Research Fund International (2011). *Physical activity and breast cancer survivors.* London, United Kingdom.

28.- Howell, A., Anderson, A. S., Clarke, R. B., Duffy, S. W., Evans, D. G., Garcia-Closas, M., Harvie, M. N. (2014). *Risk determination and prevention of breast cancer.* Breast Cancer Research : BCR, 16, 446. <http://doi.org/10.1186/s13058-014-0446-2>.

29.- Bodai, B. I., & Tusso, P. (2015). *Breast Cancer Survivorship: A Comprehensive Review of Long-Term Medical Issues and Lifestyle Recommendations.* The Permanente Journal, 19(2), 48–79. <http://doi.org/10.7812/TPP/14-241>.

30.- Suba, Z. (2013). *Circulatory Estrogen Level Protects Against Breast Cancer in Obese Women.* Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 8(2), 154–167. <http://doi.org/10.2174/1574892811308020004>.

31.- Bandera, E. V., Maskarinec, G., Romieu, I., & John, E. M. (2015). *Racial and Ethnic Disparities in the Impact of Obesity on Breast Cancer Risk and Survival: A*

Global Perspective. *Advances in Nutrition*, 6(6), 803–819. <http://doi.org/10.3945/an.115.009647>.

32.- Yang, X. R., Chang-Claude, J., Goode, E. L., Couch, F. J., Nevanlinna, H., Milne, R. L., Garcia-Closas, M. (2011). *Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Association Consortium Studies*. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 103(3), 250–263. <http://doi.org/10.1093/jnci/djq526>.

33.- John, E. M., Sangaramoorthy, M., Hines, L. M., Stern, M. C., Baumgartner, K. B., Giuliano, A. R., Slattery, M. L. (2015). *Overall and abdominal adiposity and premenopausal breast cancer risk among Hispanic women: The Breast Cancer Health Disparities Study*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(1), 138–147. <http://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1007-T>.

34.- Teegarden, D., Romieu, I., & Lelièvre, S. A. (2012). *Redefining the impact of nutrition on breast cancer incidence: is epigenetics involved*. *Nutrition Research Reviews*, 25(1), 68–95. <http://doi.org/10.1017/S0954422411000199>.

35.- Saxena, N. K., & Sharma, D. (2013). *Multifaceted Leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer*. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 18(0), 309–320. <http://doi.org/10.1007/s10911-013-9308-2>.

36.- Connor, A. E., Baumgartner, R. N., Pinkston, C., & Baumgartner, K. B. (2013). *Obesity and Risk of Breast Cancer Mortality in Hispanic and Non-Hispanic White Women: The New Mexico Women's Health Study*. *Journal of Women's Health*, 22(4), 368–377. <http://doi.org/10.1089/jwh.2012.4191>.

37.- Sarkissyan, M., Wu, Y., & Vadgama, J. V. (2011). *Obesity is associated with breast cancer in African American but not Hispanic women in South Los Angeles*. *Cancer*, 117(16), 3814–3823. <http://doi.org/10.1002/cncr.25956>.

- 38.- Salozhin, S.V., Prokhorchuk, E.B., Georgiev, G.P.. (2005). *Methylation of DNA of the Major Epigenetic Markers*. *Boichemistry*. 70:525–532.
- 39.- Laird PW. (2003). *The power and the promise of DNA methylation markers*. *Nature Rev Genet*. 3:253–266.
- 40.- Robertson, K.D.. (2005). *DNA methylation and human disease*. *Nature Rev Genet*. 6:597–610.
- 41.- Schulz, W.. (2005). *Qualified Promised: DNA methylation assays for the detection and classification of human cancers*. *J. Biomed Biotechnol*. 3:227–229.
- 42.- Guo J, Burguer M, Nimmrich I, Maiers S, Becker E, Gene B, et al. (2005). *Differential DNA methylation of gene promoters in small B-cell lymphomas*. *Am J Clin Pathol*. 124:430–439.
- 43.- Su Y, Zhang L, Gao X, Meng F, Wen J, Zhou H, et al. (2007). *The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF-beta signaling*. *FASEB J*; 21:682–90.
- 44.- Lee WC, Hough MT, Liu W, Ekiert R, Lindstrom NO, Hohenstein P, et al. (2010). *Dact2 is expressed in the developing ureteric bud/collecting duct system of the kidney and controls morphogenetic behaviour of collecting duct cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*; 299:F740–51.
- 45.- Zhang L, Zhou H, Su Y, Sun Z, Zhang H, Zhang L, et al. (2004). *Zebrafish Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors*. *Science*; 306:114–7.
- 46.- Waxman JS, Hocking AM, Stoick CL, Moon RT. (2004). *Zebrafish Dapper1 and Dapper2 play distinct roles in Wnt-mediated developmental processes*. *Development*; 131:5909–21.

- 47.- Meng F, Cheng X, Yang L, Hou N, Yang X, Meng A. (2008). *Accelerated reepithelialization in Dpr2-deficient mice is associated with enhanced response to TGFbeta signaling*. J Cell Sci; 121:2904–12.
- 48.- Hou J, Liao LD, Xie YM, Zeng FM, Ji X, Chen B, Li LY, Zhu MX, Yang CX, Qing-Zhao, Chen T, Xu XE, Shen J, Guo MZ, Li EM, Xu LY. (2013). *DACT2 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Prev Res (Phila); 6(8):791-800.
- 49.- Li L, Zhang Y, Fan Y, Sun K, Su X, Du Z, Tsao SW, Loh TK, Sun H, Chan AT, Zeng YX, Chan WY, Chan FK, Tao Q. (2015). *Characterization of the nasopharyngeal carcinoma methylome identifies aberrant disruption of key signaling pathways and methylated tumor suppressor genes*. Epigenomics; 7(2):155-73.
- 50.- Wang S, Dong Y, Zhang Y, Wang X, Xu L, Yang S, Li X, Dong H, Xu L, Su L, Ng SS, Chang Z, Sung JJ, Zhang X, Yu J. (2015). *DACT2 is a functional tumor suppressor through inhibiting Wnt/β-catenin pathway and associated with poor survival in colon cancer*. Oncogene; 34(20):2575-85.
- 51.- Mendjan S, Taipale M, Kind J, Holz H, Gebhardt P, et al. (2006). *Nuclear pore components are involved in the transcriptional regulation of dosage compensation in Drosophila*. Mol Cell; 21: 811–823.
- 52.- Jiang Y, Liu L, Shan W, Yang ZQ. (2015). *An integrated genomic analysis of Tudor domain-containing proteins identifies PHD finger protein 20-like 1 (PHF20L1) as a candidate oncogene in breast cancer*. Mol Oncol. pii: S1574-7891(15)00191-X. doi: 10.1016/j.molonc.2015.10.013.
- 53.- Estève, P.O., Terragni, J., Deepti, K., Chin, H.G., Dai, N., Espejo, A., Corrêa, I.R.Jr, Bedford, M.T., Pradhan, S.. (2014). *Methyllysine reader plant homeodomain (PHD) finger protein 20-like 1 (PHF20L1) antagonizes DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 (DNMT1) proteasomal degradation*. J Biol Chem; 289(12):8277-87.

- 54.- Espantoso, M. (2011). *El rol de la nutrición en la etiología del cáncer*. RENUT, 18, 921-929.
- 55.- De Lorenzo, D. (2012). *Perspectivas presentes y futuras de la Nutrigenómica y la Nutrigenética en la medicina preventiva*. Nutr. Clín. Diet. Hosp., 32, 92-105.
- 56.- Gómez, A. E. (2007). *Nutrigenómica y Nutrigenética. La relación entre la alimentación, la salud y la genómica*. OFFARM, 26, 78-85.
- 57.- Goldman M, O'Hair K. (2009). *Women's health, breast health: a review of the gynecologic effects of breast cancer*. Obstet Gynecol Surv; 64(7):469-80.
- 58.- Mongaret C, Alexandre J, Thomas-Schoemann A, Bermudez E, Chéreau C, Nicco C, Goldwasser F, Weill B, Batteux F, Lemare F. (2011). *Tumor invasion induced by oxidative stress is dependent on membrane ADAM 9 protein and its secreted form*. Int J Cancer; 129:791-8.
- 59.- Baylin S.B., Ohm J.E. (2006). *Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat. Rev. Cancer; 6: 107–116.*
- 60.- Hanahan, D., Weinberg, R. A.. (2011). *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell; 144(5), 646–674.
- 61.- Elhrlich, M.. (2002). *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*. Oncogene; 21: 5400–5413.
- 62.- Baxter, E., Windloch, K., Gannon, F., Lee, J.S. (2014). *Epigenetic regulation in cancer progression*. Cell Biosci; 4:45
- 63.- Taby, R. and Issa, J.P. (2010). *Cancer epigenetics*. CA Cancer J Clin; 60:376-392.
- 64.- Hamidi, T., Singh, A.K., Chen, T.. (2015). *Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases*. Epigenomics; 7(2):247-65.
- 65.- Sasaki, M., Anast, J., Bassett, W., Kawakami, T., Sakuragi, N., Dahiya, R.. (2003). *Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive*

technique for accurate evaluation of CpG methylation. Biochem Biophys Res Commun; 309(2):305-9. PubMed PMID: 12951050.

66.- Su Y, Zhang L, Gao X, Meng F, Wen J, Zhou H, et al. (2007). *The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF-beta signaling.* FASEB J; 21:682–90.

67.- Lee WC, Hough MT, Liu W, Ekiert R, Lindstrom NO, Hohenstein P, et al. (2010). *Dact2 is expressed in the developing ureteric bud/collecting duct system of the kidney and controls morphogenetic behaviour of collecting duct cells.* Am J Physiol Renal Physiol; 299:F740–51.

68.- Zhang L, Zhou H, Su Y, Sun Z, Zhang H, Zhang L, et al. (2004). *Zebrafish Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors.* Science; 306:114–7.

69.- Waxman JS, Hocking AM, Stoick CL, Moon RT. (2004). *Zebrafish Dapper1 and Dapper2 play distinct roles in Wnt-mediated developmental processes.* Development; 131:5909–21.

70.- Meng F, Cheng X, Yang L, Hou N, Yang X, Meng A. (2008). *Accelerated reepithelialization in Dpr2-deficient mice is associated with enhanced response to TGFbeta signaling.* J Cell Sci; 121:2904–12.

71.- Hou J, Liao LD, Xie YM, Zeng FM, Ji X, Chen B, Li LY, Zhu MX, Yang CX, Qing-Zhao, Chen T, Xu XE, Shen J, Guo MZ, Li EM, Xu LY. (2013). *DACT2 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma.* Cancer Prev Res (Phila); 6(8):791-800.

72.- Li L, Zhang Y, Fan Y, Sun K, Su X, Du Z, Tsao SW, Loh TK, Sun H, Chan AT, Zeng YX, Chan WY, Chan FK, Tao Q. (2015). *Characterization of the nasopharyngeal carcinoma methylome identifies aberrant disruption of key signaling pathways and methylated tumor suppressor genes.* Epigenomics; 7(2):155-73.

73.- Wang S, Dong Y, Zhang Y, Wang X, Xu L, Yang S, Li X, Dong H, Xu L, Su L, Ng SS, Chang Z, Sung JJ, Zhang X, Yu J. (2015). *DACT2 is a functional tumor*

suppressor through inhibiting *Wnt/β-catenin* pathway and associated with poor survival in colon cancer. *Oncogene*; 34(20):2575-85.

74.- Mendjan S, Taipale M, Kind J, Holz H, Gebhardt P, et al. (2006). *Nuclear pore components are involved in the transcriptional regulation of dosage compensation in Drosophila*. *Mol Cell*; 21: 811–823.

75.- Jiang Y, Liu L, Shan W, Yang ZQ. (2015). *An integrated genomic analysis of Tudor domain-containing proteins identifies PHD finger protein 20-like 1 (PHF20L1) as a candidate oncogene in breast cancer*. *Mol Oncol*. pii: S1574-7891(15)00191-X. doi: 10.1016/j.molonc.2015.10.013.

76.- Estève PO, Terragni J, Deepti K, Chin HG, Dai N, Espejo A, Corrêa IR Jr, Bedford MT, Pradhan S. (2014). *Methyllysine reader plant homeodomain (PHD) finger protein 20-like 1 (PHF20L1) antagonizes DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 (DNMT1) proteasomal degradation*. *J Biol Chem*; 289(12):8277-87.

77.- Lawrence H. Kushi ScD, Tim Byers MD, MPH, Ms. Colleen Doyle MS, RD, Elisa V. Bandera MD, PhD, Marji McCullough ScD, RD, Ted Gansler MD, MBA, Ms. Kimberly S. Andrews, Michael J. Thun MD, MS. (2006). *American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention: Reducing the Risk of Cancer With Healthy Food Choices and Physical Activity*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. Volume 56, Issue 5 September/October 2006. Pages 254–281.

78.- Jo L. Freudenheim, James R. Marshall, John E. Vena, Rosemary Laughlin, John R. Brasure, Mya K. Swanson, Takuma Nemoto and Saxon Graham. (1996). *Premenopausal Breast Cancer Risk and Intake of Vegetables, Fruits, and Related Nutrients*. *JNCI J Natl Cancer Inst.*; 340-348. doi:10.1093/jnci/88.6.340.

79.- Thanos, J., Cotterchio, M., Boucher, B.A. et al. (2006). *Adolescent dietary phytoestrogen intake and breast cancer risk*. *Cancer Causes Control*. 17:1253. doi:10.1007/s10552-006-0062-2.

80.- J.B. Rawson, Z. Sun, E. Dicks, D. Daftary, P.S. Parfrey, R.C. Green, et al., (2012). *Vitamin D intake is negatively associated with promoter methylation of the Wnt antagonist gene DKK1 in a large group of colorectal cancer patients*. *Nutr. Cancer* 64, 919–928.

81.- Zhang, Y.-F., Shi, W.-W., Gao, H.-F., Zhou, L., Hou, A.-J., & Zhou, Y.-H. (2014). *Folate Intake and the Risk of Breast Cancer: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies*. *PLoS ONE*, 9(6), e100044. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0100044>.

82.- Kim, YI. (2007). *Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review*. *Mol Nutr Food Res*; 51:267–92.

83.- Xiang, L.-P., Wang, A., Ye, J.-H., Zheng, X.-Q., Polito, C. A., Lu, J.-L., ... Liang, Y.-R. (2016). *Suppressive Effects of Tea Catechins on Breast Cancer*. *Nutrients*, 8(8), 458. <http://doi.org/10.3390/nu8080458>.