



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO**  
**Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas**  
**(PROBIOL)**

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN GENES RELACIONADOS  
CON EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA HUMANO**

**DIEGO MATIAS MARZESE**

Licenciado en Biología Molecular

Universidad Nacional de San Luis

**Dra. MARÍA ROQUÉ MORENO**

Directora

**Dra. LAURA MARÍA VARGAS-ROIG**

Co-directora

Realizada en:

Laboratorio de Alteraciones Genéticas y Epigenéticas en Patologías Humanas.

Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario H. Burgos"

Facultad De Ciencias Médicas

Universidad Nacional De Cuyo

Mendoza, 2011

TUTORES DEL TRABAJO DE TESIS:

- Doctor Luis S. Mayorga
- Doctor Francisco E. Gago
- Doctor Ricardo W. Masuelli



## AGRADECIMIENTOS:

*Han sido muchas las personas e instituciones que han contribuido con este trabajo de tesis. Sin su colaboración y apoyo no habría sido posible. Especialmente agradezco:*

- *A las todas pacientes que participaron en el estudio.*
- *A mis directoras, la Dra. María Roqué y la Dra. Laura Vargas-Roig por haberme dado la oportunidad y el tiempo para realizar este trabajo.*
- *A la Facultad de Ciencias Médicas, al CONICET y los institutos IHEM e IMBECU del CCT-Mendoza, por permitirme alcanzar este objetivo.*
- *Al Dr. Francisco Gago, Dra. Olga Tello y Dr. Javier Orozco por su constante colaboración y guía en el aspecto clínico del cáncer de mama.*
- *A Laura Gómez por compartir años de trabajo con buenos y malos resultados. A Sergio, Emanuel, Leo, Martín, Matías, Rodrigo, Chela, Laila, Oscar, Magda y Flavix por hacer del laboratorio un lugar tan agradable.*
- *Al Dr. John Quackenbush, Eleanor Howe y Dr. Benjamin Haibe-Kains por su guía en los análisis bioinformáticos.*
- *Al Dr. Dave Hoon y el Departamento de Oncología Molecular del John Wayne Cancer Institute por su asesoramiento en el estudio de ADN tumoral en suero y procesamiento de tumores de melanoma.*
- *A mis padres y hermanos por ser el soporte de tantos años de estudio.*
- *y por supuesto a Vos por dejar en esta tesis la misma cantidad de vida que yo, mi querida Sifá...*

*“Quiero dedicar esta tesis a las pacientes con cáncer de mama que perdieron su vida mientras se realizaba, a las pacientes que hoy siguen luchando por curarse, a mi querida abuela Manuela y a la memoria de mi querida abuela Irene”*

## ABREVIATURAS

a. C.	Antes de Cristo
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BSP	Secuenciación dependiente de Bisulfito de sodio
CDI	Carcinoma Ductal Invasor o Infiltrante
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CIMP	Fenotipo Metilador de ICpG
CLI	Carcinoma Lobulillar Invasor
CLIS	Carcinoma Lobulillar <i>in situ</i>
CM	Cáncer de Mama
cm	Centímetro
CMG	Cáncer de Mama tejido Ganglionar
CMN	Cáncer de Mama tejido Normal
CMS	Cáncer de Mama tejido Sanguíneo
CMT	Cáncer de Mama tejido Tumoral
CTC	Células Tumoraes Circulantes
DNMT1	ADN metil transferasa de mantenimiento
drMS-MLPA	MS-MLPA doble ronda
ER	Receptor de Estrógenos
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
g	Fuerza de gravedad
g/l	Gramo por litro
HAT	Histona Acetil Transferasa
HDAC	Histona Deacetilasa
HDAC	Histona Deacetilasa
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico
ICpG	Islas Citosina-Guanina
IHQ	Inmunohistoquímica
Ki-67	Antígeno expresado durante Proliferación Celular
kV	Kilo voltios

LOH	Pérdida de Heterocigosidad
LOI	Pérdida del Imprinting
M	Molar
MBD	Methyl Binding Domain
ml	Mililitro
MLPA	Amplificación de múltiples sondas dependiente de ligación
mM	Milimolar
MS-MLPA	Amplificación de múltiples sondas dependiente de ligación específica de metilación
MSP	PCR metil específica
ng	Nanogramo
NGM	Número de genes metilados
nM	Nanomolar
NMR	Número de regiones metiladas
NPI	Índice Pronóstico de Nottingham
OR	Cálculos del riesgo
pb	Pares de Bases
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PCR	Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa
PMG	Perfil de Metilación Ganglionar
PMT	Perfil de Metilación Tumoral
PR	Receptor de Progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
SOM	Self Organizing Maps
μl	Microlitro
μM	Micromolar

## RESUMEN

A nivel mundial, el cáncer mamario representa el 23% de las enfermedades oncológicas que afectan a las mujeres. En el año 2008 fue responsable de 458.400 muertes. Las probabilidades de curar a una paciente dependen del avance de la enfermedad en el momento del diagnóstico. La estimación del pronóstico y predicción del tratamiento de las pacientes es fundamental para el manejo clínico de la enfermedad. La metástasis en ganglios linfáticos, el tamaño y el grado tumoral son los factores pronóstico más importantes, mientras que la expresión de los receptores de estrógeno, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico 2 son marcadores para la predicción de la respuesta a distintos tratamientos.

Las células tumorales presentan un genoma y un epigenoma distinto a las células normales. La alteración epigenética mejor entendida y más estudiada es la metilación aberrante de genes reguladores del ciclo celular.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo identificar las alteraciones epigenéticas relacionadas con el cáncer de mama humano. Para ello el trabajo ha sido dividido en tres bloques. El primero, centrado en el estudio de las alteraciones epigenéticas de la carcinogénesis mamaria. El segundo, enfocado en establecer relaciones entre las alteraciones epigenéticas y los aspectos clínicos de la enfermedad. El tercero, enfocado en la detección no invasiva de procesos oncológicos en las pacientes.

Esta tesis muestra los resultados del análisis de la metilación aberrante de 49 regiones del genoma involucradas en el desarrollo de enfermedades oncológicas. El estudio ha permitido determinar el perfil de metilación tumoral de 92 tumores mamarios invasores, 17 melanomas, 8 hepatoblastomas y 6 tumores de próstata.

Las alteraciones en la metilación de estos genes es específica para cada paciente y la información epigenética permite diferenciar el proceso tumoral mamario del resto de los tumores. La cantidad y el tipo de genes afectados correlacionan con factores de mal pronóstico y factores que predicen respuesta a tratamientos.

Las células que escapan a los ganglios mantienen la metilación aberrante del tumor primario, rasgo que ha servido para detectar ADN tumoral circulando en la sangre de las pacientes con la enfermedad.

Los resultados aportan a un mejor entendimiento del proceso tumoral mamario y al futuro diseño de estudios para la detección temprana y no invasiva de la enfermedad.

# ÍNDICE

## PRIMERA PARTE: MARCO TEÓRICO

### 1. Capítulo primero: El cáncer

1.1. Perspectiva histórica del cáncer .....	3
1.1.1. Los orígenes del conocimiento del cáncer.....	3
1.1.2. El renacimiento, la anatomía y la oncología.....	5
1.1.3. La industrialización y la investigación contemporánea del cáncer.....	7
1.1.4. El siglo XX y la investigación del cáncer.....	8
1.2. Impacto emocional del cáncer.....	9
1.3. Impacto económico del cáncer.....	10
1.4. La naturaleza del cáncer.....	11
1.5. Clasificación del cáncer.....	12

### 2. Capítulo segundo: El cáncer de mama

2.1. Anatomía e histología de la glándula mamaria.....	16
2.1.1. Glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia.....	16
2.1.2. Glándula mamaria durante el climaterio.....	17
2.2. Patologías de la glándula mamaria.....	18
2.2.1. Lesiones epiteliales y fibroepiteliales benignas.....	18
2.2.2. Lesiones epiteliales pre-malignas.....	19
2.2.3. Lesiones epiteliales malignas invasoras.....	19
2.3. Estadificación del cáncer de mama.....	20
2.3.1. Estadificación clínica y patológica.....	20
2.3.2. Generalidades de los estadios del cáncer de mama.....	21

2.4. Factores pronósticos y predictivos del cáncer de mama.....	23
2.4.1. Estado de los ganglios linfáticos.....	24
2.4.2. Tamaño del tumor primario.....	24
2.4.3. Grado tumoral o histológico.....	25
2.4.4. Índice pronóstico de Nottingham (NPI).....	27
2.4.5. Marcadores de proliferación celular: PCNA o KI-67.....	28
2.4.6. Receptor de estrógeno $\alpha$ .....	28
2.4.7. Receptor de progesterona.....	29
2.4.8. Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, Her2.....	30
2.5. El cáncer de mama como una enfermedad genética.....	31
<b>3. Capítulo tercero: Epigenética y cáncer</b>	
3.1. Epigenética.....	35
3.1.1. Regulación epigenética.....	35
3.2. Metilación del ADN.....	36
3.3. Expresión de ARN no codificantes.....	38
3.4. Modificaciones de histonas.....	38
3.4.1. Relación entre la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas....	40
3.5. Dinámica epigenética e interacción con el ambiente.....	40
3.6. Rol de la epigenética en salud y enfermedad.....	41
3.6.1. Metilación del ADN en células normales.....	41
3.6.2. Metilación del ADN en células tumorales.....	42
3.6.2.1. Hipometilación global del genoma tumoral.....	42
3.6.2.2. Metilación aberrante de genes reguladores del ciclo celular.....	43

3.6.3. Epigenética en el manejo del cáncer.....	44
3.6.4. Terapia epigenética del cáncer.....	45
3.6.5. ADN tumoral circulante.....	46
3.6.6. Métodos y técnicas para estudiar la metilación aberrante.....	47
3.6.6.1. Estrategia molecular empleada.....	47
3.6.6.2. Número de genes analizados.....	49

## **SEGUNDA PARTE: MARCO METODOLÓGICO**

### **4. Capítulo cuarto: Propósito y procedimientos**

4.1. Objetivos de la tesis.....	53
4.1.1. Objetivos específicos.....	53
4.2. Materiales y métodos.....	54
4.2.1. Pacientes y muestras incorporadas.....	54
4.2.2. Extracción de ácidos nucleicos.....	58
4.2.3. Análisis del estado de metilación de genes.....	60
4.2.4. Análisis estadísticos y procesamientos bioinformáticos de los datos.....	70
4.2.5. Reactivos y soluciones.....	75

### **5. Capítulo quinto: Presentación y discusión de resultados**

5.1. Alteraciones epigenéticas en la carcinogénesis mamaria.....	78
5.1.1. Estandarización del análisis de perfiles de metilación aberrante.....	79
5.1.1.1. Eliminación de artefactos en el análisis del perfil de metilación.....	80
5.1.2. Análisis del perfil de metilación de tejidos.....	83
5.1.2.1. Tejidos mamarios normales, células sanguíneas y ganglios linfáticos sin infiltración neoplásica.....	83

5.1.2.2. Enfermedades mamarias benignas.....	83
5.1.2.3. Perfiles de metilación aberrante del cáncer de mama.....	85
5.1.2.4. Metilación aberrante de las metástasis en ganglios linfáticos.....	98
5.2. Relación entre las alteraciones epigenéticas y los factores clínico-patológicos de la enfermedad.....	106
5.2.1. Análisis de metilación de carcinomas ductales invasores.....	106
5.2.2. Alteraciones epigenéticas de carcinomas ductales con capacidad de invadir ganglios linfáticos.....	108
5.2.3. Alteraciones epigenéticas de carcinomas ductales con distintos grados tumorales.....	111
5.2.4. Relaciones entre el tamaño tumoral y las alteraciones epigenéticas.....	113
5.2.5. Diferencias epigenéticas entre tumores con distinto índice pronóstico de Nottingham.....	113
5.2.6. Tumores con alta tasa de proliferación presentan diferencias en las alteraciones epigenéticas.....	115
5.2.7. Relaciones entre las alteraciones epigenéticas y los factores predictivos del cáncer de mama.....	116
5.3. Alteraciones epigenéticas en la circulación de pacientes con cáncer.....	126
<b>6. Capítulo sexto: Discusión</b>	
6.1. Metilación de genes reguladores del cáncer en tejido mamario no tumoral.....	136
6.2. Metilación de genes reguladores del cáncer en carcinomas mamarios.....	137
6.3. Detección no invasiva del cáncer de mama.....	140

<b>7. Capítulo séptimo: Conclusiones y perspectivas</b>	
7.1. Conclusiones.....	144
7.2. Perspectivas.....	145
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>148</b>
<b>Publicaciones que reflejan el trabajo de tesis.....</b>	<b>162</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>163</b>

**PRIMERA PARTE: MARCO Y FUNDAMENTOS**

**TEÓRICOS**

# **CAPÍTULO PRIMERO – EL CÁNCER**

En el mundo, el cáncer es diagnosticado en decenas de miles de personas cada día. Nuestra historia reciente muestra que el cáncer es la afección de la salud humana más difícil de prevenir, controlar o erradicar definitivamente, como se ha conseguido con otras muchas enfermedades. Además de los altos costos que representa, el cáncer conlleva una gran sensación de impotencia por parte de pacientes, médicos e investigadores. El paso de los años ha convertido al cáncer en la principal causa de muerte y uno de los motivos más importantes de discapacidad en el ser humano. Según los datos obtenidos por GLOBOCAN, en el año 2008 se registraron 12,7 millones de casos de cáncer lo que derivó en 7,6 millones de defunciones [1, 2]. La Organización Mundial de la Salud sugiere que más de un 30% (2,3 millones) de esas muertes pudieron haber sido evitadas y calcula que para el año 2030 las muertes ascenderán a 13,2 millones [3]. Estos números demuestran que la incidencia (número de casos nuevos presentados por año) del cáncer sigue aumentando, lo cual se debe en gran medida al crecimiento y envejecimiento de la población, acompañado por una creciente adopción de comportamientos que propician el desarrollo de las enfermedades oncológicas como el tabaquismo, el alcoholismo, la obesidad, el estrés y la contaminación, entre otros [4]. Estos factores están relacionados con el desarrollo socio-económico humano. Sin embargo, la civilización e industrialización no son, ni han sido requisitos imprescindibles para el desarrollo de esta enfermedad.

### **1.1. Perspectiva histórica del cáncer**

El cáncer es una patología que ha acompañado al ser humano desde su origen. Estudios arqueológicos en esqueletos de **1 millón de años** pertenecientes a antropoides de la isla de Java, han llegado a la conclusión de la existencia de osteosarcoma en estos restos [5].

#### **1.1.1. Los orígenes del conocimiento del cáncer**

**1700 años antes de Cristo** (a. C.) se escribe el denominado “**papiro de Edwin Smith**” (Figura 1.1), en el cual se plasman los conocimientos médicos egipcios generados principalmente por el considerado fundador de la medicina egipcia, Imhotep (2690 - 2610 a. C.). Este papiro es traducido en 1930 por James Breasted y revela la descripción del tratamiento racional de cuarenta y ocho pacientes, de los cuales ocho corresponden a pacientes con cáncer de mama tratadas mediante cauterización [6]. **1552 años a. C.** se

escribe el denominado “**papiro de Ebers**”. Este papiro de más de 20 metros de longitud es traducido en 1937 y revela más de 800 apartados que describen numerosas enfermedades y tratamientos. A diferencia del anterior, presenta la recurrencia a invocaciones mágicas para el tratamiento de las enfermedades. En este papiro se describen tumores malignos en las extremidades de los pacientes [7].

**400 años a.C., Hipócrates de Cos**, describe una innumerable cantidad de pacientes y libera a la medicina de sus ataduras míticas. Además describe la teoría humoral. Según esta teoría los hombres poseen 4 sustancias o tipos de humores en equilibrio, y cualquier influencia que interrumpa ese equilibrio se relaciona con el estado de enfermedad del hombre y todo médico debe ocuparse en restablecer ese equilibrio. Esto es comparable a lo que hoy se conoce como la homeostasis fisiológica. Por otro lado insiste en que para arribar a un correcto diagnóstico, el médico debe estudiar “al paciente”, no sólo su enfermedad, sino enfocarse en su rutina diaria, ocupación y sus antecedentes familiares. Realiza descripciones detalladas de pacientes con tumores de piel, mama, estómago, cérvix, útero y recto [8]. Hipócrates introduce el término cáncer al describir los tumores malignos con el término griego “*karkinos*” o carcinos, por su similitud con los cangrejos y su obstinación a aferrarse a los tejidos sanos. Además en su libro “Aforismos y Sentencias” aconseja: “*A aquellos que padecen de cánceres ocultos, lo mejor es no curarlos; porque con cualquier tratamiento perecen. Viven más tiempo cuando no se les cura*” [9]. **En el año 10 d.C.** el término griego “*karkinos*” es traducido al latín “*cáncer*” por el médico romano **Aulus Aurelius Cornelius Celsus**. En el capítulo 28 de su libro de medicina V, Celsus se ocupa de analizar el cáncer, en el mismo afirma que esta enfermedad es más frecuente en la parte superior del cuerpo: cara, nariz, orejas, labios y mamas. Además propone una clasificación del cáncer en estadios de acuerdo al avance clínico de la enfermedad, esta clasificación persigue una organización terapéutica [10].

**Claudio Galeno de Pérgamo** quién vivió entre el 130 y el 200, utiliza por primera vez el término griego “*oncos*” para referirse a una masa en crecimiento o tumor con apariencia maligna, además profundiza los conceptos de la teoría de los humores formulada años antes por Hipócrates de Cos (Figura 1.1).

Las características de malignidad tumoral son descritas por el médico musulmán **Avicena** (Abū 'Alī al-Husayn ibn 'Abd Allāh ibn Sīnā) (980 - 1037), en el año 1020, describe en su obra “El Canon de Medicina”, como un tumor crece lentamente, invade y destruye el tejido vecino normal causando la pérdida de sensibilidad de la zona afectada [11]. Los aportes de médicos musulmanes continuaron con **Albucasis** (Abu al-Qasim) (1013 - 1037) quien nació en Córdoba, actual territorio español y es considerado el “padre de la cirugía”. Propone la extirpación del cáncer en estadíos tempranos y la completa cauterización de la región afectada, así mismo recomienda que en casos avanzados no se realice tratamiento alguno [12, 13].



**Figura 1.1: Orígenes del conocimiento del cáncer.** Izquierda: Imagen digitalizada del papiro de Edward Smith archivado en la sala de libros raros de la Academia de Medicina de Nueva York, Estados Unidos (consulta virtual: <http://archive.nlm.nih.gov/proj/ttp/flash/smith/smith.html>). Derecha: Fresco realizado en la catedral de Santa María (Anagni), en Lacio, Italia en el siglo XII. En el mismo se ha representado una discusión entre los médicos griegos, Galeno (en latín GALIENVS) e Hipócrates (en latín I<sup>o</sup>PCRAS). Probablemente refleja la importancia de ambas figuras en el desarrollo de la medicina.

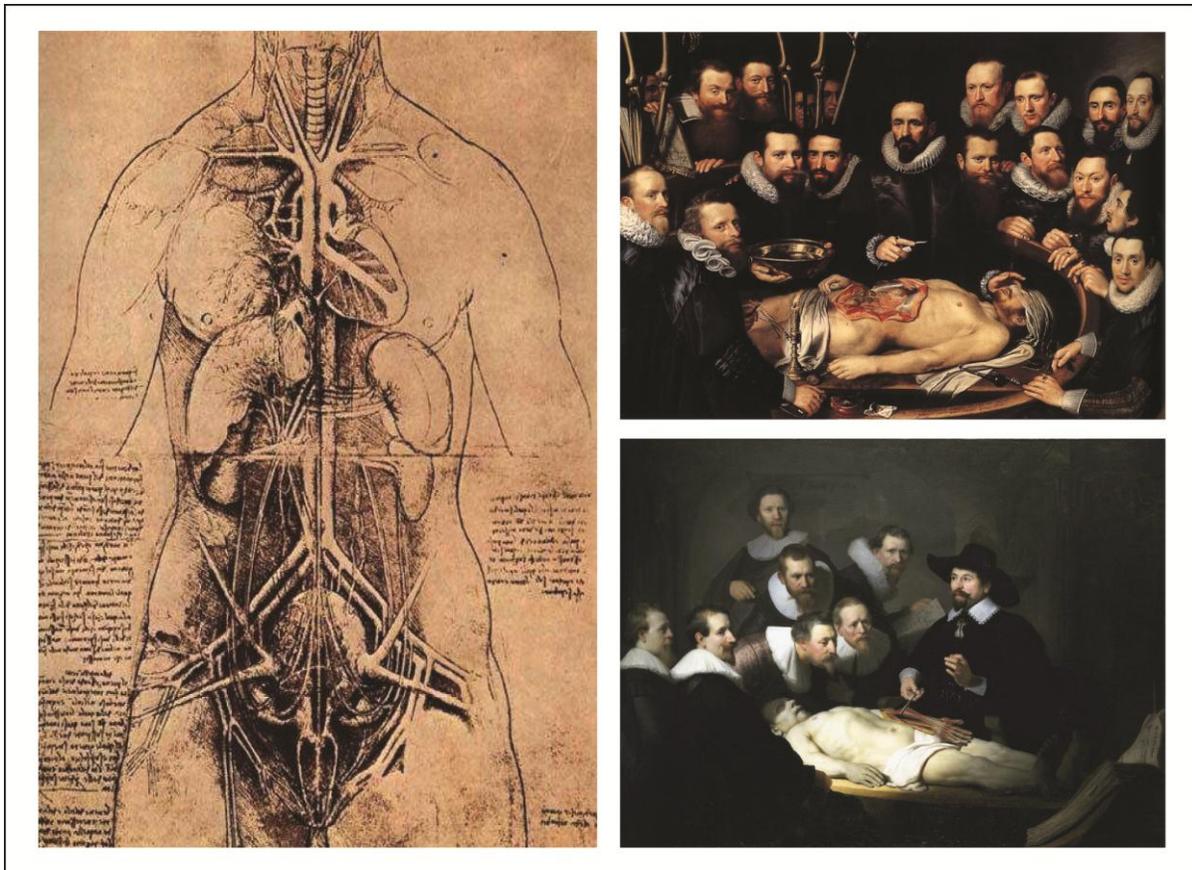
### 1.1.2. El renacimiento, la anatomía y la oncología

El renacimiento europeo originado en el siglo XVI involucra una serie de cambios políticos, económicos y culturales los cuales incluyen a la medicina. El desarrollo de los conocimientos en anatomía precipitó la aparición de valiosas observaciones relacionadas con el conocimiento del cáncer. Uno de los más importantes exponentes de la denominada “época de oro de la anatomía” es el belga **Andrés Vesalio** (1514 - 1564) quien llega a la Italia renacentista luego de formarse como cirujano en París. Vesalio y su pupilo italiano **Gabrielle Falopio** (1523 - 1562) describen numerosos tipos de cánceres y utilizan para el

tratamiento, entre otros ungüentos uno formado con base de arsénico, hoy considerado como promotor del cáncer. La creciente importancia del conocimiento sobre la anatomía del hombre en esos años, es reflejada en las obras de reconocidos artistas como Rembrandt, van Mierevelt y Da Vinci, entre otros (Figura 1.2). En este contexto, el italiano **Gaspere Aselli** (1581 - 1625) descubre el sistema linfático a través del cual se produce la diseminación de la mayor parte de los cánceres. El cirujano alemán **Guillermo Fabry** (1560 - 1634) realiza operaciones de cánceres mamarios dónde reseca los ganglios linfáticos axilares afectados por la enfermedad. Luego el italiano **Bernardino Ramazzini** (1633 - 1714) realiza estudios de enfermedades del trabajo y concluye que el cáncer de mama es más frecuente en monjas que en mujeres casadas [14].

Entre los más sorprendentes aportes al entendimiento del cáncer, se encuentran las observaciones del francés **Henri François Le Dran** (1685 - 1770). Este cirujano describe por primera vez que el cáncer comienza por una lesión local, que luego se disemina por los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos regionales y finalmente alcanza la circulación general. Le Dran sugiere que esto explica la diseminación al pulmón del cáncer originado en la mama y la utilidad de acompañar las mastectomías con una disección de ganglios axilares, así como que la presencia de metástasis axilares implica un “mal pronóstico” para las pacientes [15].

Luego de este abordaje anatómico de la enfermedad oncológica sucede un período con un giro hacia el entendimiento patológico del cáncer. El italiano **Giovanni Battista Morgagni** (1682 - 1771) en su libro “De Sebidus Et Causis Morborum” (1761) establece por primera vez una “correlación” entre las observaciones clínicas de un enfermo de cáncer y las características anatómicas de las autopsias. Su libro contiene más de 710 historias clínicas con detalles de las autopsias realizadas. Estos procedimientos se enfocan más en la lesión provocada por la enfermedad en el o los órganos afectados, que en la descripción anatómica del mismo. Así comienza la anatomopatología, influencia de la enfermedad sobre la anatomía normal [16].



**Figura 1.2: Influencia de la anatomía en el arte renacentista.** **Izquierda:** Dibujo llamado “Los principales órganos y sistema vascular y uro-genital de una mujer” realizado por Leonardo Da Vinci en 1507. Este dibujo demuestra el interés del artista por el Hombre interior, período en el que participó de la disección de más de 30 cuerpos. **Derecha arriba:** Pintura llamada “La lección de anatomía del Dr. Willem van der Meer” realizada por el holandés Michiel Jansz van Mierevelt en el año 1617, expuesta en el museo municipal de Delft, Países Bajos. **Derecha abajo:** La famosa pintura llamada “La lección de anatomía del Dr. Nicolaes Tulp” realizada por el holandés Rembrandt Harmenszoon van Rijn en 1632. En la pintura se observa al anatomista Nicolaes Tulp explicando la musculatura del brazo, utilizando como modelo el cuerpo de un criminal llamado Adriaan Adriaanszoon, ahorcado por cometer un robo. Esta pintura se exhibe en la Galería Real de Pinturas de La Haya, Países Bajos.

### 1.1.3. La industrialización y la investigación contemporánea del cáncer

El inicio de la edad contemporánea marcado por la revolución francesa implica grandes cambios políticos, sociales y demográficos. La acumulación de avances tecnológicos origina una transformación socio-económica en la que la medicina se ve involucrada. Estos cambios sirven de base para el comienzo de la llamada medicina de experimentación y los avances en el conocimiento del cáncer se aceleran. El cirujano escocés **John Hunter** (1728 -

1793) sugiere que algunos tumores pueden ser curados mediante cirugía, siempre que el tumor no haya invadido tejidos normales. **En 1844**, el médico estadounidense **Horace Wells** (1815 - 1848) descubre y utiliza la anestesia, lo que permite el desarrollo, entre otras cirugías, de la mastectomía radical. A finales del siglo XIX los microscopios son perfeccionados, esto permite realizar estudios detallados de las células que constituyen los tumores, demostrándose marcadas diferencias entre estas células y las normales. Basado en estas observaciones, el alemán **Rudolf Virchow** (1821 - 1902) establece las bases de la patología celular y correlaciona el curso clínico con los hallazgos microscópicos. Así se determinan mecanismos que relacionan el comportamiento celular con la evolución de la enfermedad. Por otro lado los patólogos comienzan a observar los márgenes quirúrgicos e informar a los cirujanos si la remoción del tumor fue completa. El inglés **James Paget** (1814 - 1899) además de describir dos patologías que hoy llevan su nombre (la enfermedad ósea de Paget, la enfermedad mamaria y extra mamaria de Paget), formula una hipótesis sobre la metástasis órgano-selectiva, la cual es conocida como la hipótesis de las semillas (células tumorales) y el suelo (órgano blanco de la metástasis) [17, 18].

#### **1.1.4. El siglo XX y la investigación del cáncer**

Los comienzos del siglo XX se ven influenciados por nuevas teorías e ideas que parecen explicar muchos problemas de la salud humana. A fines del siglo XIX la teoría de la selección natural de Darwin, las bases genéticas establecidas por los estudios de Mendel y la teoría microbiológica forman un ambiente ideal para explicar las causas de enfermedades que habían acompañado al hombre durante miles de años. Por supuesto el cáncer no escapa a esta tendencia y se realizan múltiples intentos para explicar el origen y la evolución de estas enfermedades oncológicas con estos renovados puntos de vista de la medicina. **En 1908** el estadounidense **Francis Peyton Rous** (1879 - 1970) homogeniza y filtra tumores mamarios de gallinas, y con el filtrado consigue generar tumores en gallinas sanas. Esto deviene en el descubrimiento de virus oncogénicos (u oncovirus). **En 1915** el japonés **Katsusaburo Yamagiwa** induce tumores en la piel de conejos mediante la aplicación sostenida de un líquido negro llamado Alquitrán de Hulla. **En 1927** el estadounidense **Hermann Joseph Muller** (1890 - 1969) induce tumores en moscas *Drosophila* con la utilización de rayos X, lo que marca el descubrimiento de los

carcinógenos físicos. En 1953, el descubrimiento de la estructura de la doble hélice del ADN de **Francis Crick** (1916 - 2004) y **James Watson** (1928 -) sirve de lanzadera para investigar las bases moleculares del cáncer que continua en nuestros días [19]. En el año **1971 Alfred Knudson** basado en observaciones de retinoblastomas familiares y esporádicos publica su “hipótesis del doble impacto”, sugiriendo el comportamiento de genes que suprimen los tumores [20]. Durante el año **1982** se aísla el primer oncogén humano gracias al uso de técnicas de transfección de ADN por los grupos de **Robert Weinberg, Geoffrey Cooper y Mariano Barbacid** [21-23].

El avance científico más importante del **siglo XXI** en la investigación del cáncer es la secuenciación completa del genoma humano [24]. Los datos obtenidos de este proyecto han propiciado el desarrollo de tecnologías para la investigación de la información genética a gran escala. Los ejemplos más importantes son los secuenciadores de ADN y las plataformas para microarreglos. Ambas metodologías hoy tienen un rol protagónico en la investigación del cáncer y su aplicación clínica es cada vez más notoria con pacientes tratados de acuerdo a los resultados de estos análisis.

## **1.2. Impacto emocional del cáncer**

Recibir el diagnóstico de cáncer es una noticia que una persona nunca desearía escuchar. Un gran espectro de pensamientos atraviesan la mente del paciente y de su entorno: enojo, dolor, miedo, culpa e incertidumbre, entre otros. Desde el momento del diagnóstico, durante el tratamiento y en todos los periodos evolutivos de la enfermedad, el paciente y su familia sufren un estrés psicológico prolongado como consecuencia de los síntomas, el pronóstico y el prejuicio de la enfermedad [25].

El paciente con cáncer puede temer a la muerte, al cáncer en sí mismo, a los tratamientos, al dolor y al sufrimiento propio o de los seres queridos. También sentir culpa por no haberlo notado a tiempo o haber hecho algo para contraerlo, o incluso por el perjuicio que esto ocasionará a la familia y entorno. El sentimiento de tristeza puede generarse por sentir que se pierde la posibilidad de una vida plena y sana, teniendo que dejar de lado desde planes lejanos hasta actividades cotidianas. En algunos casos incluso este estado puede derivar en diversas patologías, como trastornos de ansiedad y del estado de ánimo.

La familia también se ve afectada por estos sentimientos al recibir la noticia y durante el proceso de la enfermedad, que pueden variar en intensidad y formas de expresarlos, de acuerdo con la edad del familiar con cáncer, su posición en la familia, la situación socio-económica, la dinámica familiar pre-existente. Esta situación puede derivar en una crisis de cuidado, donde un familiar se ve sobrecargado con su nuevo rol de cuidador, dejando de lado sus propias actividades lo que lleva a una reestructuración de roles del resto de los integrantes del grupo familiar [26].

Aceptar el diagnóstico y encontrar una manera de vivir con el cáncer es todo un desafío para el que nunca se está preparado.

### **1.3. Impacto económico del cáncer**

El costo financiero del cáncer, tanto para las personas con cáncer como para la sociedad en su conjunto es muy importante. Un estudio muy interesante realizado por la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society) y la Fundación Lance Armstrong (Livestrong), refleja por primera vez el impacto económico que tienen las muertes y discapacidades de pacientes con cáncer. Este trabajo fue presentado por sus autores Hana Ross y Rijo M. John en el Congreso Mundial del Cáncer del 2010 realizado en China. Los resultados más destacados demuestran que el cáncer se ha convertido en la enfermedad con mayor impacto económico, por lo que el conocimiento que permita disminuir las muertes o discapacidades por cáncer no sólo contribuye a salvar vidas, sino a ahorrar mucho dinero. Este estudio estima que mundialmente en el año 2008 el costo del cáncer fue de casi 900 mil millones de dólares por pérdida de productividad laboral debido a muerte o discapacidad. Esta enorme cantidad de dinero representa el 1,5% del Producto Bruto Interno (PBI) mundial. El análisis de estos autores no ha incluido los gastos derivados de los tratamientos médicos. Solo en los Estados Unidos el costo anual del cáncer asciende a 228 mil millones de dólares, del cual casi la mitad (93 mil millones de dólares) está representado por los gastos médicos directos (Tabla 1.1).

Costos	Detalles	Valor (dólares)
Costos médicos directos	Tratamientos, internación, especialistas, análisis, etc.	93.200 millones
Costos Indirectos de Morbilidad	Pérdida de Productividad debido al estado de enfermedad	18.800 millones
Costos Indirectos de Mortalidad	Pérdida de Productividad debido a muerte prematura	116.100 millones
TOTAL		228.100 millones

**Tabla 1.1: Estimaciones del impacto económico del cáncer.** Adaptado de American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta, GA. 2009.

#### 1.4. La naturaleza del cáncer

Cáncer o neoplasia maligna, es un término genérico utilizado para diferenciar un grupo de más de cien enfermedades que comparten ciertas características y cada una de ellas es clasificada de acuerdo al tipo de célula que inicialmente se ve afectada [27]. Estas enfermedades coinciden en sus crecimientos desregulados y la potencial diseminación a otras partes del cuerpo [28]. Existen tantos tipos de cánceres como tipos de células constituyen el cuerpo humano. Así, en un mismo órgano pueden originarse distintas enfermedades oncológicas. Partiendo de esta observación es ilógico el intento de curar el cáncer como una única enfermedad y con una misma receta.

En las últimas tres décadas la investigación del cáncer ha estado enfocada en entender las leyes que gobiernan la transformación de las células normales a malignas. Esta transformación es un proceso de múltiples pasos denominado tumorigénesis o carcinogénesis. Las investigaciones han revelado una serie de cambios bioquímicos, moleculares y celulares que son compartidos por casi todos los cánceres humanos, además se han encontrado diferencias puntuales a nivel molecular, lo que abre la opción a tratamientos cada vez más específicos para cada una de estas enfermedades [29, 30].

La tumorigénesis puede simplificarse en una serie de capacidades adquiridas por las células iniciadas o sus descendientes. Estas células presentan división ilimitada y crecimiento descontrolado, sin necesidad de estímulos externos y sin respetar las señales de frenado. Además la masa celular tiene la capacidad de invadir tejido vecino y estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos que alimenten su crecimiento. En ocasiones estas células adquieren la capacidad de liberarse de la masa original, destruir barreras físicas que las confinan a permanecer *in situ* y dispersarse mediante vía linfática o hemática a

otras regiones del organismo. Estas células liberadas pueden o no adquirir la capacidad de establecerse y crecer en un tejido diferente del cual fueron originadas, proceso conocido como metástasis [29, 30]. Estas capacidades pueden ser adquiridas por las células mediante alteraciones genéticas o epigenéticas.

### **1.5. Clasificación del cáncer**

Todos los tumores son generados a partir de células normales o sanas, las cuales cumplen con diversas funciones que permiten el correcto funcionamiento del organismo que constituyen.

Un criterio de clasificación divide los tumores en dos categorías dependiendo del grado de agresividad histopatológica que presenta:

- A. Tumores benignos: son aquellos que crecen localmente y no presentan posibilidad de invadir tejidos aledaños ni metastatizar a sitios anatómicos secundarios.
- B. Tumores malignos o cáncer: son aquellos con capacidades invasoras y metastásicas.

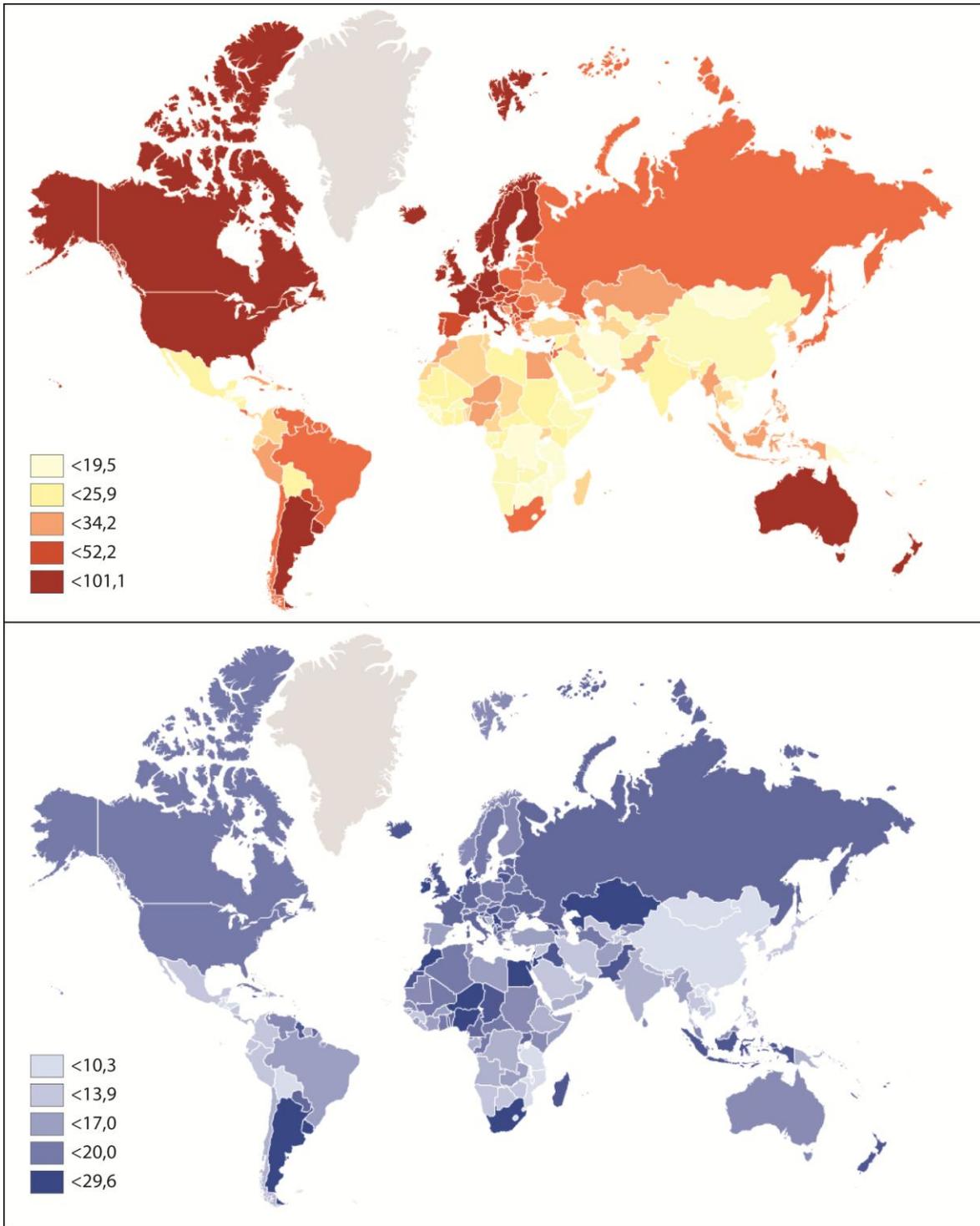
Por otro lado, el cáncer puede ser clasificado de acuerdo al tipo de tejido del cual se origina:

1. Carcinomas: Son tumores que provienen de células epiteliales de origen endodérmico o ectodérmico, representan el 85% de los tumores malignos que afectan al ser humano.
2. Sarcomas: Son tumores que provienen de tejido conectivo o mesenquimal de origen mesodérmico, representan el 2% de los tumores malignos que afectan al ser humano.
3. Linfomas: Son cánceres en los que existe una producción excesiva de linfocitos en los ganglios y el bazo. Estos representan el 5% de los tumores malignos que afectan al ser humano.
4. Leucemias: Constituye un grupo de enfermedades que afectan la producción de leucocitos por parte de la médula ósea. Estas representan el 4% de los tumores malignos que afectan al ser humano.
5. Tumores neuroepiteliales: Son tumores que derivan del parénquima cerebral. Si bien representan solo el 1,3% de los tumores malignos que afectan al ser humano, producen el 2,5% de las muertes por neoplasias, lo que denota su mal pronóstico.

## **CAPÍTULO SEGUNDO – EL CÁNCER DE MAMA**

A nivel mundial, el cáncer mamario representa el 23% de los cánceres que afectan a las mujeres, esto lo convierte en el más diagnosticado y la principal causa de muerte por neoplasias en este sexo. Se estima que en el año 2008 esta enfermedad fue responsable de la muerte de 458.400 mujeres y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (60%) de las defunciones se registraron en los países en desarrollo (Figura 2.1) [1] .

La incidencia del cáncer de mama en Argentina y en Estados Unidos es muy similar, 74 y 76 casos cada 100.000 mujeres respectivamente. La diferencia más marcada es observada en las tasas de mortalidad: en Argentina es de 21,8 (5.873 muertes al año) mientras que en Estados Unidos de 14,7 cada 100.000 mujeres (Figura 2.1) [1]. La relación mortalidad/incidencia (M/I) es un indicador útil para evaluar la eficiencia de las campañas de prevención, detección temprana y tratamientos utilizados en distintas regiones. En los países desarrollados esta relación es aproximadamente de 0,20 mientras que en los países pobres este índice puede superar 0,50 (Por ejemplo en el continente africano llega a 0,69, lo que significa que casi el 70% de las mujeres con diagnóstico de cáncer de mama mueren). En Argentina, la relación M/I (21,8/74) es de 0,29. Las diferencias en las tasas de mortalidad se deben a múltiples factores, entre ellos se destacan el avance de la enfermedad en el momento del diagnóstico y los recursos educativos y económicos para elegir y llevar adelante el tratamiento más adecuado en cada caso. Por ejemplo, se observa que un 80% de las pacientes con tumores menores a 2 cm pueden ser curadas [31]. Además, la detección de tumores pequeños disminuye las mastectomías y otros tratamientos agresivos y de elevados costos. Por lo tanto, las medidas para reducir las tasas de mortalidad incluyen: a- la educación de la población mediante campañas de concientización sobre los beneficios de la detección temprana, b- la reducción de los tiempos entre la consulta y la confirmación o descarte del diagnóstico de cáncer, c- el acceso a análisis que aporten a la decisión del mejor tratamiento y d- el mejoramiento de los métodos de monitoreo de la enfermedad y seguimiento de pacientes luego de finalizar el tratamiento adecuado [32].



**Figura 2.1: Distribución de la incidencia y mortalidad del cáncer de mama a nivel mundial.** Los datos representados están basados en las estadísticas del cáncer de GLOBOCAN 2008 [2]. **Arriba:** Representación de la incidencia del cáncer de mama. Se destaca que la situación en Argentina y Uruguay es comparable con países desarrollados. **Abajo:** Representación de la mortalidad del cáncer de mama. Se destaca que en Argentina y Uruguay es superior a los países desarrollados.

## **2.1. Anatomía e histología de la glándula mamaria**

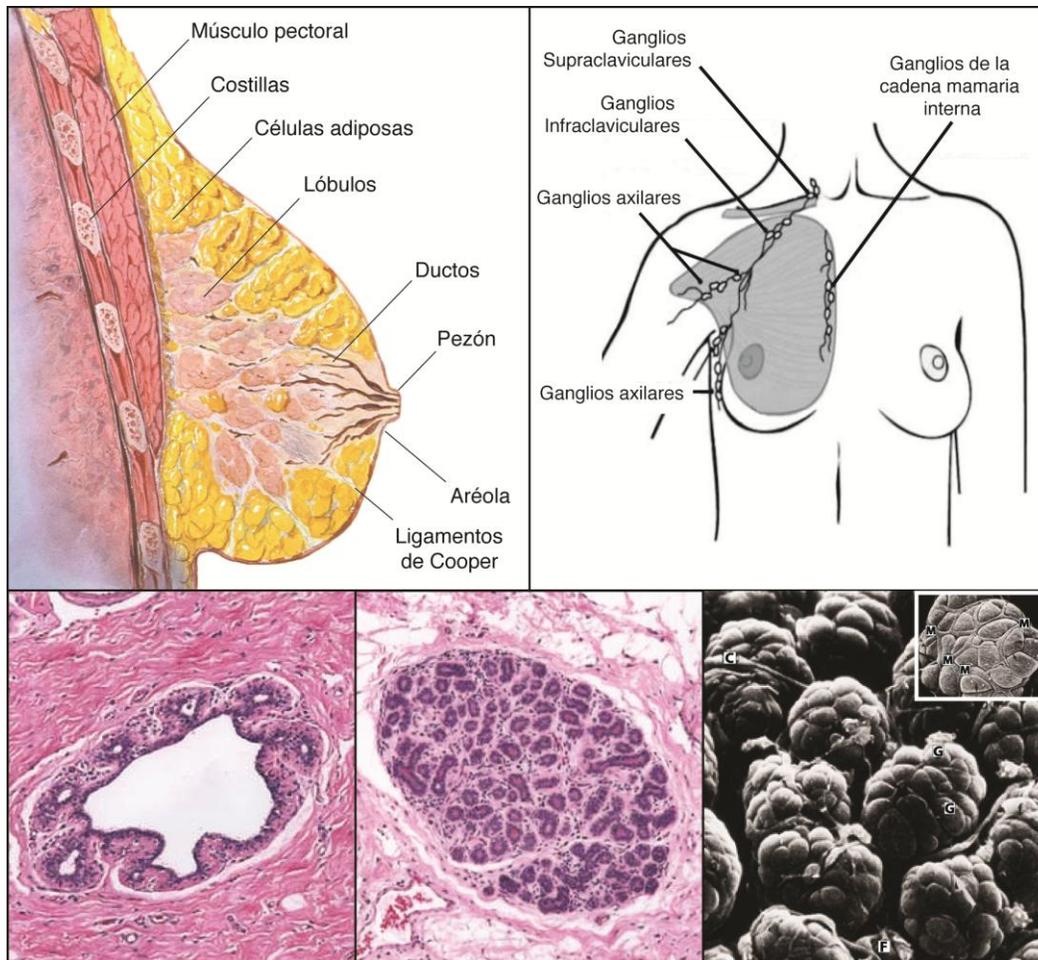
La mama es un órgano par ubicado en la parte anterior del tórax sobre el músculo pectoral mayor y a cada lado del esternón. La arquitectura mamaria es altamente influenciada por los cambios cíclicos de las concentraciones de las hormonas estradiol y progesterona, durante la etapa puberal del desarrollo femenino. La mayor parte de la mama está constituida por tejido glandular y conectivo. Es una glándula de tipo sudorípara, la cual presenta dos estructuras principales, los lóbulos que se encuentran próximos al músculo pectoral y los ductos o conductos que comunican los lóbulos con el pezón (Figura 2.2). Estos son compartimientos huecos revestidos en su interior por células epiteliales rodeadas por células mioepiteliales, las cuales cumplen funciones contráctiles en la eyección de la leche producida en los lóbulos. Este tejido glandular se encuentra sostenido por una gran cantidad de tejido estromal cuyos principales componentes son fibroblastos y células adiposas (Figura 2.2).

El sistema de drenaje linfático de la mama presenta tres vías principales: ganglios linfáticos axilares, transpectORALES y de la cadena mamaria interna (Figura 2.2). El flujo linfático es unidireccional y se estima que un 75% de la linfa drena hacia los ganglios axilares [33]. Este drenaje linfático tiene gran importancia en la diseminación de enfermedades oncológicas producidas en la glándula mamaria [34].

La estructura e histología mamaria varía de acuerdo con la edad, condiciones fisiológicas y eventos reproductivos, razón por la cual debe ser estudiada en las distintas etapas [35].

### **2.1.1. Glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia**

Durante estas etapas la mama completa su maduración, la relación entre el componente glandular y estromal aumenta considerablemente, de modo que al finalizar la gestación la mama está casi totalmente constituida por glándulas separadas por una cantidad escasa de tejido estromal. Además las células madres que componen los epitelios sufren cambios importantes. Luego de la lactancia, las glándulas regresan a su estado previo, los conductos se achican y el tamaño total disminuye.



**Figura 2.2: Anatomía e histología de la glándula mamaria:** Arriba izquierda: Corte lateral de la glándula mamaria realizado por el gran dibujante de anatomía humana Frank Netter [36]. Arriba derecha: Esquema de las cadenas ganglionares involucradas en el flujo linfático de la glándula mamaria. Abajo: Ducto mamario normal (izquierda), lobulillo mamario normal (medio) ambas micrografías pertenecen al Dr. Syed Hoda [37]. Micrografía electrónica de lobulillos mamarios normales de rata. Se observan los capilares (C), células glandulares (G), fibroblastos (F) y células mioepiteliales partícipes de la contracción de los lobulillos (M) (Adaptado de Nagato T y Col. Cell Tissue Res 1980;209:1-10 [38]).

### 2.1.2. Glándula mamaria durante el climaterio

En esta etapa la mama sufre de manera progresiva la disminución de la actividad hormonal. En mujeres muy ancianas, los lóbulos pueden llegar a desaparecer, dejando solo los ductos. En muchas ocasiones existe un remanente de estímulo estrogénico de origen suprarrenal o de conversión periférica, suficiente para mantener vestigios de los lóbulos.

## 2.2. Patologías de la glándula mamaria

### 2.2.1. Lesiones epiteliales y fibroepiteliales benignas

La definición de lesiones benignas de la glándula mamaria hace referencia a un grupo de enfermedades que pueden ser o no palpables, detectadas por diagnóstico de imágenes o por microscopía. El factor común a estas enfermedades es que por sí mismas no son capaces de invadir tejidos normales ni metastatizar órganos distantes. Existen estudios que demuestran que algunas de las enfermedades mamarias consideradas benignas pueden estar asociadas con un aumento del riesgo a desarrollar cáncer de mama [37, 39]. Estos estudios llevaron a la clasificación de las lesiones benignas en dos grupos: Proliferativas o no proliferativas (Tabla 2.1).

Lesiones benignas		Lesiones pre - malignas
No proliferativas	Proliferativas típicas	Hiperplasias atípicas
Quistes	Fibroadenoma	Hiperplasia ductal atípica
Calcificaciones	Fibroadenoma gigante	Hiperplasia lobulillar atípica
Leve hiperplasia típica	Papiloma Intraductal	
	Adenosis esclerosante	
Riesgo relativo: 1.3*	Riesgo relativo: 1.9*	Riesgo relativo: 4.2*

\* Valor relativo calculado por el estudio retrospectivo de la Clínica Mayo, Rochester, USA [40].

Tabla 2.2: Clasificación de las patologías mamarias benignas y pre - malignas.

- **Fibroadenomas:** Son los tumores mamarios benignos más comunes y su incidencia es mayor en mujeres jóvenes. Están constituidos por tejido epitelial y conectivo, lo que les confiere dureza y su tamaño no excede los 4-5 centímetros de diámetro mayor. Las células que los constituyen no tienen diferencias en el índice mitótico ni en la relación núcleo / citoplasma respecto a células epiteliales normales [41]. Los estrógenos influyen altamente en el tamaño de los fibroadenomas, por lo que durante períodos de altas concentraciones estrogénicas, como embarazo o terapias hormonales de reemplazo, pueden aumentar de tamaño y requerir intervenciones quirúrgicas.

- **Fibroadenomas gigantes:** Esta lesión es una variante poco común de los fibroadenomas (menos del 5%), miden más de 5 centímetros de diámetro mayor y/o poseen un peso mayor a 500 gramos [42]. Esta enfermedad se presenta en pacientes adolescentes de 10 a 18 años y generalmente posee un crecimiento progresivo de 2 a 5 meses.

### **2.2.2. Lesiones epiteliales pre-malignas**

En el modelo de múltiples pasos de la tumorigénesis existen estados pre-cancerígenos distinguibles. En la glándula mamaria se propone que el proceso atraviesa por los estados de hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* y finalmente carcinoma invasor. Los análisis realizados en biopsias previas al desarrollo del cáncer muestran la presencia de estas entidades [43, 44]. Esta progresión es descripta en el modelo de Wellings-Jensen [45].

Las hiperplasias atípicas son consideradas lesiones pre-malignas. La presencia de esta alteración en el tejido mamario aumenta el riesgo de desarrollar cáncer mamario en 4,2 con respecto a la población general (Tabla 2.1). La transición de células epiteliales normales a hiperplásicas típicas se caracteriza por una mayor tasa de crecimiento. Los cambios observados en hiperplasias con crecimientos atípicos, incluyen además una disminución en la adhesión celular y por ende cambios en la polaridad de las células.

Un estadio más avanzado de esta transición lo constituyen los carcinomas ductales *in situ* (CDIS). Algunos autores los consideran como lesiones malignas. Se caracterizan por tener mayor tasa de crecimiento y mayor diversidad celular, por ejemplo cambios en la relación núcleo / citoplasma y células epiteliales desde diferenciadas a pobremente diferenciadas. Además esta enfermedad requiere de tratamiento oncológico específico. El carcinoma ductal *in situ* es una enfermedad localizada y limitada a la luz del ducto en el que ha crecido [46]. Finalmente, y con la invasión del estroma devienen los denominados carcinomas ductales invasores [37].

### **2.2.3. Lesiones epiteliales malignas invasoras**

Los cánceres mamarios más frecuentes son los carcinomas, los cuales se originan a partir de células epiteliales. Pueden ser de diversos tipos, siendo los más numerosos los

carcinomas ductales o lobulillares, dependiendo de su lugar de origen. Ambos carcinomas pueden ser clasificados como invasores, cuando el neoplasma ha degradado la barrera constituida por la membrana basal, o como no invasores (*in situ*), cuando la membrana basal continúa intacta. En un bajo porcentaje (4%) de lesiones malignas puede observarse un contenido mixto de componentes ductales y lobulillares [47].

El carcinoma ductal invasor o infiltrante (CDI) es la enfermedad oncológica más frecuente de la glándula mamaria. Otros tipos menos frecuentes son: el carcinoma inflamatorio, el carcinoma medular, el carcinoma mucinoso, el carcinoma tubular y los sarcomas mamarios.

Desde un punto de vista macroscópico, los CDI varían significativamente en su tamaño. El análisis microscópico de estos tumores muestra que su histopatología es muy heterogénea, se observan diferentes patrones de crecimiento, porcentaje de CDIS, relación núcleo / citoplasma, aspectos citológicos, grado de diferenciación, actividad mitótica, etc. Todos estos aspectos propios de cada uno de los CDI pueden ser medidos y graduados de modo tal que el cuerpo médico a cargo del tratamiento tenga un diagnóstico más exacto de la enfermedad de la paciente.

### **2.3. Estadificación del cáncer de mama**

La estadificación hace referencia a la agrupación de las pacientes de acuerdo a la extensión de la enfermedad. Esta clasificación es útil para determinar el tratamiento y estimar el pronóstico de la paciente. Además sirve de lenguaje común entre médicos e investigadores de todas partes del mundo. Este protocolo ha sido determinado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC) junto con la International Union Against Cancer (UICC) y se basa en el sistema TNM, en donde T hace referencia al tamaño del tumor, N a la ausencia o magnitud de la afección de los ganglios linfáticos y M a la ausencia o presencia de metástasis en órganos distintos a la mama [34, 48].

#### **2.3.1. Estadificación Clínica y Patológica**

La estadificación clínica incluye examen físico (inspección y palpación de la glándula mamaria, ganglios linfáticos y piel) y diagnóstico por imágenes. Con estos datos se

establece un grado de avance de la enfermedad útil para el correcto manejo clínico y decisión terapéutica pre-quirúrgica (primaria o neoadyuvante)

La estadificación patológica incluye la información patológica del análisis macro y microscópico de la pieza quirúrgica, que incluye tumor primario, ganglios linfáticos y metástasis según corresponda. Esta información es fundamental para el abordaje terapéutico adyuvante, la predicción de respuesta a tratamientos y el pronóstico de la paciente.

### 2.3.2. Generalidades de los estadios del cáncer de mama

La propuesta original fue realizada por el Dr. Pierre Denoix hace más de 50 años. En el año 2010 se publica la séptima edición de la clasificación TNM de las guías de AJCC, la cual establece subclasificaciones dentro de cada estadio, estas subclasificaciones atienden a los avances en la capacidad de detectar y analizar el cáncer [49].

- **Categoría T:** El valor asignado es calculado a partir del tamaño que mide el tumor (Tabla 2.2).

Tx	Tumor no medible	T1b	0,5 – 1 cm	T4a, T4b y T4c	Cualquier tamaño pero con extensión al pectoral (T4a), ulceración de la piel (T4b) o ambos (T4c).
T0	Sin evidencia del tumor	T1c	1 – 2 cm		
Tis	Tumor <i>In Situ</i>	T2	2 – 5 cm		
T1a	0,1 – 0,5 cm	T3	Más de 5 cm	T4d	Carcinoma Inflamatorio

Tabla 2.2: Valores asignados a la categoría T dependientes del tamaño del tumor primario.

- **Categoría N:** describe el compromiso en número y posición de los ganglios linfáticos de la paciente. La clasificación de N se ha complejizado con el avance de los métodos de detección de metástasis y micrometástasis en ganglios linfáticos. Las detecciones de células tumorales en ganglios considerados negativos mediante inmunohistoquímica y PCR en tiempo real son consideradas (Tabla 2.3).

Nx	Ganglios no explorados (posible resección en cirugía previa)	N2	N2a: 4-9 ganglios axilares + N2b: ganglios en cadena mamaria interna + (detectados clínicamente)
N0	Sin metástasis en ganglios linfáticos, pero: - IHQ negativa (N0 i-) - IHQ positiva (N0 i+) - RT-PCR negativa (N0 Mol-) - RT-PCR positiva (N0 Mol +)	N3	N3a: 10 o más ganglios axilares +, o metástasis en ganglios infraclaviculares N3b: - 1-3 ganglios axilares + y ganglios + en cadena mamaria interna (detectados clínicamente) - Más de 3 ganglios axilares y ganglios en cadena mamaria interna + (detectados clínicamente) - Ganglios supraclaviculares
N1	N1mi: micrometástasis N1a: 1-3 ganglios axilares + N1b: ganglios + en cadena mamaria interna (no detectados clínicamente) N1c: 1-3 ganglios axilares + y ganglios en cadena mamaria interna + (no detectados clínicamente)		

**Tabla 2.3: Valores asignados a la categoría N dependientes del número y tipo de ganglios linfáticos con presencia de células tumorales.**

- **Categoría M:** Metástasis en órganos distantes. M adquiere el valor 1 cuando existe metástasis. En caso de detectar células tumorales circulando o anidadas en la médula ósea por técnicas moleculares, M adquiere la designación M0i+ (Tabla 2.4).

Estadío	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1 (o T1mi)	N0	
IB	T0	N1mi	
	T1 (o T1mi)	N1mi	
IIA	T0	N1	
	T1 (o T1mi)	N1	
	T2	N0	
IIB	T2	N1	
	T3	N0	
IIIA	T0, T1, T1mi, T2 o T3	N2	
	T3	N1	
IIIB	T4	N0, N1 o N2	
IIIC	Cualquier T	N3	
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla 2.4: Estadío tumoral asignado de acuerdo al valor adquirido por T, N y M.** Adaptado de la 7<sup>ma</sup> Ed. del manual de estadificación de AJCC [49]. Pacientes M0 (i+) están incluidas en M0

La combinación TNM lleva a la clasificación en los distintos estadios, los cuales están relacionados con el pronóstico de la paciente (Figura 2.3) e incluso pueden aportar a

decidir el tratamiento más adecuado para cada caso. Las características más importantes de cada estadio son las siguientes:

- **Estadio 0:** refiere a carcinomas in situ, sin afección de ganglios linfáticos ni metástasis a distancia.
- **Estadio I:** Cáncer de mama temprano donde el tumor primario debe ser menor a 2 cm y no encontrarse evidencia de ganglios linfáticos afectados.
- **Estadio II:** Cáncer de mama donde el tumor primario debe ser menor a 2 cm y encontrarse evidencia de ganglios afectados; o el tumor primario entre 2 y 5 cm y no encontrarse evidencia de ganglios afectados.
- **Estadio III:** Cáncer de mama localmente avanzado donde el tumor primario es mayor a 5 cm y presenta ganglios axilares afectados, o cualquier tamaño de tumor primario y más de 4 ganglios linfáticos afectados.
- **Estadio IV:** Cáncer de mama metastásico, sin importar el tamaño o los ganglios afectados.

#### **2.4. Factores pronósticos y factores predictivos del cáncer de mama**

Los factores pronósticos del cáncer de mama son las características inherentes a la enfermedad que correlacionan en ausencia de terapias adyuvantes con la agresividad del cáncer. En la práctica clínica los marcadores pronósticos más importantes incluyen la presencia o ausencia de metástasis en ganglios linfáticos, el tamaño y el grado tumoral, y en menor medida otros marcadores biológicos (biomarcadores) como los de proliferación (PCNA o Ki-67) o los receptores hormonales y el receptor 2 del factor de crecimiento (HER2). Estos factores han demostrado la capacidad de predecir la probabilidad de sobrevida y de recidivas de la enfermedad (metástasis o recurrencias loco regionales).

Por otro lado los marcadores predictivos son aquellos asociados a la presencia o ausencia de respuesta a una terapia determinada. Los receptores hormonales (RH) como el de estrógenos (ER) y progesterona (PR) predicen la respuesta a la hormonoterapia (tratamiento con Tamoxifeno o Raloxifeno), la sobreexpresión o amplificación del receptor HER2 predice la respuesta a anticuerpos monoclonales utilizados en el tratamiento (Trastuzumab).

### **2.4.1. Estado de los ganglios linfáticos**

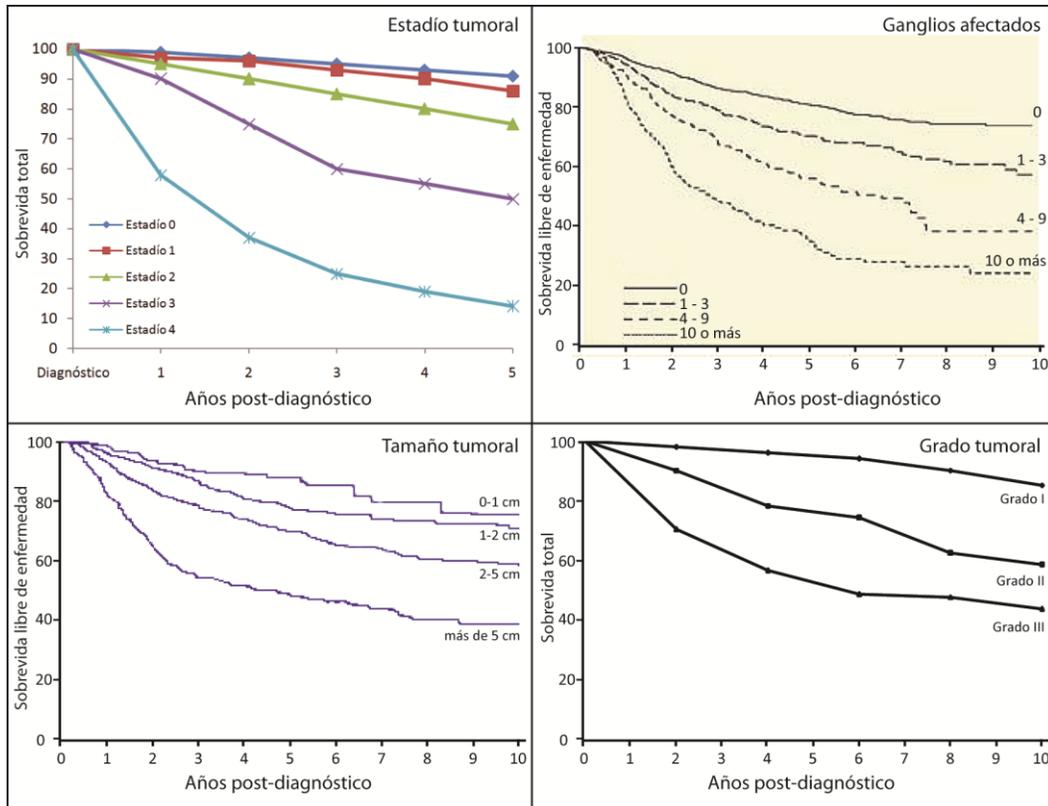
La ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos axilares es el factor pronóstico más importante del cáncer de mama. Diversos trabajos han demostrado una directa relación entre el número de ganglios linfáticos afectados y la chance de recaídas de la enfermedad. Se ha observado que luego de 5 años, el 80% de pacientes con ganglios linfáticos negativos y sólo el 23% de pacientes con más de 10 ganglios positivos, se mantienen libre de enfermedad (Figura 2.3) [31].

La resección de los ganglios linfáticos afectados por el cáncer mamario, no es un procedimiento quirúrgico inocuo, y trae aparejado un riesgo de morbilidad y mortalidad. Entre los efectos adversos las pacientes reportan quejas por entumecimiento del brazo, dolor, debilidad, edema en la extremidad y rigidez [50]. Además de estos efectos agudos, en ocasiones se reporta linfedema crónico y un aumento del riesgo a contraer infecciones por heridas en el brazo afectado [51]. Por este motivo en la década de 1990 se implementó un método mediante el cual se propició el análisis de solo los ganglios con mayor riesgo de presentar metástasis conocido como ganglio centinela [52]. Previo a la cirugía se inyecta el colorante azul patente [53] o un coloide con tecnecio 99 [54] en el tumor primario, el cual se disemina mediante vía linfática a los ganglios más asociados al tumor y que por ende presentan una mayor probabilidad de ser positivos con respecto a otros ganglios. De este modo se redujo la extracción innecesaria de ganglios linfáticos (Figura 2.3) [55]. Una desventaja que presenta la exploración de solo un reducido número de ganglios son los resultados falsos negativos. El tratamiento de quimioterapia neoadyuvante incrementa el porcentaje de falsos negativos (33%), lo cual representa un problema importante para el pronóstico y la estadificación de las pacientes [56]

### **2.4.2. Tamaño del tumor primario**

Este es un factor importante especialmente en pacientes con ganglios linfáticos negativos. Se ha demostrado una directa relación entre el aumento del tamaño tumoral y la chance de recaída de la enfermedad [31]. En 1974 se publicó un estudio que incluyó 1458 pacientes con cáncer de mama, cuyo único tratamiento había sido la mastectomía radical. En el mismo se realizó un seguimiento por 30 años, demostrando el impacto del tamaño tumoral

en la recurrencia de la enfermedad a distancia. Se observó que pacientes con tumores menores a 2 cm presentaron una recaída menor al 25%, mientras que pacientes con tumores entre 4 y 5 cm presentaron una recaída mayor al 50% (Figura 2.3) [57].



**Figura 2.3: Curvas de sobrevida de las pacientes con cáncer de mama: Efecto de los factores pronósticos. Arriba izquierda:** Influencia de los estadios tumorales sobre la sobrevida global. Datos obtenidos de la Base Nacional de Datos del Cáncer de Estados Unidos (NCDB). **Arriba derecha:** Influencia del compromiso de ganglios linfáticos sobre la sobrevida libre de enfermedad [31]. **Abajo izquierda:** Influencia del tamaño tumoral sobre la sobrevida libre de enfermedad [31]. **Abajo derecha:** Influencia del grado tumoral sobre la sobrevida global [58, 59].

### 2.4.3. Grado tumoral o histológico

Existen características histológicas del tumor primario que se asocian con el riesgo de recurrencia de la enfermedad a distancia. Para la aplicación clínica se han diseñado distintos métodos de graduación de estas características. El sistema de clasificación de Scarff-Bloom-Richardson, modificado por Elston y Ellis, denominado Grado Histológico Combinado de Nottingham, tiene en cuenta tres características del tumor: el grado de

diferenciación, el índice mitótico y el pleomorfismo nuclear. La combinación de estos lleva a tres posibles grados tumorales: 1-bajo, 2-intermedio y 3-alto (Tabla 2.5) [58]. Diversos estudios han asociado el incremento del grado tumoral con un peor pronóstico de la enfermedad (Figura 2.3) [59].

- **Formación de túbulos o grado de diferenciación del tumor:** Se observa el carcinoma ductal invasor y si más del 75% del área observada está constituida por túbulos bien definidos, se asigna el valor de 1, cuando entre el 10 y el 74% del área presenta túbulos definidos, se asigna el valor de 2 y cuando no se observan túbulos, o menos del 10% del área observada los presenta, se asigna el valor de 3.
- **Pleomorfismo nuclear o grado nuclear:** Cuando los núcleos de las células tumorales son pequeños, con poca diferencia de tamaño respecto a las células normales se asigna el valor de 1. En el caso de que las células tumorales se observen mayores a las normales, con núcleos vesiculosos, con nucléolos visibles y se percibe un cambio de tamaño y / o de forma, se asigna el valor de 2. Finalmente si estos núcleos muestran una gran variación, tanto en tamaño como en contenido, respecto de los normales, se asigna el valor de 3.
- **Índice o conteo mitótico:** La actividad mitótica se valora mejor en la periferia del tejido tumoral donde el crecimiento activo es más frecuente que en el centro del mismo. Para medir correctamente el índice mitótico deben analizarse al menos 10 campos [58]. Además debe utilizarse un criterio unificado y estricto para identificar las células en mitosis, considerando solo células en estados de metafase, anafase y telofase. Los núcleos hipercromáticos y apoptóticos deben ser ignorados y no deben confundirse células tumorales con linfocitos en mitosis. Si se observan hasta 9 mitosis por campo, se asigna el valor de 1, entre 10 y 19 mitosis por campo, el valor de 2 y más de 20 mitosis por campo el valor de 3.

Este complejo sistema de graduación permite predecir la probabilidad de recaídas de la enfermedad, y en consecuencia realizar tratamientos más enérgicos en pacientes con tumores de grado 3 que en tumores de grado 1 [60]. Una particularidad de este sistema de graduación es, como puede observarse en la descripción de cada aspecto a valorar, la alta subjetividad por parte del observador [61]. Otro aspecto es que la graduación 2 de los

tumores (grado intermedio), no trae aparejado ningún significado en la decisión terapéutica por parte del médico, por lo que se dice que esta graduación es “no informativa” y la opción terapéutica es influenciada por otros aspectos clínicos/patológicos de la paciente [62].

<b>Componentes del grado histológico</b>	<b>Valor</b>
<b>Formación de túbulos o grado de diferenciación del tumor</b>	
>75% del tumor compuesto por túbulos	1
10-75% del tumor compuesto por túbulos	2
<10% del tumor compuesto por túbulos	3
<b>Pleomorfismo nuclear o grado nuclear</b>	
Núcleos pequeños y uniformes	1
Variaciones de forma y tamaño moderadas	2
Gran variación de tamaño y forma	3
<b>Conteo o índice mitótico:</b>	
< 9 mitosis por campo	1
10 - 19 mitosis por campo	2
> 20 mitosis por campo	3
<b>Grado histológico o tumoral</b>	
1 - Tumores muy bien diferenciados o grado bajo	3-5
2 - Tumores moderadamente diferenciados o grado intermedio	6-7
3 - Tumores indiferenciados o grado alto	8-9

**Tabla 2.5: Graduación tumoral mediante el sistema de Scarff-Bloom-Richardson, modificado por Elston y Ellis.** Tabla adaptada de los datos publicados en Elston CW y Ellis IO en 1991 en Histopathology [58].

#### **2.4.4. Índice Pronóstico de Nottingham (NPI)**

La modesta tasa de reproducibilidad que presenta la graduación de los tumores ha llevado a la búsqueda de índices los cuales y mediante la combinación de varios rasgos del tumor disminuyen el efecto de los errores debidos a subjetividad del operador. Entre los índices propuestos encontramos el Nottingham Prognostic Index [63], CancerMath.net [64], Log Odds Prognostic Index [65], van Nuys Prognostic Indicator [66] y Comprehensive Prognostic Index [67]. Entre estos tantos índices propuestos, uno de los más utilizados, principalmente en Europa, es el NPI, este índice agrupa los tres factores de pronóstico más

importantes, tamaño tumoral (S), grado tumoral (H) y estado de los ganglios linfáticos (G) mediante una ecuación sencilla:  $G + H + 0.2 \times S$ . Las pacientes son asignadas a tres grupos dependiendo el valor del índice: Buen (NPI $\leq$ 3,4), intermedio (3,4<NPI $\leq$ 5,4) y mal (NPI>5,4) pronóstico [63].

#### **2.4.5. Marcadores de proliferación celular: PCNA o Ki-67**

La proliferación de las células que componen el tumor puede medirse de diversas formas, una de ellas es la utilización de anticuerpos específicos para proteínas relacionadas con la replicación y división celular. Este método se denomina inmunohistoquímica (IHQ) y permite determinar in situ la expresión de las proteínas de interés. Tumores que presentan una alta expresión de PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) o Ki-67 (Antígeno expresado durante proliferación celular) presentan mal pronóstico.

#### **2.4.6. Receptor de estrógeno $\alpha$**

El estradiol es una hormona ovárica que actúa como un potente mitógeno del tejido mamario. A nivel celular su función es mediada por los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  [68]. El receptor de estrógeno alfa actúa como un factor de transcripción que regula tanto el crecimiento como la diferenciación de las células epiteliales mamarias normales [37].

Se ha demostrado que las pacientes cuyos carcinomas mamarios expresan receptor de estrógeno presentan una mejor sobrevida libre de enfermedad, al menos en el corto plazo. Ocurre que al aumentar los tiempos de seguimiento, la sobrevida libre de enfermedad de pacientes con tumores ER+ se asemeja a aquellas con tumores ER- [69]. Las hipótesis planteadas en torno a este fenómeno apuntan a que la presencia del receptor de estrógenos actúa como vía de crecimiento tumoral con una potencia discreta comparada con las vías de crecimiento tumoral activas en tumores ER-. Esto explicaría por qué en el corto plazo se observa mayor frecuencia de metástasis en pacientes con tumores ER- que con tumores ER+. La explicación para la menor agresividad de tumores ER+ no reside en capacidades metastásicas distintas, sino que el crecimiento de los mismos depende del aporte de estrógeno lo que retrasa el proceso pero no lo evita, sugiriendo que ER es un biomarcador de crecimiento lento [37].

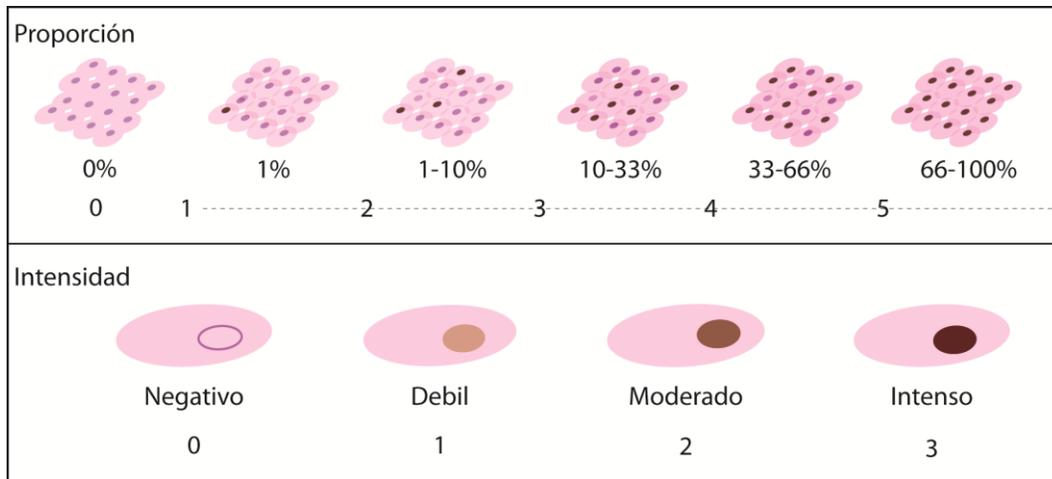
La presencia del receptor de estrógeno  $\alpha$  en las células tumorales es el principal marcador predictivo de respuesta a hormonoterapia. Se ha demostrado que casi un 60% de las pacientes con tumores ER+, responden a hormonoterapia. En pacientes donde la enfermedad se ha tornado metastásica, aproximadamente un 40% de los pacientes con enfermedad ER+ responden favorablemente a la hormonoterapia y un 20% extra muestran una estabilización de la enfermedad [70].

#### **2.4.7. Receptor de progesterona**

La progesterona es necesaria para el correcto desarrollo mamario durante la pubertad y la preparación para la lactancia. Así como estrógeno, su acción es mediada por sus receptores, localizados en diversos tejidos, como en el cerebro, donde controlan la conducta reproductiva o en los órganos mamarios y reproductivos. El receptor de progesterona se expresa en las células como consecuencia de la influencia transcripcional del ER $\alpha$ , por lo tanto es más frecuente encontrar tumores ER+/PR+ que ER-/PR+ [68]. Se ha demostrado que pacientes con tumores ER+/PR- tienen un riesgo de recaída 30% mayor que pacientes con tumores ER+/PR+, lo cual sugiere que la determinación del PR aporta mayor exactitud al pronóstico de la enfermedad [71]. La presencia del receptor de progesterona es otro indicador de respuesta a terapia hormonal.

#### **- Determinación de la presencia de receptores en los carcinomas mamarios.**

El análisis proteómico de los tumores se realiza mediante la utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente cada una de estas proteínas sobre cortes del tumor. La técnica de elección es la IHQ, que utiliza anticuerpos marcados para la identificación del receptor de estrógeno, progesterona, Her2, p53, Bcl-2, PCNA, Ki-67, entre otros [72, 73]. Esta técnica tiene un rol importante en la evaluación tanto de factores pronósticos como predictivos. La expresión de ER y PR puede ser clasificada como negativa, positiva débil (+), positiva moderada (++) y positiva intensa o marcada (+++) de acuerdo al porcentaje de células que los expresan y la intensidad con que lo hacen [74] (Figura 2.4 y tabla 2.6).



**Figura 2.4:** Diagrama de la cuantificación de la expresión de receptores de estrógeno y progesterona utilizando el índice de Allred. **Arriba:** Representación de la proporción de células tumorales que expresan el receptor. **Abajo:** Representación de la intensidad con que la célula expresa el receptor (adaptado de [75] y [76]).

Índice de Allred	Estado de los receptores
0 – 2	Negativos
3 – 8	Positivos

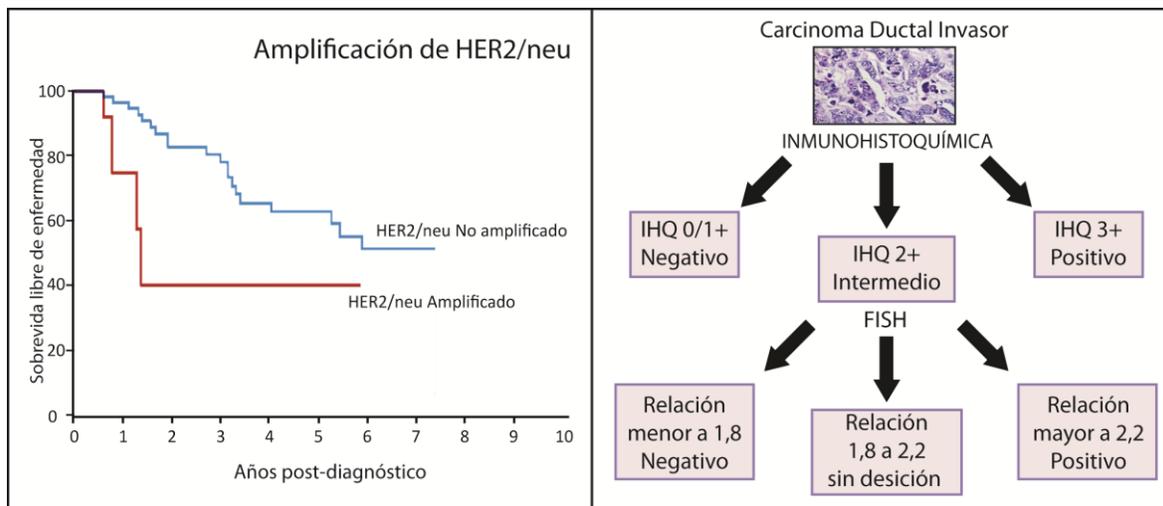
**Tabla 2.6:** Interpretación del valor del índice de Allred [74].

#### 2.4.8. Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, Her2

Es el receptor de membrana con actividad tirosina quinasa codificado por el oncogén ERBB2. Su función biológica se relaciona con diversas vías regulatorias del crecimiento celular como proliferación, anti-apoptosis, movilidad e invasión [77]. El oncogén ERBB2 se encuentra amplificado en hasta el 30% de los cánceres de mama invasores y esta amplificación se correlaciona fuertemente con la sobre-expresión de la proteína HER2/neu [78]. La amplificación del gen es evaluada mediante la técnica FISH (del inglés Fluorescent In Situ Hybridization) y la sobre-expresión de la proteína es medida con anticuerpos específicos por IHQ. Si bien aún no hay un consenso generalizado sobre la mejor forma de medir la activación de la vía comandada por el receptor Her2, la American Society of Clinical Oncology (ASCO) y el College of American Pathologists (CAP) han publicado las guías ASCO/CAP para minimizar los falsos resultados en la evaluación de HER2 [79].

Resumidamente, en esta guía se recomienda realizar la evaluación mediante una de las dos técnicas validadas y en los casos de dudas o intermedios utilizar la otra técnica validada (Figura 2.5).

Existe una débil pero significativa asociación entre la sobreexpresión y/o amplificación de HER2 y un mal pronóstico de las pacientes, por tanto este marcador tiene más significado predictivo que pronóstico [80]. Al igual que el análisis de ER y PR, la gran utilidad de determinar la expresión de Her2 en las células tumorales es su carácter predictivo de respuesta a tratamientos con anticuerpos monoclonales que bloquean la acción de este receptor, como trastuzumab [81].

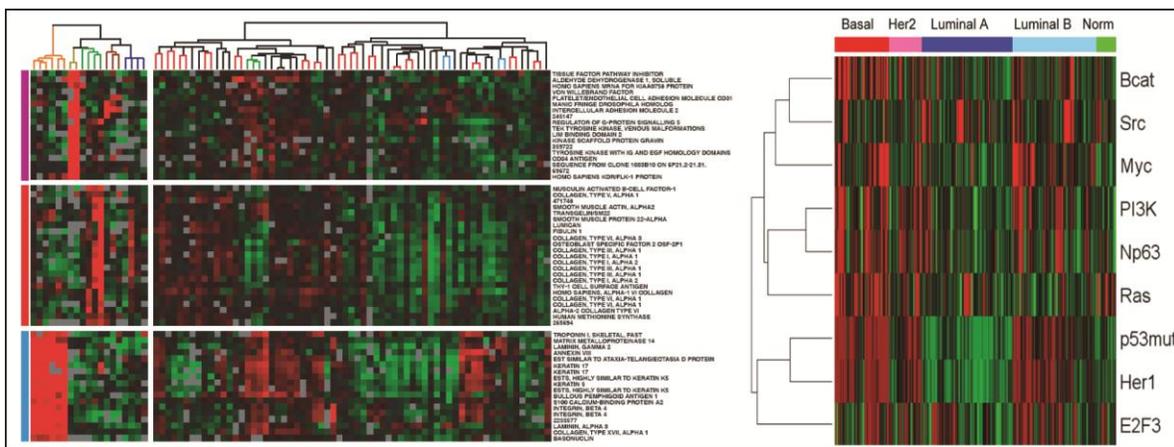


**Figura 2.5: HER2/neu en carcinomas mamarios invasores. Izquierda:** Influencia de la amplificación de HER2/neu en la sobrevida libre de enfermedad de las pacientes (Adaptado de [82]). **Derecha:** Determinación de la sobre-expresión y/o amplificación de HER2/neu según las guías de ASCO/CAP [79].

## 2.5. El cáncer de mama como una enfermedad genética

El desarrollo del cáncer de mama compromete una serie de cambios moleculares los cuales incluyen alteraciones en el genoma de las células tumorales. Estas alteraciones incluyen cambios en la secuencia del ADN, alteraciones en el número de copias o en la estructura del genoma. En ciertos casos, los eventos genéticos que contribuyen con el desarrollo del cáncer, incluyen mutaciones que son heredadas y en otros casos las alteraciones son de carácter somático, adquiridos por las células que constituyen el tumor. Un ejemplo de las

alteraciones genéticas heredadas son las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Alteraciones en las secuencias de ambos genes se relacionan con una multiplicación del riesgo de desarrollar cáncer de mama en las mujeres portadoras [83]. Por otro lado un ejemplo de alteraciones genéticas somáticas, que aportan al desarrollo tumoral es la amplificación del gen que codifica la información para la síntesis de Her2 [84]. Además de estas alteraciones genéticas, en el cáncer de mama ocurren una gran cantidad de alteraciones en la función y expresión de los genes. La tecnología para el estudio de las firmas genéticas (evaluación del transcriptoma) ha permitido establecer conjunto de estas alteraciones para identificar en mayor detalle la enfermedad. Dentro de la gran diversidad del cáncer de mama se han identificado subtipos moleculares [85]. Esta clasificación molecular del cáncer de mama se ha convertido en una herramienta muy útil para el manejo clínico de la enfermedad ya que cada subtipo se comporta como si se tratase de enfermedades distintas. Las diferencias más importantes entre los subtipos moleculares incluyen diferentes respuestas a terapias y tratamientos locales o sistémicos [86, 87]. Los subtipos del cáncer de mama son 4: Luminal A, Luminal B, HER2 y Tipo Basal [85] (Figura 2.6).



**Figura 2.6: Clasificación molecular del cáncer de mama.** Izquierda: Mapa de calor del análisis de la firma genética del cáncer de mama (Adaptado de Perou y col., Nature 2000 [85]). Derecha: Mapa de calor de la generación de clústeres jerárquicos con genes identificados como predictivos de la clasificación molecular del cáncer de mama (Adaptado de Bild y col., Breast Cancer Res 2009 [88])

Debido a que la tecnología necesaria para identificar cada subtipo es sumamente costosa y muy difícil de utilizarse en la práctica clínica de rutina, se han hecho esfuerzos para

identificar los subtipos moleculares utilizando la información obtenida mediante el análisis inmunohistoquímico de los tumores (Tabla 2.7). El panel de expertos de la decimosegunda conferencia internacional de cáncer de mama de Saint Gallen (2011) estableció las guías para determinar el subtipo molecular a partir de los datos obtenidos en el análisis inmunohistoquímico [89].

Los cuatro marcadores que más información aportan a la clasificación de los tumores mamarios son el la expresión o no del receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico y Ki-67.

SUBTIPO MOLECULAR	MARCADORES DE INMUNOHISTOQUÍMICA	TRATAMIENTOS Y OBSERVACIONES
<b>LUMINAL A</b>	-ER y/o PR positivo -HER2 negativo -Proliferación baja (KI-67<14%)	- Tumores respondedores a hormonoterapia y dependiendo del tamaño tumoral y el estado de los ganglios linfáticos puede prescindirse de quimioterapia.
<b>LUMINAL B (HER2 -)</b>	-ER y/o PR positivo -HER2 negativo -Proliferación alta (KI-67>15%)	- Tumores respondedores a hormonoterapia y requieren quimioterapia. Tienen mayor agresividad que los Luminales A.
<b>LUMINAL B (HER2 +)</b>	-ER y/o PR positivo -HER2 positivo -Cualquier valor de KI-67	- Tumores que se benefician de hormonoterapia y del uso de trastuzumab (anti-HER2). Son más agresivos que los Luminales B HER2-.
<b>HER2</b>	-ER y PR negativos -HER2 positivo -Cualquier valor de KI-67	- Tumores que responden al uso de trastuzumab y requieren quimioterapia neoadyuvante. Generalmente presentan alto grado tumoral y son agresivos.
<b>TIPO BASAL</b>	-ER y PR negativos -HER2 negativo	Estos tumores triple negativos generalmente aunque no siempre son del tipo basal. Estos tumores no tienen tratamiento claramente dirigido por lo que tienen mal pronóstico

**Tabla 2.7: Marcadores proteómicos que predicen el subtipo molecular del cáncer de mama.** ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona, HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico.

Conocer las alteraciones genéticas, transcriptómicas y epigenéticas responsables del inicio y progresión del cáncer de mama, como así también las diferencias moleculares entre tumores de diferentes pacientes y entre tejido tumoral y normal es fundamental para establecer el riesgo de cada individuo, la detección temprana y un tratamiento cada vez más personalizado de la enfermedad.

# **CAPÍTULO TERCERO – EPIGENÉTICA Y CÁNCER**

La secuenciación del genoma humano fue finalizada en el 2003 y representa uno de los logros más importantes en la historia de la ciencia. Sin embargo, el conocimiento brindado por la secuencia de todo el genoma no es suficiente para explicar la gran variedad fenotípica observada en las poblaciones. El genoma humano almacena la información necesaria para el desarrollo de un individuo, pero las diferentes instancias en que esa información es utilizada, no dependen de la secuencia sino de otros factores que afectan al ADN, conocidos como factores epigenéticos. De esta manera se genera una gran variedad de fenotipos a partir de un mismo genoma. Un claro ejemplo de esto son los gemelos monocigóticos, individuos que compartiendo un genoma idéntico presentan diferencias fenotípicas y distinta predisposición a padecer enfermedades [90].

En el año 1939 Conrad H. Waddington haciendo alusión a un fenómeno observado en las diferencias en el desarrollo estructural de las moscas *Drosophila*, definió a la epigenética como la interacción entre los genes y sus productos que genera un fenotipo determinado [91, 92]. De esta forma, introduce en la consideración del determinismo genético, la influencia ambiental sobre la información de los genes.

### **3.1. Epigenética**

Epigenética significa semánticamente “*sobre la genética*” y comprende todos los mecanismos celulares que sin afectar la secuencia del ADN regulan la expresión de la información almacenada en éste. Representa el estudio de los procesos que influyen sobre la regulación genética, sin alterar la secuencia de los genes en particular o del genoma en su totalidad. Los procesos epigenéticos constituyen una programación esencial para el desarrollo y la diferenciación. A su vez son una fuente de diversidad fenotípica entre individuos, influenciada por cambios bioquímicos y ambientales [93]. Los mecanismos considerados epigenéticos son heredables en cada división celular y potencialmente reversibles [94, 95].

#### **3.1.1. Regulación epigenética**

La información epigenética provee instrucciones sobre cuándo y dónde debe ser utilizada la información genética. Esta regulación se produce por la combinación de dos mecanismos

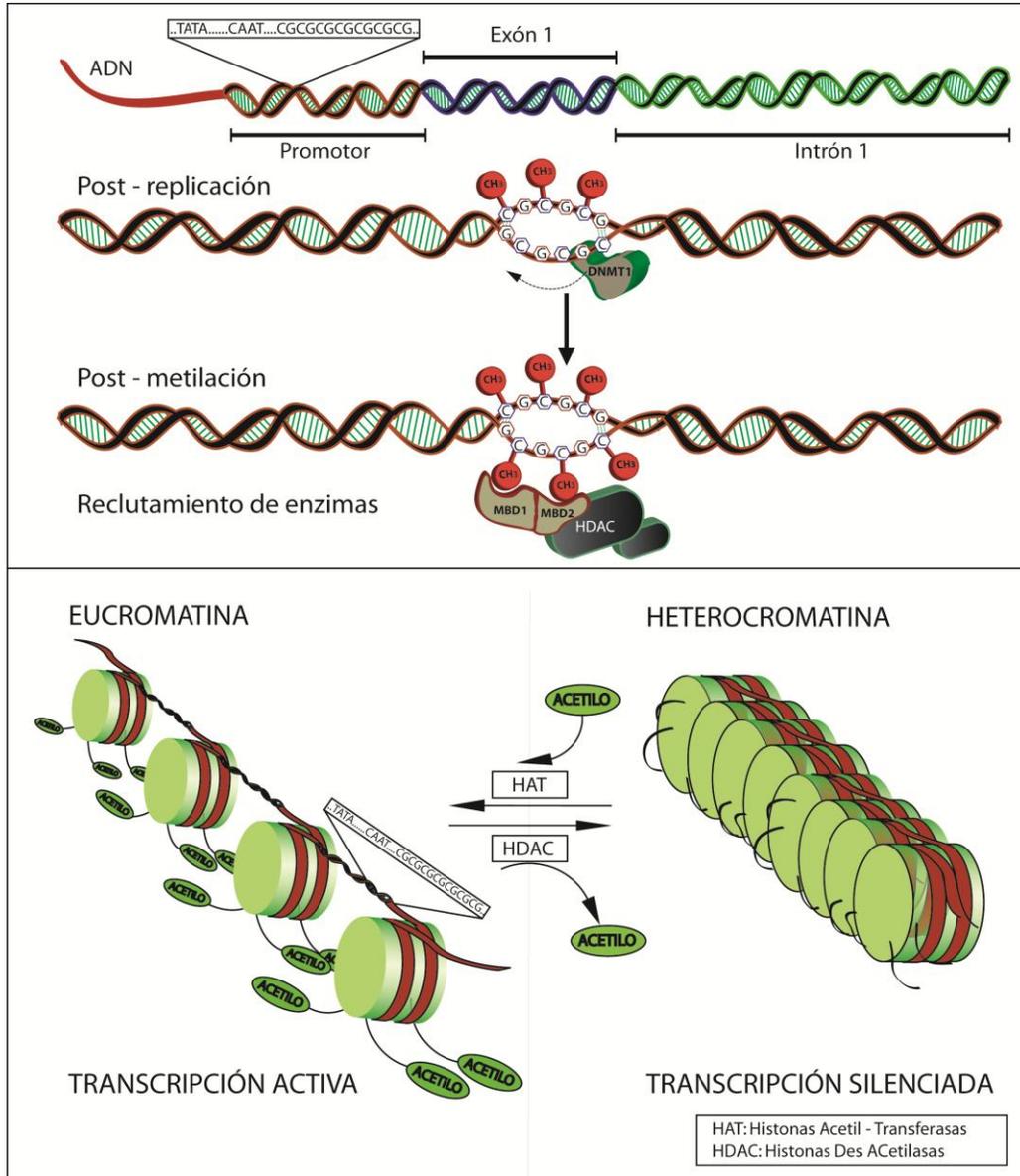
principales: la metilación del ADN, expresión de ARN no codificantes y las modificaciones químicas de las histonas.

### 3.2. Metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación post-replicativa que implica la unión covalente de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) al carbono de la posición número 5 de citosinas que preceden guaninas (dinucleótidos citosina-guanina o CpG). Estos no se encuentran uniformemente distribuidos en el genoma humano, sino que hay regiones donde su concentración es elevada denominadas “*islas citosinas-guaninas*” (ICpG). La metilación del ADN es un proceso muy bien caracterizado. Cuando las células se dividen, además de heredarse la secuencia de su genoma, se heredan los patrones de metilación presentes en la célula original. A diferencia de la información genética, la cual es transmitida de células madres a hijas con una tasa de variación baja, la información epigenética presenta una mayor dinámica. Este fenómeno propicia el desarrollo de diferencias en las especializaciones de células dentro de tejidos y se asocia con variaciones epigenéticas con el avance de la edad [96, 97]. La enzima encargada de mantener los patrones de metilación en las divisiones celulares es la ADN metil transferasa de mantenimiento (DNMT1). DNMT1 tiene afinidad por el ADN hemimetilado y transfiere grupos metilos desde S-adenosil-L-metionina a citosinas de la cadena hija recientemente sintetizada (Figura 3.1). Las mutaciones en el gen que codifica DNMT1 se relacionan con una disminución de la metilación del genoma. Por ejemplo, como demuestran Cardoso y Leonhardt, aquellas mutaciones que afectan el extremo amino-terminal (-NH<sub>2</sub>) de la proteína DNMT1 impiden su migración al núcleo para cumplir con su función de mantenimiento de la metilación [98]. Otras enzimas relacionadas con la metilación del ADN son las DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L se relacionan con la metilación del ADN *de novo*, es decir, sin necesidad de un molde hemimetilado para actuar [99]. Estas enzimas tienen un rol protagónico en el borrado y la reprogramación epigenética en células germinales primordiales durante el desarrollo embrionario [99].

La consecuencia de la metilación del ADN es que en la región del genoma donde ocurre se desencadena un proceso que culmina con el silenciamiento transcripcional de los genes relacionados con las ICpG afectadas [100, 101]. De este modo, dependiendo de la distribución de la metilación del ADN, células con un mismo genoma presentan expresión

génica diferencial, lo que produce fenotipos diferentes. Cuando la metilación está alterada, es decir, cuando se metilan genes que no deben estar silenciados o se desmetilan genes que deben estar silenciados, las células pueden ingresar en procesos patológicos.



**Figura 3.1: Principales mecanismos epigenéticos.** Arriba: Representación de la estructura básica de un gen, mantenimiento de los patrones de metilación y reclutamiento de proteínas reguladoras de la estructura de la cromatina. Abajo: estados alternativos de la cromatina. Se destaca la acetilación de histonas y su influencia sobre la condensación del ADN.

### **3.3. Expresión de ARN no codificantes**

El rol de la expresión de pequeñas moléculas de ARN que no codifican proteínas ha tomado relevancia en la investigación del cáncer en los últimos años. El principal rol de estas moléculas es la regulación epigenética del funcionamiento de casi el 60% de los genes humanos. Los ARN no codificantes pueden ser clasificados en dos tipos según su longitud. Los ARN no codificantes largos suelen medir más de 200 nucleótidos [102], mientras que los ARN no codificantes cortos (menos de 200 nt) son divididos de acuerdo a su función y longitud en micro ARN [103], pequeños ARN de interferencia [104], ARN que interactúan con Piwi [105] y pequeños ARN nucleolares [106]. Más allá de la división respecto a la longitud, estas moléculas presentan funciones similares que van desde la represión transcripcional del cromosoma X inactivo en la embriogénesis (Xist en el corpúsculo de Barr) hasta el bloqueo de la traducción de genes relacionados con el ciclo celular (miR oncogénicos y miR supresores de tumor) [107]. El procesamiento de estas moléculas desde su biogénesis en la transcripción hasta su rol como reguladores de la expresión génica involucra complejas vías que en algunos casos involucran la metilación del ADN como factor regulador.

### **3.4. Modificaciones de histonas**

Por décadas la cromatina fue considerada una estructura inerte, con el único rol de compactar y confinar el ADN dentro de los núcleos eucariotas. Pero durante los últimos 20 años, su función ha sido elevada a un lugar clave en el control de la expresión génica. La cromatina puede encontrarse en dos estados principales. Uno de ellos es llamado eucromatina, que se caracteriza por presentar una estructura laxa del empaquetamiento del ADN. En esta conformación se encuentran genes que pueden ser transcripcionalmente activados. El otro estado es llamado heterocromatina en el cual el ADN se encuentra altamente condensado y los genes presentes en esta estructura están ocultos para cualquier factor transcripcional. La unidad básica y repetitiva de la cromatina es el nucleosoma, el cual está formado por un segmento de 146 pares de bases (pb) de ADN (con carga negativa) que gira dos veces alrededor de un octámero de proteínas básicas llamadas histonas (con carga positiva). Los integrantes del octámero son 2 moléculas de cada una de las 4 diferentes histonas que participan, H2A, H2B H3 y H4 [108]. Este arreglo coloca a las

proteínas histonas en un lugar central para la determinación de la compactación del ADN y por ende para la estructura de la cromatina y expresión selectiva de los genes. Los extremos -NH<sub>2</sub> de las histonas poseen entre 16 y 44 aminoácidos que no forman parte del mantenimiento estructural del nucleosoma, pero que al ser modificados reversiblemente propician cambios muy importantes en la condensación de la cromatina [109]. Las modificaciones incluyen acetilación, metilación, fosforilación, SUMOilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación. Cada una produce un efecto en la condensación de la cromatina específico. En conjunto se denominan el “código histona” (Figura 3.2 y tabla3.1).

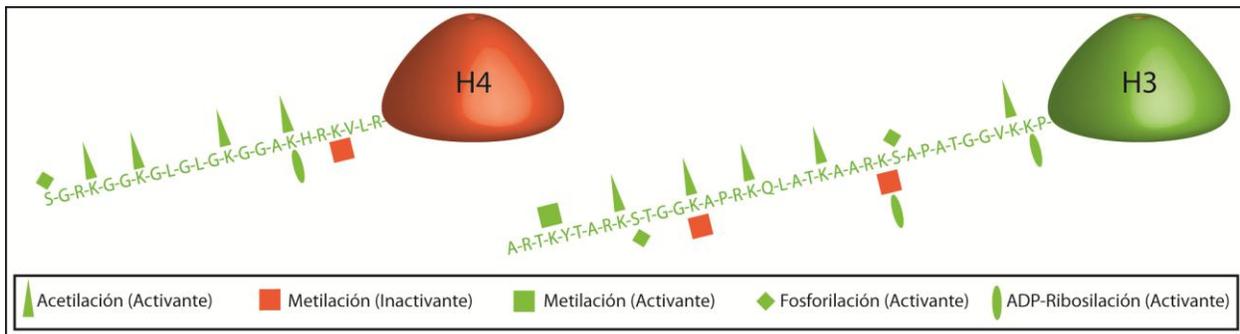
Modificación	Histona involucrada/ residuo afectado	Efecto en la condensación de la cromatina y la transcripción.	Ref.
Acetilación (-Ac)	Todas, en 26 residuos distintos.	Promueve el desplegado: Transcripción activa propiciada por la HAT.	[110]
Metilación (-Me)	H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 y H4K20	H3K4-Me se asocia con activación mientras H3K9-Me y H3K27-Me con inactivación de la transcripción.	[111]
Fosforilación (-PO <sub>4</sub> )	H2AS1, H3210, H3S28 y H4S1	H3-PO <sub>4</sub> se asocia con activación de transcripción.	[112]
Ubiquitinación (-Ub)	H2AK119 y H2BK120	K120 H2B -Ub: Transcripción activa. El avance de la transcripción induce -Ub que relaja la cromatina.	[109]
SUMOilación (SUMO)	Lisinas del amino terminal de H4	Represión transcripcional.	[113]
ADP-ribosilación (ADP-R-)	H2AK13, H2BK30, K16H4, H3K27 y K37	PARP1 ADP-ribosila lisinas lo que lleva a una apertura de la cromatina facilitando la transcripción.	[114]
Glicosilación (O-GlcNAc)	H2BS36, H4S47	Se asocia con la condensación de la cromatina y por ende con la inactivación de la transcripción.	[115]

**Tabla 3.1: Código histona.** Modificaciones post-traduccionales de las histonas, indicando la histona y los residuos afectados [Lisina (K), Serina (S)] y el efecto en la regulación de la expresión genética.

Una de las modificaciones de las histonas mejor comprendida y más relacionada con los procesos epigenéticos de condensación de la cromatina, es la acetilación de las lisinas.

- **Acetilación de las histonas:** al analizar los extremos -NH<sub>2</sub> del octámero de histonas que constituyen el nucleosoma, se observan 23 lisinas (K) en las que pueden ser incorporadas residuos acetilos (-COCH<sub>3</sub>). La acetilación promueve el desplegamiento de la cromatina facilitando la interacción entre factores de transcripción y el ADN [116]. Este es un proceso sumamente dinámico, catalizado por dos enzimas. La acetilación es realizada por las histona acetil transferasas (HAT) mientras que la desacetilación es realizada por las histona deacetilasas (HDAC). El reclutamiento de las HAT en la cromatina estimula el inicio y/o la elongación de la transcripción dependiendo del lugar que ocupe el nucleosoma afectado en el gen. Por otro lado, el reclutamiento de las HDAC

se asocia con un aumento de la organización de la cromatina y por ende con una represión de la transcripción [117].



**Figura 3.2: Código histona.** Representación de las modificaciones en los extremos amino terminales de las histonas 3 y 4 (Adaptado de Mutat Res. 2008;647:44-51 [118]).

### 3.4.1. Relación entre la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas

La metilación del ADN es un proceso que por sí solo no tiene la capacidad de impedir la transcripción. Existe una familia de proteínas que contienen un dominio de unión al ADN metilado llamadas MBDs (del inglés “methyl binding domain”) que unidas al ADN reclutan una serie de enzimas modificadoras de las histonas [119]. Estos complejos llevan a un cierre de la cromatina, lo que impide la transcripción del gen. Otra relación entre estos procesos se produce cuando la lisina 4 de la histona H3 está desmetilada se reclutan las DNMTs tipo 3 que inducen una metilación del ADN *de novo* [120]. El epigenoma es específico de cada tipo celular, por lo que el estudio de las variaciones del mismo puede explicar los cambios fenotípicos normales y patológicos en un tejido determinado.

### 3.5. Dinámica epigenética e interacción con el ambiente

Como se mencionó anteriormente, la información epigenética presenta una considerable variabilidad, la cual se acentúa con el avance de la edad [97]. Por otro lado experimentos que siguen los patrones de metilación a través de generaciones de células en cultivo muestran que el mantenimiento de la información epigenética no es exacto y que los eventos de metilación *de novo* son procesos comunes [121]. Esta naturaleza dinámica de la información epigenética es influenciada por factores ambientales nutricionales, químicos y físicos. Una forma de evaluar el efecto ambiental sobre el epigenoma es el estudio de gemelos monocigóticos. Se ha demostrado que aquellos gemelos de avanzada edad y con

historia de vida en la cual no han compartido el mismo ambiente, presentan diferencias significativas en la conformación de su epigenoma [90]. Incluso, otros estudios han establecido diferencias epigenéticas en parejas de gemelos monocigóticos en los primeros años de vida [122]. La explicación de esta observación es que los factores ambientales prenatales y en los primeros años de vida parecieran tener un rol determinante en el epigenoma del individuo [123]. En las primeras etapas del desarrollo embrionario, durante las cuales las células van adquiriendo diferenciación, la dinámica del establecimiento de las marcas epigenéticas es muy importante. Esto explica entre otros, la alta correlación encontrada entre la desnutrición fetal y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la vida adulta [124].

En cultivos celulares, se ha demostrado que el aporte sostenido del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) induce la metilación de ICpGs presentes en el promotor del gen de la caderina epitelial (CDH1). Esto dispara un cambio fenotípico muy marcado, que representa la base de la transición epitelio - mesénquima, paso obligado en la cascada invasión - metástasis de los carcinomas [125].

### **3.6. Rol de la epigenética en salud y enfermedad**

#### **3.6.1. Metilación del ADN en células normales**

Como afirma el médico español Manel Esteller “*necesitamos ciertos niveles de 5-metilcitosina en nuestros genomas para ser considerados seres humanos*” [126]. Esta afirmación toma fuerza a medida que nuestro conocimiento sobre la epigenética de las células normales avanza. Observamos que las regiones repetitivas no codificantes del genoma se encuentran altamente metiladas mientras que la mayoría de las ICpG presentes en los genes se encuentran no metiladas, lo cual permite la libre expresión cuando son activados por factores activadores de la transcripción [127]. Sin embargo hay ocasiones normales en las cuales las ICpG de algunos promotores génicos se encuentran metiladas, como parte de la programación epigenética del desarrollo normal. En este sentido la metilación del ADN es imprescindible para una serie de procesos celulares muy importantes, como:

- Impedir saltos intragénicos de elementos codificados en el genoma humano, como secuencias Alu, LINEs [128-130].

- Impedir la inserción de genomas retrovirales [131].
- Mantener la información del imprinting parental [132].
- Evitar la partenogénesis [133].
- Compensar la información genética entre mujeres y hombres, mediante la inactivación de uno de los dos cromosomas X en el genoma femenino [134, 135].
- Diferenciación celular desde el desarrollo embrionario hasta la organización tisular adulta [136].

### **3.6.2. Metilación del ADN en células tumorales**

Las células tumorales adquieren un programa de expresión génica diferente al de las células normales en gran parte como resultado de cambios en el epigenoma. Aquellas células que por estos cambios adquieren ventajas sobre el resto, son seleccionadas y su programación epigenética es heredada a sus células hijas. Los patrones de metilación difieren entre y dentro de un tipo de cáncer [137].

Las alteraciones en la metilación del ADN pueden ser clasificadas en dos grupos: uno de ellos incluye las alteraciones que promueven una hipometilación del genoma y el otro las alteraciones que promueven una hipermetilación de ICpG relacionadas con el silenciamiento transcripcional [138].

#### **3.6.2.1. Hipometilación global del genoma tumoral**

Durante el desarrollo de una neoplasia, el grado de metilación del ADN va disminuyendo con el progreso del tumor desde una lesión benigna a una invasora (Figura 3.3) [139]. Las células tumorales pueden tener hasta un 60% menos de 5-metil citosina que las células normales [140]. La hipometilación global del genoma causa tres efectos que alteran sensiblemente el normal funcionamiento celular [126]. Primero, inestabilidad cromosómica. Las regiones repetitivas del genoma son las más extensas y las más afectadas por la hipometilación. Este proceso favorece la recombinación mitótica, la pérdida de heterocigosidad (LOH) y la aparición de cariotipos aberrantes por aneuploidías o rearrreglos cromosómicos [141]. Segundo, la reactivación de elementos transponibles. Al disminuir la metilación que mantiene silenciados a estos elementos, pueden activarse y

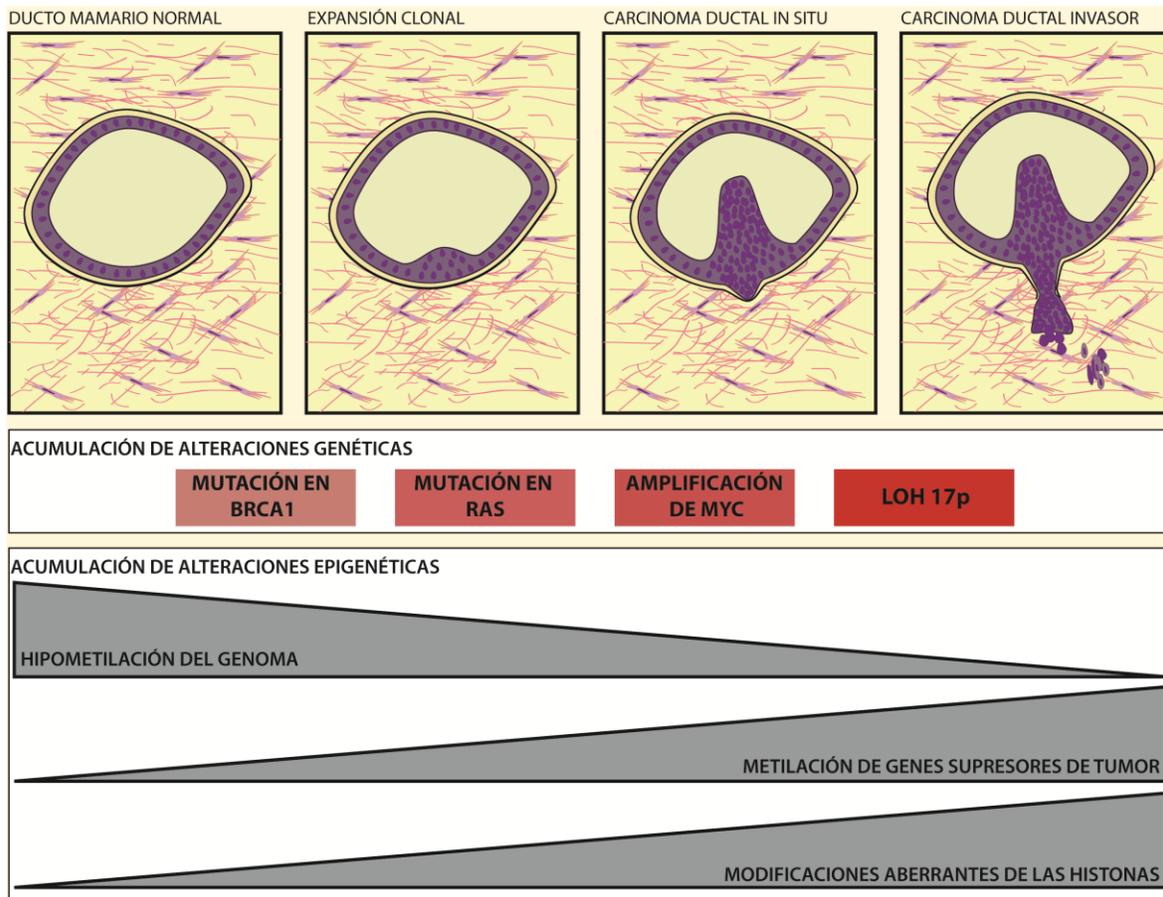
causar severos daños genéticos a la célula [142]. Tercero, la pérdida del imprinting (LOI). Debido a la disminución del nivel de metilación algunos genes regulados por imprinting pierden su expresión uniparental lo que produce un exceso de la expresión de los mismos. Por ejemplo, en el locus H19/IGF-2 la LOI induce la doble expresión del gen IGF-2 el cual es un potente factor de crecimiento relacionado con la insulina. Este efecto puede ser observado en el síndrome de Beckwith-Wiedemann en el cual algunos pacientes presentan hipometilación. El cuadro clínico incluye tumores renales, macroglosia, gigantismo e hipoglucemia [143]. Otro proceso afectado por la hipometilación es la inactivación del cromosoma X, lo que lleva a una doble expresión de los genes codificados en este cromosoma y hay evidencias de que su activación se relaciona con peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama y ovario [144]. Finalmente, otro efecto atribuido a la hipometilación es la relajación del control transcripcional de proto-oncogenes y genes pro-metastásicos [145, 146].

### **3.6.2.2. Metilación aberrante de genes reguladores del ciclo celular**

Existe una gran cantidad de genes cuya disfunción se relaciona con el inicio y la progresión tumoral. Se ha establecido que el mecanismo de inactivación de genes más frecuentemente observado en tumores esporádicos es la metilación aberrante, aún más que las deleciones y las mutaciones [147]. Cuando los genes que regulan el crecimiento celular se encuentran metilados, las células afectadas se embarcan en un crecimiento desregulado. Diversos trabajos han identificado una extensa lista de genes aberrantemente metilados en neoplasias humanas. Algunos de estos genes se encuentran afectados en varios tipos de tumores, mientras que otros están restringidos a un grupo de neoplasias. Estos últimos sugieren una cierta especificidad de las alteraciones epigenéticas. Algunos genes actúan como reguladores del ciclo celular (RB, p53, p73, p16, p15) [148, 149], reparadores del ADN (BRCA1, BRCA2, MLH1, MGMT) [150], reguladores de la apoptosis (CASP8, DAPK1) [151], mediadores de la detoxificación (GSTP1) [152], reguladores hormonales (ER, RARB2, TSH) [153], moléculas de adhesión e inhibidoras de invasión (CDH1, CDH13, TIMP3) [154, 155].

Entender las alteraciones epigenéticas asociadas con la adquisición de ventajas para el desarrollo y la progresión del cáncer, es de gran utilidad a los efectos de predecir el riesgo

patológico de un tejido, para establecer nuevos marcadores pronóstico y predictivo del cáncer y utilizarlos para realizar el seguimiento de recaída de la enfermedad [156]. Durante la tumorigénesis algunos tumores pueden adquirir un conjunto de alteraciones genéticas y epigenéticas que le confieren un fenotipo metilador de ICpG (CIMP). En el mismo se observa una alta frecuencia de metilación concurrente de determinados genes [157].



**Figura 3.3: Alteraciones genéticas y epigenéticas en cáncer:** Representación de las posibles y más significativas alteraciones que sufren las células normales durante la tumorigénesis (Adaptado de N. Engl. J. Med. 2008;358:1148-59 [127])

### 3.6.3. Epigenética en el manejo del cáncer

La metilación del ADN y las modificaciones de las histonas que ocurren a lo largo del proceso tumoral tienen un potencial uso clínico. La determinación del estado de metilación de genes individuales puede ser utilizada como biomarcador para la detección, el pronóstico o la predicción de respuesta a tratamientos.

El perfil de metilación aberrante es una característica específica del tumor y su detección en fluidos corporales puede servir para detectar la presencia de tumores. Por ejemplo, el gen de la glutatión S transferasa (GSTP1) está metilado en el 80 al 90% de pacientes con cáncer de próstata, pero no lo está en las hiperplasias prostáticas, por lo cual la detección de metilación de la GSTP1 en muestras de orina, permite distinguir entre cáncer de próstata y procesos benignos [158].

La metilación del gen RASSF1A es indicador de mal pronóstico en pacientes con melanoma. Recientemente Tanemura y colaboradores han demostrado que este gen no se encuentra metilado en melanomas de estadíos I o II, sin embargo está metilado en el 50% de los melanomas estadíos IV [159].

Finalmente, la metilación aberrante de un determinado gen es potencialmente un biomarcador de respuesta a determinados tratamientos. Un ejemplo es el silenciamiento epigenético del gen MGMT. La función de la proteína codificada por MGMT participa en la reparación del ADN inducido por quimioterapias con agentes alquilantes, por lo cual su presencia representa un factor de resistencia al tratamiento. La detección de metilación aberrante en el promotor de MGMT es un predictor independiente de buena respuesta de los gliomas a la administración de carmustina o tolozolomida [160].

#### **3.6.4. Terapia epigenética del cáncer**

Muchos tumores sólidos son inicialmente sensibles a la quimioterapia pero con el tiempo pueden adquirir resistencia. Las epimutaciones suceden a una mayor frecuencia que las mutaciones de los genes y por lo tanto tienen mayor impacto en la selección de subpoblaciones celulares durante el progreso tumoral como la adquisición de resistencia a drogas antineoplásicas [161].

La utilización de las alteraciones epigenéticas como blanco para tratamientos oncológicos se basa en la premisa de que estos cambios son de algún modo reversibles. Con estos tratamientos se busca restablecer la expresión de genes supresores tumorales perdidos por la metilación de sus promotores. Un ejemplo de esto es la utilización de agentes desmetilantes para la recuperación de la expresión de genes silenciados en líneas celulares [162]. Este tipo de drogas en bajas dosis tienen aplicación clínica en el tratamiento de

algunos tumores. Dos de estos agentes son la 5-azacitidina (Vidaza®) y la 5-aza-2'-deoxicitidina (Decitabine®) que han sido aprobadas por la FDA (del inglés Food and Drug Administration) para el tratamiento del síndrome mielodisplásico y las leucemias [163]. Ambas drogas son inhibidoras de la DNMT1.

Otra alteración epigenética que puede ser reparada involucra las modificaciones de las histonas. Los inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC) han mostrado la capacidad de causar diferenciación celular, impedir la proliferación celular y favorecer la apoptosis in vitro [162]. La primer droga utilizada fue el ácido hidroxámico suberoilánilida (Vorinostat®), aprobado por la FDA para el tratamiento de los linfomas cutáneos de células T. El inhibidor de la HDAC, trichostatin A (TSA) es otra droga que ha mostrado excelentes resultados en tratamientos de líneas celulares [162].

### **3.6.5. ADN tumoral circulante**

En el año 1869 el médico australiano Tomas Ashworth publicó en la revista médica de Australia, la observación de células tumorales en la circulación sanguínea periférica de un hombre fallecido por cáncer metastásico. Este es el primer reporte de las células tumorales circulando (CTC) en pacientes con cáncer. Hoy el campo de la investigación de CTC ha crecido enormemente y hay evidencias de que el aumento de estas células se relaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer avanzado [164]. Se ha estimado que, dependiendo del estado clínico del paciente pueden encontrarse entre 1 CTC / 10.000.000 a 1 CTC / 100.000 células sanguíneas mononucleadas [165]. Los métodos de detección de CTC deben: 1- discriminar entre células tumorales (epiteliales en caso de carcinomas) y sanguíneas (hematopoyéticas). 2- discriminar entre células epiteliales tumorales y células epiteliales normales. Las detecciones se realizan mediante anticuerpos monoclonales diseñados contra marcadores epiteliales utilizando citómetros de flujo con separadores de células. Massimo Cristofanilli y colaboradores establecieron que la detección de más 5 CTC cada 7,5 ml de sangre completa podía ser considerada una detección positiva [166]. Los puntos débiles de este método son el gran volumen de sangre necesario y los problemas para discriminar correctamente las CTCs [164].

Otro fenómeno observado en la progresión tumoral es la liberación de ácidos nucleicos libres de células. En 1948 los franceses Mandel y Métais observaron la tinción de ácidos nucleicos fuera de las células que estaban investigando. Este hallazgo lo reportaron tanto en personas sanas como en pacientes con distintas enfermedades [167]. Luego de años en el olvido, la investigación del ADN circulante se reflató en la década del 60 cuando se observó aumento de los niveles en pacientes con lupus eritematoso sistémico [168] y luego en la década del 70 cuando se demostró que los niveles de ADN circulante eran más elevados de lo normal en pacientes con cáncer y que aumentaban en procesos metastásicos [169]. Durante la década del 90 se estableció que el origen del ADN libre en la circulación era el producto de la apoptosis, la necrosis y el daño tisular y celular de células sanas y tumorales [170, 171]. Se ha demostrado en individuos sanos que la concentración del ADN libre es aproximadamente de 10 ng/ml de suero, mientras que en pacientes con procesos oncológicos el nivel supera los 100 ng/ml [171]. El principal problema de utilizar la cuantificación de ADN como factor pronóstico es la interferencia del ADN normal. Se ha demostrado que el ADN de células sanguíneas puede ser liberado durante el proceso de coagulación, lo que puede llevar a la sobre estimación de los niveles de ADN circulante [172]. Por lo cual, rasgos en el ADN circulante propios del tumor, como mutaciones, inestabilidad de microsatélites o metilación aberrante, son blancos claves para la detección y seguimiento del ADN tumoral libre en la circulación de los pacientes con cáncer.

### **3.6.6. Métodos y técnicas para estudiar la metilación aberrante**

Las técnicas para estudiar la metilación del ADN actualmente utilizadas, pueden ser clasificadas de acuerdo a diferentes aspectos. Uno de ellos involucra la estrategia molecular empleada y el otro la cantidad de genes susceptibles de ser analizados.

#### **3.6.6.1. Estrategia molecular empleada**

Las tres estrategias principales para el estudio de la presencia de 5-metil citosina en el ADN son: a- conversión con bisulfito de sodio, b- digestión con enzimas sensibles a metilación y c- identificación mediante anticuerpos monoclonales [173].

- **Técnicas basadas en el tratamiento con bisulfito de sodio.**

La conversión con bisulfito de sodio ( $\text{NaHSO}_3$ ) es el paso inicial de varias técnicas, la mayoría de las cuales son complementadas con la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa). Este reactivo produce desaminación de las citosinas las cuales se convierten en uracilos, mientras que las 5-metil citosinas no son afectadas y permanecen como citosinas. Luego se amplifican los fragmentos génicos de interés con cebadores específicos para alelos metilados y alelos no metilados. La técnica más básica que utiliza esta combinación es llamada PCR metil específica (MSP, del inglés Methyl-Specific PCR) y fue utilizada por primera vez por Herman y colaboradores [174]. Una desventaja de estas técnicas es que la conversión con bisulfito de sodio requiere mucho tiempo y el proceso degrada el ADN convertido, al punto de no ser aconsejable la posterior amplificación de fragmentos mayores a 300 pb. La mayor ventaja es que al ser acoplado con la amplificación por PCR adquiere una gran sensibilidad.

- **Técnicas basadas en digestión con enzimas sensibles a metilación.**

Las enzimas utilizadas en esta estrategia son aquellas que digieren selectivamente sitios de restricción que presentan citosinas no metiladas. Entre las enzimas con esta capacidad encontramos CfoI, HhaI, HpaII y NotI. La digestión del ADN genómico con estas enzimas permite realizar una identificación de regiones metiladas y no metiladas. Al igual que la conversión con bisulfito de sodio, esta estrategia sirve de punto de partida de diferentes técnicas, por ejemplo la posterior amplificación por PCR o la detección de los fragmentos digeridos mediante sondas específicas en la técnica denominada Southern blot específico de metilación [175]. La ventaja de estas técnicas es que evitan la utilización de bisulfito de sodio y como aspecto negativo presentan la potencial digestión enzimática incompleta, la cual debe ser considerada.

- **Técnicas basadas en el uso de anticuerpos monoclonales.**

Estas técnicas se basan en la precipitación de la cromatina capturada con anticuerpos específicos de 5-metil citosinas. Luego de la captura, los fragmentos de ADN son amplificados por PCR y las regiones metiladas son identificadas. Otra opción permite el marcado del genoma in situ y la visualización mediante microscopía confocal [176].

Además de anticuerpos diseñados contra 5-metil citosinas, pueden emplearse anticuerpos diseñados contra las distintas modificaciones de las histonas. La técnica que utiliza este algoritmo se denomina inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, del inglés Chromatin Immuno Precipitation) [176].

### **3.6.6.2. Número de genes analizados**

De acuerdo al número de regiones analizadas, las técnicas pueden clasificarse en cuatro grupos: a- análisis específicos de una región, b- análisis de perfiles o firmas epigenéticas, c- análisis epigenómicos y d- análisis de la densidad de metilación del genoma [173].

#### **- Técnicas para el análisis específico de una región**

La característica de estas técnicas es que testean la metilación de una región del genoma puntual (generalmente ICpGs). En general requieren de un diseño específico y reacciones separadas para el análisis de más de una región de interés. La ventaja de estas técnicas es su exactitud en la información de una región de interés y su alta sensibilidad ya que generalmente incluyen PCR como uno de sus pasos. La principal desventaja es que limitan su análisis a una región, lo que disminuye el espectro de alteraciones en la metilación detectables. Incluso en casos donde el gen de interés no se encuentra metilado, este resultado no difiere de un tejido control. Entre estas técnicas se destacan: MSP, Secuenciación dependiente de Bisulfito de sodio (BSP) [177], Análisis de restricción y bisulfito de sodio combinados (COBRA) [178] y PCR en tiempo real cuantitativa específica de metilación (MethyLight) [179], entre otras.

#### **- Técnicas para el análisis de perfiles o firmas epigenéticas.**

Estas técnicas permiten establecer el estado de metilación de grupos de regiones sin importar el lugar que ocupen en el genoma. La gran ventaja de estas técnicas es que en pocas reacciones se puede generar un perfil de las alteraciones en el patrón de metilación de una muestra determinada. La técnica denominada Amplificación de múltiples sondas dependiente de ligación específica de metilación (MS-MLPA del inglés Methyl-Specific Multiplex Ligation Probe Amplification) permite el análisis del estado de metilación de al menos 25 islas CpGs por reacción. La gran ventaja de esta técnica es que evita la utilización de Bisulfito de sodio [180].

- **Técnicas para el análisis epigenómico.**

Estas técnicas están diseñadas para el análisis del estado de metilación de un gran número de regiones genómicas. Su capacidad permite el análisis de todos los cambios epigenéticos ocurridos en el genoma. La ventaja y a su vez desventaja de estas técnicas es la cantidad de información. Si bien esto permite un panorama completo del proceso epigenético existe un gran porcentaje de los datos que no son útiles e interfieren en los análisis bioestadísticos. Otro problema que presentan es que generalmente puede procesarse de a una muestra por vez y suelen presentar un alto costo. Por ello son generalmente utilizados para decidir cuáles son las regiones representativas de una patología, para luego solo enfocarse en ellas mediante técnicas para el análisis de perfiles o firmas epigenéticas. Entre estas técnicas se destacan los microarreglos específicos de metilación (microarrays) como la plataforma Infinium® que analiza en 12 muestras simultáneas, la metilación de 14.000 regiones, no necesariamente involucradas con los procesos oncológicos y la plataforma GoldenGate®, la cual analiza en hasta 96 muestras, la metilación de 800 regiones. Otra desventaja de estas técnicas es que requieren el paso inicial de conversión con bisulfito de sodio [173].

- **Técnicas para el análisis de la densidad de metilación genómica.**

Estas técnicas tienen como principal objetivo determinar la cantidad de metilación presente en el ADN en cuestión. La principal utilidad de ellas es la estimación de cambios significativos en los niveles de metilación, como la hipometilación reportada en tumores avanzados. La desventaja es que establecen cambios en la metilación, pero no aportan indicios de cuáles son las regiones comprometidas. Entre estas técnicas encontramos: Cromatografía de fase líquida de alto rendimiento (HPLC) [181], Inmunoprecipitación de la cromatina con 5-Me-Citosina (ChIP) [176], Electroforesis capilar de alto rendimiento (HPCE) [182].

## **SEGUNDA PARTE: MARCO METODOLÓGICO**

# **CAPÍTULO CUARTO – PROPÓSITO Y PROCEDIMIENTOS**

#### **4.1. Objetivos de la tesis**

Esta tesis doctoral tiene como objetivo general identificar alteraciones epigenéticas relacionadas con el pronóstico, la predicción de respuesta a tratamientos y la detección no invasiva del cáncer de mama humano.

##### **4.1.1. Objetivos específicos**

Para cumplimentar este objetivo general, el trabajo se divide en tres bloques de trabajo:

#### **1- Alteraciones epigenéticas en la carcinogénesis mamaria**

**Objetivo específico 1:** Estandarizar el uso de la técnica MS-MLPA para el análisis del estado de metilación de 49 regiones ubicadas en 34 genes relacionados con el desarrollo y la progresión del cáncer.

**Objetivo específico 2:** Determinar el perfil de metilación aberrante de 49 regiones genéticas en tumores mamarios invasores.

**Objetivo específico 3:** Evaluar la especificidad del perfil de metilación tumoral.

#### **2- Relaciones entre las alteraciones epigenéticas y características clínicas y patológicas del cáncer de mama**

**Objetivo específico 4:** Establecer las relaciones entre los perfiles de metilación tumoral y las características clínicas y patológicas de los tumores mamarios.

#### **3- Detección no invasiva de procesos tumorales en la glándula mamaria**

**Objetivo específico 5:** Detectar ADN tumoral circulando en la sangre pre-quirúrgica de pacientes con cáncer de mama, basado en el perfil de metilación tumoral.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Pacientes y muestras incorporadas**

El estudio incluyó un total de 123 pacientes, de los cuales 92 presentaron cáncer de mama, 17 melanoma, 8 cáncer de hígado y 6 cáncer de próstata. El reclutamiento de los pacientes se realizó en la provincia de Mendoza, Argentina y en el estado de California, Estados Unidos.

#### **- Evaluación del proyecto por comité de bioética**

Las implicancias de las hipótesis, los objetivos y los protocolos abordados en la investigación fueron evaluadas de acuerdo a los principios éticos de la declaración de Helsinki [183]. El día 11 de Setiembre de 2006, durante la reunión del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, se evaluaron y aprobaron el proyecto y el correspondiente consentimiento informado (Anexos I y II).

Los pacientes de Estados Unidos fueron incluidos bajo los lineamientos del protocolo aprobado por el Comité de revisión institucional del Saint John's Health Center/John Wayne Cancer Institute (Santa Monica, CA, USA).

#### **- Pacientes con cáncer de mama de Argentina**

Durante el período comprendido entre el mes de noviembre del año 2006 y el mes de diciembre del año 2009 se incorporaron al estudio 86 pacientes operadas por alguna afección en la glándula mamaria. Del total de las pacientes, 80 presentaron algún tipo de tumor maligno y 6 pacientes presentaron otras patologías: fibroadenoma (n=3), fibroadenoma gigante (n=1), un proceso inflamatorio mamario debido a embarazo (n=1) y papiloma (n=1) (Tabla 4.1). Los tumores de 70 pacientes fueron identificados como carcinomas ductales invasores. Estos tumores fueron utilizados para el estudio de diferencias entre los factores clínicos y patológicos por pertenecer a la misma variedad histopatológica (Tabla 4.2). Todas estas pacientes fueron operadas por el grupo de médicos encabezado por el Dr. Francisco Gago, en dos instituciones de la provincia de Mendoza: el Instituto Gineco-Mamario (IGM) y el Hospital Italiano.

Origen de las pacientes	Tipo de tumor	Número	%
Provincia de Mendoza	Total	80	
	Carcinoma Ductal Invasor (CDI)	70	87,5
	Carcinoma Lobulillar Invasor (CLI)	6	7,5
	Otros	4	5
Estado de California	Total	12	
	Carcinoma Ductal Invasor (CDI)	10	83,3
	Carcinoma Lobulillar Invasor (CLI)	2	16,7

**Tabla 4.1 Pacientes con cáncer de mama incluidas en el proyecto de tesis.** Detalle del tipo histológico del tumor de las pacientes incluidas en la provincia de Mendoza y en el estado de California.

#### - **Recolección del material de estudio**

Todas las muestras fueron obtenidas y procesadas dentro del quirófano dónde se realizó la correspondiente intervención.

- a. Sangre pre-quirúrgica: Previo a la administración de las drogas anestésicas se procedió a la extracción de 3-6 ml de sangre periférica, la cual fue congelada luego de la cirugía. Esta extracción fue realizada por el médico anestesista.
- b. Tejido tumoral y margen de seguridad quirúrgica: Luego de la obtención de la pieza quirúrgica y del examen anatomopatológico intraquirúrgico se procedió a la disección de porciones de tejido tumoral y de tejido normal del margen de seguridad quirúrgica.
- c. Tejido ganglionar: Los ganglios linfáticos fueron analizados mediante la técnica de exploración del ganglio centinela. Luego del análisis micro y macroscópico del tejido se procedió al congelamiento de 21 ganglios linfáticos positivos (con células neoplásicas) y 3 ganglios linfáticos negativos (sin células neoplásicas).

#### - **Identificación de las muestras incluidas**

Todas las pacientes incluidas en la investigación fueron identificadas mediante un código alfanumérico para preservar su identidad. El código utilizado para cada paciente consistió en un número y las letras CM (refiriendo a Cáncer de Mama), por ejemplo la primer paciente del estudio fue la paciente CM01.

Para identificar los distintos tipos de muestras de cada paciente se asignó una letra extra en referencia al tejido en cuestión.

- CMT01 es la porción del tejido tumoral almacenado de la paciente CM01
- CMG01 refiere a tejido ganglionar
- CMN01 a tejido normal
- CMS01 a la correspondiente muestra de sangre de la mencionada paciente

Característica	Número	%
Total de pacientes	70	
Edad (media: 54,79 años)		
> 50 años	36	51,4
≤ 50 años	34	48,6
Metástasis en ganglios linfáticos		
Negativa	39	55,7
Positiva	31	44,3
Grado tumoral		
1- Bajo	12	17,1
2- Intermedio	30	42,9
3- Alto	28	40
Grupo Pronóstico basado en NPI		
1- Buen pronóstico	25	35,7
2- Moderado pronóstico	34	48,6
3- Mal pronóstico	11	15,7
Tasa de proliferación		
Baja (PCNA < 35%)	18	25,7
Alta (PCNA ≥ 35%)	52	74,3
NPI: Índice Pronóstico de Nottingham		

**Tabla 4.2 Pacientes con carcinomas ductales invasores incluidas en la provincia de Mendoza.**

Detalle de las principales características clínicas y patológicas de las pacientes y sus tumores.

#### - Almacenamiento de las muestras

Todas las muestras de tejidos sólidos fueron fraccionadas en porciones de aproximadamente 100 mg, colocadas en tubos plásticos de 1,5 ml y almacenadas en freezer a -80°C para su procesamiento. El tiempo de almacenamiento fue de al menos 24 horas para garantizar un completo congelado y facilitar la ruptura de membranas celulares y estructuras extracelulares de los tejidos tumorales.

Las muestras de tejido sanguíneo (anticoaguladas con EDTA) fueron almacenadas en freezer a -20°C.

#### - **Relevamiento de historias clínicas**

Luego de que el informe de anatomía patológica de cada paciente fue incluido en la historia clínica del hospital correspondiente, se procedió a la recolección de los datos pertinentes a la investigación (Anexo III). Estos fueron:

- ✓ Edad al momento del diagnóstico.
- ✓ Edad de la menarca/menopausia (si corresponde)
- ✓ Historia reproductiva (nulíparas/paras/número de gestas/lactancia)
- ✓ Uso de terapias hormonales
- ✓ Antecedentes heredo familiares de enfermedades oncológicas
- ✓ Enfermedades mamarias previas
- ✓ Tipo de tumor (ductal/lobulillar/otro) (invasor/in situ)
- ✓ Tamaño de tumor (cm)
- ✓ Ganglios afectados (negativos/positivos/número de ganglios afectados)
- ✓ Metástasis a distancia
- ✓ Grado tumoral (grado de diferenciación/pleomorfismo nuclear/grado mitótico)
- ✓ Perfil de expresión proteico: Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesterona, Her2, PCNA o Ki-67

#### - **Pacientes con cáncer de Estados Unidos**

Se incorporaron muestras de tumores mamarios invasores pertenecientes a 12 pacientes operadas en el Instituto del cáncer John Wayne de la ciudad de Santa Mónica, California. Además se incorporaron 17 tejidos de melanoma, 8 tumores de hígado y 6 tumores de próstata, todos fijados con formol y embebidos en parafina provenientes del banco de tumores del mismo instituto.

Para comparar la información obtenida a partir del ADN proveniente de tejidos congelados con la obtenida del ADN de tejidos embebidos en parafina, se incorporaron 8 muestras pareadas (4 congeladas y 4 embebidas en parafina) pertenecientes a 4 metástasis cerebrales de pacientes con melanoma.

#### **4.2.2. Extracción de ácidos nucleicos**

##### **- Extracción de ADN de tejido sanguíneo**

El primer paso en el procesamiento del tejido sanguíneo consistió en descongelar la sangre completa con el mismo volumen de buffer T<sub>10</sub>E<sub>10</sub>. Luego se centrifugó por 15 minutos a 5000 revoluciones por minuto (rpm) y se descartó el sobrenadante. Las células presentes en el fondo del tubo fueron suspendidas en 3 ml de la solución CTAB 2%. Esta suspensión se agitó y se incubó a 60°C por 45 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron 3 ml de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Esta solución fue agitada durante 10 minutos y luego centrifugada 15 minutos a 5000 rpm. La fase superior (acuosa) fue colectada en un tubo nuevo y el procedimiento se repitió dos veces más, para mejorar la eliminación de proteínas. Finalmente la fase acuosa fue mezclada con 6 ml de etanol 100% frío. El precipitado de ADN fue secado al aire y suspendido en buffer T<sub>10</sub>E pH=8.0 hasta su cuantificación y posterior análisis.

##### **- Extracción de ADN de líneas celulares**

Las líneas celulares HeLa y MCF7 luego de crecidas fueron recuperadas en buffer PBS y centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm. Las células precipitadas se suspendieron en buffer T<sub>10</sub>E<sub>10</sub> y se procesaron con el mismo protocolo que las células sanguíneas.

##### **- Tejido tumoral, ganglionar y normal**

Las muestras de tejidos sólidos fueron sometidas a una ruptura mecánica mediante el uso de un mortero de acero inoxidable congelado a -80°C. El producto de la ruptura fue suspendido en buffer T<sub>10</sub>E<sub>10</sub> y sometido a una nueva ruptura mediante el uso de homogenizador (Ultraturrax). Luego se centrifugó por 15 minutos a 5000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células presentes en el fondo del tubo fueron suspendidas en 3 ml de la solución CTAB 2%. Esta suspensión se agitó durante 30 segundos y se incubó a 60°C durante 120 minutos. Transcurrido ese tiempo se agregaron 3 ml de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Esta solución fue agitada enérgicamente durante 10 minutos y luego centrifugada 15 minutos a 5000 rpm. La fase superior (acuosa) fue

colectada en un tubo nuevo. Finalmente la fase acuosa fue mezclada con 6 ml de etanol 100% frío. La hebra de ADN visible, fue extraída, secada al aire y suspendida en buffer T<sub>10</sub>E pH=8.0 hasta su cuantificación y posterior análisis.

- **Tejidos fijados con formol y embebidos en parafina**

El ADN de tumores embebidos en parafina fue extraído mediante la técnica de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (PCI; 25:24:1 Fisher, BP17521100).

De cada taco de parafina se obtuvieron cortes de 7 µm de espesor que fueron colocados sobre un portaobjetos para su desparafinización.

Procedimiento de desparafinización:

- 1- 5 minutos en xileno fresco
- 2- 5 minutos en xileno fresco
- 3- 30 segundos en etanol 100% fresco
- 4- 30 segundos en etanol 70% fresco
- 5- 30 segundos en agua destilada
- 6- 15 segundos en hematoxilina
- 7- limpiar en agua corriente
- 8- 30 segundos en etanol 70%
- 9- 30 segundos en etanol 100%
- 10-5 minutos en xileno fresco
- 11-Permitir el secado de los solventes dentro de flujo laminar (20-30 minutos)

Los tejidos de interés fueron humectados con una gota del buffer DNA + proteinasa K. Con aguja fina se diseccionaron las porciones de tejido y fueron sumergidas en 25µl de buffer DNA + proteinasa K. Luego se incubaron a 50°C entre 4-24hs (dependiendo del tejido, 24hs permite una mejor desproteización de los tejidos, especialmente útil en tumores de melanoma los cuales expresan grandes cantidades de melanina).

La acción de la proteinasa K fue detenida al incubar los tubos a 95°C durante 20 min. Luego se agregaron 550µl de agua destilada, se mezcló bien y se agregaron 600µl de PCI. Esto se

mezcló vigorosamente y se dejaron los tubos en la gradilla para permitir que las capas comiencen a separarse, luego se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos y se transfirió la solución acuosa (450µl aprox.) a un tubo limpio, al cual se agregaron 45µl de acetato de sodio 3 M (Novagen, 70748), 2µl de PelletPaint (Novagen, 70748) y 1100µl de etanol 100%. Esto se incubó toda la noche a -30°C.

Luego de la precipitación química del ADN los tubos fueron centrifugados a 12000 g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Finalmente se resuspendió en 50µl de buffer TE (pH=8,0).

#### - **Cuantificación de ácidos nucleicos**

Luego de la suspensión de las hebras de ADN en buffer T<sub>10</sub>E pH=8.0 se realizaron diluciones en agua destilada 1/100 para su lectura mediante luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm para cuantificar ADN y 280 nm para identificar proteínas. Con ambas lecturas se estableció la calidad de la extracción mediante la relación ADN/proteínas (absorbancia a 260/ absorbancia a 280). Se utilizaron para los análisis sólo aquellas muestras que presentaron al menos una relación  $\geq 1,5$ .

#### **4.2.3. Análisis del estado de metilación de genes**

El estado de metilación de una región génica puede ser testeado con diversas metodologías. Las principales se dividen en dos grupos, por un lado aquellas basadas en la conversión del ADN con bisulfito de sodio y por otro las basadas en el uso de enzimas de restricción sensibles a la presencia de grupos metilos en el ADN.

Las técnicas que utilizan bisulfito de sodio basan su estrategia en la conversión de las citosinas presentes en el genoma a uracilos mientras que las 5-metil-citosinas no son afectadas por su acción. Luego de la conversión se procede a una amplificación mediante PCR. Estas técnicas requieren una gran cantidad de ADN (entre 0,5 y 10 µg) y un diseño exclusivo para cada región de interés. La ventaja es que una vez convertido, este ADN es amplificado directamente por PCR, lo que lo hace sumamente sensible [174].

Las técnicas basadas en el uso de enzimas de restricción sensibles a metilación basan su estrategia en digerir selectivamente el ADN, generalmente en la secuencia GCGC, por lo que de existir metilación en la primer citosina las enzimas no pueden digerirla, dejando intactos los fragmentos. Las desventajas son que requieren una reacción específica para cada región de interés y que luego algunas de estas técnicas requieren del uso de radioactividad para su detección debido a la ausencia de amplificación por PCR.

- **Amplificación de múltiples sondas dependientes de ligación específica de metilación (MS-MLPA)**

La técnica se basa en la hibridación adyacente de un par de sondas específicas para cada región a analizar (Figura 4.1.). Sólo las sondas hibridadas en forma adyacente son posteriormente ligadas. Por lo tanto si la región de interés no está presente en el genoma analizado, las sondas no son ligadas. Todos los pares de sondas contienen en sus extremos la misma secuencia para un mismo set de primers marcados con fluoróforos 5-FAM o Cy5. La marcación de los primers permite que los fragmentos (amplicones) generados sean visualizados por electroforesis capilar en un secuenciador capilar, generando un espectro llamado electroferograma que contiene la información de los pares de sondas amplificados.

Para determinar el estado de metilación de la región blanco, una enzima de restricción metil-sensible (*CfoI* o *HhaI*, ambas con sitio de reconocimiento y restricción 5'GC-GC3') es incubada con el producto de la ligación hibridado sobre la región en cuestión. Si el sitio CpG no está metilado, el complejo sonda-ADN será digerido por la enzima metil-sensible. De esta manera las secuencias reconocidas por los primers quedan en dos fragmentos separados y la amplificación por PCR no es lograda (esto se traduce en una ausencia del pico correspondiente a esta región en el electroferograma). Si el sitio CpG está metilado, la enzima no corta el híbrido sonda-ADN y el producto correspondiente a esta región será detectado por la presencia de un pico en el electroferograma.

- **Detalles del protocolo de MS-MLPA original**

Paso 1: Desnaturalización e hibridación:

- 1- Diluir entre 50 a 200 ng de ADN en 5µl de buffer TE.
- 2- Calentar a 98°C por 10 minutos y luego enfriar a 25°C.
- 3- Agregar 3µl de la mezcla formada por las sondas (ME001 o ME002) y el buffer MLPA (1:1).
- 4- Calentar los 8µl a 95°C durante 1 minuto e incubar a 60°C durante 16 horas.

Pasos 2 y 3: Ligación y digestión

- 5- Enfriar los tubos a temperatura ambiente y agregar 13µl de la mezcla formada por el buffer ligasa A (3µl) y agua (10µl).
- 6- Mezclar bien y dividir el contenido en dos tubos (aproximadamente 10µl cada uno).
- 7- Incubar cada tubo a 49°C durante 1 minuto como mínimo.
- 8- Agregar 10µl de la mezcla formada por la enzima ligasa (0,25µl), enzima de restricción (0,5µl para tubo restricción +, sino reemplazar con 0,5µl de agua), buffer ligasa B (1,5µl) y agua (7,75µl).
- 9- Incubar a 49°C durante 30 minutos, luego desnaturalizar las enzimas calentando a 98°C durante 5 minutos.

Paso 4: Amplificación por PCR

- 10- Mezclar 5µl del producto de ligación/restricción (obtenido en los pasos 2 y 3) con 2µl de buffer de PCR y 13µl de agua.
- 11- Incubar esta mezcla a 72°C durante 1 minuto como mínimo y agregar 5µl de la mezcla formada por la enzima ADN polimerasa (0,25µl), buffer enzyme dilution (1µl), set de primers (1µl) y agua (2,75µl).
- 12- Incubar por 35 ciclos del siguiente programa de PCR: 95°C durante 30 segundos; 60°C durante 30 segundos; 72°C durante 1 minuto y elongación final a 72°C durante 20 minutos.

Paso 5: Análisis de los fragmentos mediante electroforesis capilar

- 13- Mezclar 1µl del producto de PCR con 0,3µl del marcador de peso molecular 600LIZ y 9µl de formamida.
- 14- Incubar a 94°C por 2 minutos y luego enfriar a 4°C por 5 minutos.

15-Colocar en el analizador ABI-Prism 3130, con las siguientes condiciones de funcionamiento: Utilizar polímero POP-4 o POP-6; voltaje de pre-corrida: 15 kV; tiempo de pre-corrida: 180 segundos; voltaje de inyección: 3 kV; tiempo de inyección: 10-30 segundos; temperatura de corrida: 60°C; voltaje de corrida: 15 kV y tiempo de corrida: 1500 segundos.

#### - **Detalles del protocolo de MS-MLPA modificado**

La diferencia con el protocolo original reside en los pasos 2 y 3, que en lugar de realizarse en sólo un paso, se realiza en dos.

##### Paso 2: Ligación

- 5- Enfriar los tubos a temperatura ambiente y agregar 32µl de la mezcla formada por la enzima ligasa (1µl), buffer ligasa A (3µl), buffer ligasa B (3µl) y agua (25µl).
- 6- Mezclar bien e incubar a 54°C durante 15 minutos.

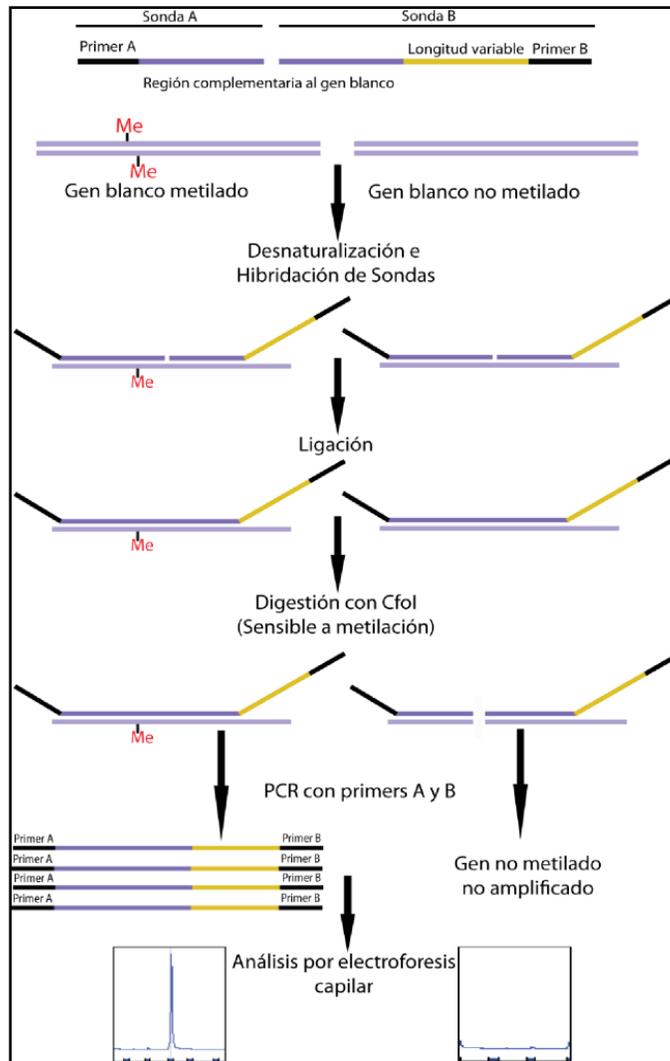
##### Paso 3: Digestión

- 7- Enfriar a 37°C durante 1 minuto como mínimo.
- 8- Agregar 0,5µl de la enzima de restricción.
- 9- Incubar a 37°C durante 30 minutos, luego desnaturalizar las enzimas calentando a 98°C durante 5 minutos.

Los pasos finales son los mismos que para el protocolo original (Figura 4.1).

#### - **MS-MLPA con doble ronda de amplificación (drMS-MLPA)**

Esta adaptación del protocolo de MS-MLPA fue utilizada para incrementar la sensibilidad de la técnica. La diferencia con el protocolo detallado anteriormente es que al finalizar los 35 ciclos de amplificación por PCR se toman 2µl de este producto y se utilizan como templado de una nueva amplificación por PCR de 16 ciclos. En esta segunda ronda de amplificación se colocan todos los reactivos detallados en el protocolo anterior.



**Figura 4.1: Esquema del análisis MS-MLPA modificado.** Se representan los 5 pasos requeridos para el análisis del estado de metilación de una región de interés. Paso 1: Desnaturalización e hibridación del par de sondas en la región de interés. Paso 2: Ligación de las sondas adyacentemente hibridadas. Paso 3: Digestión con enzima sensible a metilación. Paso 4: Amplificación de las sondas no digeridas. Paso 5: Análisis de fragmentos por electroforesis capilar.

#### - Interpretación de los resultados

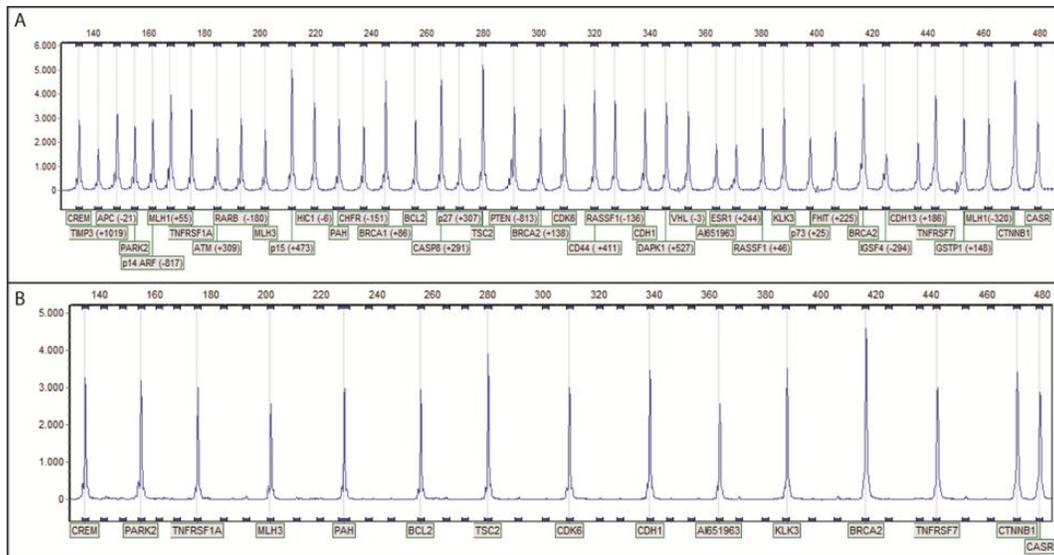
Además de los pares de sondas que detectan el estado de metilación de genes hay un grupo de pares de sondas que sirven de controles de las etapas del proceso. Estos pares de sondas no presentan secuencia de restricción para la enzima utilizada, por lo que no dependen de la metilación de la región para ser amplificadas. La presencia de estos picos en el

electroferograma final demuestra que las etapas de la reacción han sido cumplidas exitosamente (Figura 4.2).

Los potenciales resultados de la aplicación de esta técnica se contextualizan en dos escenarios:

- 1- Al realizar la reacción sin el agregado de las enzimas de restricción el resultado debe mostrar la presencia de todas las regiones donde los pares de sondas han hibridado (41 picos para el grupo de sondas ME001 y 41 picos para el grupo de sondas ME002) (Figura 4.2A). Aquí pueden ocurrir dos situaciones para analizar. Una situación plantea la ausencia completa de picos en los electroferogramas lo que se relaciona con la ausencia de la región de interés en el genoma analizado, por lo que puede sugerirse que la región ha sufrido una delección bialélica. La otra situación involucra diferente altura del pico en cuestión respecto del mismo pico en un ADN control. Si el resultado muestra menor altura sugiere que esta región se encuentra parcialmente delecionada en el ADN analizado. Si el resultado muestra mayor altura sugiere que esta región se encuentra duplicada en el mismo ADN.
- 2- Al realizar la reacción con el agregado de la enzima de restricción el resultado muestra la amplificación de los pares de sondas que no contienen el sitio de restricción para la enzima (15 para el grupo de sondas ME001 y 14 para el grupo de sondas ME002) (Figura 4.2B). La presencia de picos generados a partir de la amplificación de sondas que contienen sitios de restricción se asocia con la metilación de la región en cuestión.

La relación entre la altura del pico en el experimento digerido y la altura del pico obtenido en el experimento no digerido establece la cantidad de alelos metilados de la región analizada.



**Figura 4.2: Electroferogramas generados por el análisis de MS-MLPA de ADN control utilizando el grupo de sondas ME001. A-** Experimento realizado sin la utilización de la enzima de restricción. Se observa la presencia de 41 picos correspondientes a todas las regiones analizadas con estas sondas. **B-** Experimento realizado con la utilización de la enzima de restricción. Se observa la presencia de 15 picos correspondientes a controles que no contienen el sitio de restricción en su secuencia. En este caso las 26 sondas que reconocen sitios potencialmente metilados han sido completamente digeridas indicando la no metilación de las 26 regiones.

#### - Ubicación de las regiones analizadas con MS-MLPA

Mediante la utilización de las sondas ME001 y ME002 se analizó el estado de metilación de un total de 49 regiones genéticas. Estas regiones están ubicadas en 13 cromosomas a lo largo del genoma. Estas 49 islas regulan la expresión de 34 genes con función reguladora en el ciclo celular (Tabla 4.3).

#### - Reacción de la ADN polimerasa en cadena específica de metilación (MSP)

La técnica MSP se compone de dos etapas. En el primer paso el ADN es sometido a un tratamiento con bisulfito de sodio, el cual induce la conversión de citosinas a uracilos sin afectar las 5-metil citosinas. El segundo paso involucra la amplificación con primers específicos para el estado no metilado (dirigidos a uracilos en el lugar de las citosinas) y primers específicos para el estado metilado (dirigidos a citosinas).

N°	Símbolo del Gen	Nombre del Gen	Ubicación*	Región
1	APC	Adenomatous polyposis coli	5q21	-21pb
2	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	11q22	+309pb
3	ATM	Ataxia telangiectasia mutated	11q22	+138pb
4	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	17q21	-20pb
5	BRCA1	Breast cancer 1, early onset	17q21	+86pb
6	BRCA2	Breast cancer 2, early onset	13q12	+221pb
7	BRCA2	Breast cancer 2, early onset	13q12	+138pb
8	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	2q33	+291pb
9	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	11p13	+411pb
10	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	11p13	+28pb
11	CDH13	Cadherin 13, H-cadherin (heart)	16q23	+186pb
12	CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains	12q24	-103pb
13	CHFR	Checkpoint with forkhead and ring finger domains	12q24	-96pb
14	DAPK1	Death-associated protein kinase 1	9q34	+527pb
15	ESR1	Estrogen receptor 1	6q24	+244pb
16	FHIT	Fragile histidine triad gene	3p14.2	+225pb
17	GATA5	GATA binding protein 5	20q13	+271pb
18	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	11q13	+148pb
19	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	11q13	+488pb
20	HIC1	Hypermethylated in cancer 1	17p13	-6pb
21	IGSF4**	Cell adhesion molecule 1	11q23	-56pb
22	IGSF4**	Cell adhesion molecule 1	11q23	-294pb
23	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	10q26	-463pb
24	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	3p22.3	+55pb
25	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	3p22.3	-320pb
26	p15	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	9p21	+473pb
27	p14	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	9p21	-817pb
28	p14	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	9p21	+200pb
29	p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	12p13	+307pb
30	p53	Tumor protein p53	17p13	+100pb
31	p73	Tumor protein p73	1p36.3	+258pb
32	p73	Tumor protein p73	1p36.3	+25pb
33	PAX5	Paired box 5	9p13.2	-120pb
34	PAX6	Paired box 6	11p13	-52pb
35	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	10q23	-813pb
36	PTEN	Phosphatase and tensin homolog	10q23	-66pb
37	PYCARD	PYD and CARD domain containing	16p11	+437pb
38	RARB	Retinoic acid receptor, beta	3p24	-357pb
39	RARB	Retinoic acid receptor, beta	3p24	-180pb
40	RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	3p21.3	-136pb
41	RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	3p21.3	+46pb
42	RB1	Retinoblastoma 1	13q14	-226pb
43	RB1	Retinoblastoma 1	13q14	-449pb
44	STK11	Serine/threonine kinase 11	19p13	+416pb
45	THBS1	Thrombospondin 1	15q15	-791pb
46	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	22q12	+1019pb
47	VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor	3p25	+115pb
48	VHL	von Hippel-Lindau tumor suppressor	3p25	-3pb
49	WT1	Wilms tumor 1	11p13	-210pb

**Tabla 4.3: Detalle de las regiones genéticas analizadas por MS-MLPA.** \*Localización relativa al sitio del inicio de la transcripción, \*\*Nuevo símbolo: CADM1. Símbolos y nombres del comité para las nomenclaturas y nombres de los genes HUGO (<http://www.genenames.org/>).

- **Tratamiento del ADN genómico con bisulfito de sodio**

A 10 microgramos de ADN (volumen final de 50µl) se agregaron 3,6µl de NaOH 3M y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Luego, se agregaron 30µl de Hidroquinona 10 mM y se incubó nuevamente 10 minutos a 37°C; a continuación se agregaron 220µl de BSS 5M y se incubó durante 16 horas a 50°C. Pasado ese período se removieron las sales incorporadas utilizando el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham), según instrucciones del fabricante. A 100µl de ADN se adicionaron 11µl de NaOH 3M y se incubó durante 20 minutos a 37°C. Luego, a estos 111µl de muestra se agregaron 15µl de Acetato de Sodio 3M, 2µl de plásmido pREAL y 500µl de etanol 100%; se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, aproximadamente 40 minutos. Una vez seco el pellet se suspendió en 100µl de Buffer TE.

- **Amplificación mediante PCR anidada**

La estrategia diseñada se basa en Nested PCR (PCR Anidada), en la cual se realiza una amplificación de la región de interés con un par de primers externos (MSP-F y MSP-R) y luego, una amplificación interna con dos pares de primers diferentes: un par que amplifica la isla CpG metilada (Met-F y Met-R) y otro par que amplifica la misma isla cuando no está metilada (Un-F y Un-R) [184]. Las secuencias de los 6 primers se detallan en la tabla 4.4.

Secuencia de los primers externos para amplificar el gen RASSF1 convertido con bisulfito de sodio	MSP1: 5'-GGGTTTTATAGTTTTTGTATTTAGGTT-3' MSP2: 5'-AACTCAATAAACTCAAACCTCCCC-3'
Secuencia de los primers internos para detectar metilación del gen RASSF1	Met1: 5'-CGGTTTTTTTTTAGTTTTTTTTTCGTCG-3' Met2: 5'-TAACTTTAAACGCTAACAAACGCGAA-3'
Secuencia de los primers internos para detectar la no metilación del gen RASSF1	UN1: 5'-TGTGTGGTTTTTTTTTAGTTTTTTTTTGTG-3' UN2: 5'-CCCAACATAACCCAATTAACCCA-3'

**Tabla 4.4: Secuencias de los primers utilizados en la estrategia MSP-Nested empleada para el análisis de la metilación aberrante del gen RASSF1.**

En ambos casos el programa de PCR para los primers externos consta de un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 54°C y 1 minuto a 72°C, finalizando con un paso de extensión a 72°C durante 3 minutos. A partir de 2µl de producto de esta primera PCR, se realiza la PCR Nested. Este segundo programa consiste en 25 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 51°C y 1 minuto

a 72°C con un paso final de 3 minutos a 72°C. Los productos de PCR obtenidos se observan en un gel de agarosa al 1,5%, teñido con SYBR green.

#### - **Secuenciación de ADN dependiente de bisulfito de sodio**

Luego de amplificar las regiones convertidas, los productos de la amplificación fueron resueltos en un gel de agarosa al 1,5%. Las bandas separadas, fueron cortadas del gel y purificadas utilizando el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham), según instrucciones del fabricante. Luego fueron elongadas mediante el uso de sólo los primer reverse y dideoxiterminadores de cadenas marcados con 4 fluoróforos distintos de acuerdo a la base nitrogenada que representan. Finalmente, fueron resueltas por electroforesis capilar.

#### - **Síntesis del control universal no metilado**

Este control es generado mediante la amplificación por PCR, la cual no conserva la presencia de metilación en los productos obtenidos. Para una mayor eficiencia en la remoción de la metilación de los genomas tratados se realizaron dos rondas de amplificaciones consecutivas.

Procedimiento:

1. En un tubo de microcentrífuga de 600µl, agregar 1 µl de ADN (1ng/µl de ADN) templado, luego 9 µl del buffer de muestra [GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences)].
2. Desnaturalizar la muestra a 95°C durante 3 minutos.
3. Enfriar en hielo durante 3 minutos. Luego, centrifugar brevemente.
4. Preparar la solución de reacción de amplificación (SRA) mezclando 9 µl de Buffer de Reacción con 1 µl de enzima Φ29 ADN polimerasa (en hielo).
5. Agregar los 10 µl de SRA a la muestra enfriada. Centrifugar brevemente.
6. Incubar a 30°C durante 18 horas (primera amplificación).
7. Calentar la muestra a 65°C durante 10 minutos (desactivar enzima).
8. Enfriar en hielo durante 3 minutos.

9. En un nuevo tubo de 600µl agregar 0,9 µl de H2O y 0,1 µl del producto.
10. Agregar 9 µl del buffer de muestra al nuevo tubo.
11. Repetir los pasos 2-8 (segunda amplificación).

- **Síntesis del control universal no metilado**

Este control es generado mediante la enzima Sssl, la cual transfiere grupos metilos desde el donante S-Adenosil metionina (SAM) al sustrato ADN.

Procedimiento:

1. Diluir 20 veces S-adenosil metionina (32mM) en agua.
2. Obtener 1 µg de ADN de linfocitos de donante sano.
3. Preparar la siguiente mezcla en un tubo de microcentrífuga:

Reactivo	Volumen (µl)
ADN (1µg) + H2O	15
10X Buffer	2
Enzima Sssl	1
SAM diluida	2
Total	20

4. Incubar 4 horas a 37°C.
5. Detener la reacción calentando a 65°C durante 20 minutos.
6. Almacenar a 4°C durante la noche.

**4.2.4. Análisis estadísticos y procesamientos bioinformáticos de los datos**

El análisis estadístico para evaluar las correlaciones y asociaciones entre las firmas epigenéticas de los tumores y sus rasgos clínicos distintivos se realizó mediante el programa SPSS v17 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). En este mismo programa se crearon todas las bases de datos de las pacientes incluyendo la información recolectada de cada historia clínica (como se explica en este mismo capítulo en 4.1.4) y los resultados de los análisis de metilación de las 49 regiones testeadas con MS-MLPA.

- **Análisis de variables no paramétricas**

**Nominales:** La asociación de las variables cualitativas nominales se estableció mediante chi-cuadrado. Todos los análisis fueron confirmados mediante el cálculo de riesgo Odd Ratio (OR) para establecer un intervalo de confianza del 95%, y de este modo considerar el número de casos analizados. La fuerza de la asociación se estableció mediante el cálculo de los coeficientes de *Phi*, para variables dicotómicas (como metilado/no metilado) y *V* de Cramer, para el caso de variables politómicas (como los subtipos tumorales).

**Ordinales:** Los análisis de relación de variables ordinales (como grado tumoral o niveles de expresión de receptores) se analizaron mediante Chi-cuadrado y la fuerza se estableció por el coeficiente *V* de Cramer. Estos análisis fueron validados por el cálculo de la U de Mann-Withney.

- **Análisis de la distribución de los datos en las variables escalares**

Para determinar la normalidad en la distribución de los datos presentes en las variables escalares se utilizó la prueba de la normalidad de Kolmogorov-Smirnof. En esta prueba se plantea la siguiente hipótesis nula: La distribución de los valores es normal. Por lo tanto las variables tienen una distribución normal cuando el valor de p es mayor a 0,05.

Variable	Kolmogorov-Smirnof		Conclusión
	Valor	Significancia (p)	
Edad	0,138	0,002	No normal
NRM	0,103	0,062	Normal
NGM	0,114	0,025	No normal
NPI	0,101	0,072	Normal
Tamaño (cm)	0,164	<0,001	No Normal

**Tabla 4.5: Análisis de la normalidad en la distribución de los datos de las variables escalares.** NMR: Número de regiones metiladas, NGM: Número de genes metilados, NPI: Índice Pronóstico de Nottingham

- **Análisis de variables escalares no paramétricas**

Se realizaron análisis de correlación de Spearman para analizar la relación entre las variables escalares que no cumplen con la prueba de normalidad. En cada caso se calculó el coeficiente *Rho* de Spearman como medida de la correlación entre las variables.

### - **Análisis de variables escalares paramétricas**

Se realizaron análisis de correlación de Pearson para analizar la relación entre las dos variables que cumplen con la prueba de normalidad, NPI y NRM. Para estas se calculó el coeficiente R de Pearson. Se calculó la regresión lineal ( $R^2$ ) entre estas variables para estimar el impacto en el NPI del aumento en la metilación.

### - **Medida de la concordancia entre dos métodos de medición**

El grado de concordancia en la detección de metástasis en ganglios linfáticos mediante anatomopatología y MS-MLPA se estimó con el índice de *Kappa* de Cohen (dos observadores o métodos). Este índice permite medir el grado entre varios métodos o evaluadores que clasifican una muestra según una serie de posibilidades (categorías) que son mutuamente excluyentes. Es utilizado cuando la variable cualitativa es dicotómica. Los valores que adquiere *kappa* representan el grado de acuerdo: sin acuerdo cuando *Kappa* es 0; acuerdo insignificante entre 0 y 0,2; acuerdo bajo entre 0,2 y 0,4; acuerdo moderado entre 0,4 y 0,6; acuerdo bueno entre 0,6 y 0,8; muy buen acuerdo entre 0,8 a <1 y concordancia perfecta = 1.

### - **Medida de la significancia**

Todos los análisis se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de la significancia asintótica bilateral (p) fue menor a 0,05.

### - **Análisis de clúster jerárquico**

Todas las técnicas estadísticas de generación de clústeres jerárquicos tienen como principal objetivo identificar agrupaciones (o clústeres) de elementos en consideración (genes o muestras) los cuales presentan un comportamiento homogéneo o relacionado a lo largo de medidas relevantes de un proceso biológico determinado (variable medida). Por ejemplo, un clúster queda formado por los genes que varían de manera asociada frente a un cambio del proceso biológico estudiado [185, 186]. El análisis de clústeres jerárquicos comienza con cada elemento (gen o muestra) en un clúster independiente. Luego de sucesivas iteraciones, cada elemento es ubicado junto al elemento más cercano. La

distancia entre ambos elementos se mide por el grado de similitud de la variable considerada. En el caso de esta tesis, la similitud está dada por la metilación o no de las 49 regiones consideradas en el perfil. Estas sucesivas iteraciones devienen en la generación de un clúster único que incluye todos los elementos. El clúster que incluye todos los elementos presenta a su vez subclústeres dentro de los que se organizan otros subclústeres. Mientras menor es la jerarquía del clúster mayor similitud (menor distancia) existe entre los elementos que lo componen. Esta jerarquía es visualmente representada por un árbol que representa en cada nodo la distancia estadística que existe entre cada subclúster [187]. La distribución jerárquica de las muestras/genes es confirmada mediante los métodos Bootstrap y Jackknife utilizando 100 iteraciones para cada caso. Solo los clústeres que cuentan con un soporte mayor al 70% son considerados.

- **Distancia métrica estadística utilizada para la evaluación de similitud entre los perfiles de metilación**

Los valores utilizados para describir el estado de metilación de una región son positivos, 0 para no metilado y 1 para metilado. El método elegido para calcular la diferencia entre los perfiles de metilación es la distancia estadística de Manhattan. Este es un método que se ajusta al problema del exceso de ceros en los datos [188]. El cálculo de la misma involucra la suma del valor absoluto entre dos puntos. La formula de esta distancia es:

$$d_{ij} = \sum_{k=1}^n |x_{ik} - x_{jk}|$$

- **Método de discriminación entre elementos con alta variación en la muestra: Gene/Sample Shaving**

Una alternativa a la generación de clústeres jerárquicos es el método de “gene/sample shaving” el cual está diseñado para extraer pequeños clústeres de elementos que varían altamente a lo largo de la muestra. Mientras el método de generación de clústeres jerárquicos produce grandes grupos de elementos, el método de gene shaving produce agrupaciones generalmente pequeñas y más útiles desde un punto de vista biológico [189].

Este algoritmo junto con el método del mapa auto-organizado fue utilizado para obtener un grupo de tumores mamarios con perfiles homogéneos que representan la frecuencia de metilación de las regiones analizadas.

- **Método de extracción de datos de exploración y modelado predictivo: Mapas auto-organizados (SOM: Self Organizing Maps) o Red de Kohonen.**

SOM es un algoritmo utilizado para interpretar grupos de datos de grandes dimensiones. Este método genera clústeres los cuales son constantemente comparados con un vector de organización de los elementos. Este vector es generado de manera no supervisada y es introducido en cada clúster para calcular el valor de similitud. El clúster que más se ajusta a la información del vector es el seleccionado [190].

En el análisis del perfil de metilación representativo de los carcinomas mamarios invasores se generó un vector SOM con los siguientes parámetros:

- Distancia métrica: Manhattan
- Dimensión en X: 2
- Dimensión en Y: 2
- Iteraciones: 2000
- Alfa: 0,05
- Radio: 3,0
- Inicialización: Vector al azar
- Vecindario: Gaussiano
- Topología: rectangular

- **Representación de las similitudes en Mapas de terreno**

Los mapas de terreno proporcionan una visión tridimensional de los principales clústeres. Estos pueden representar las distancias existentes entre elementos (genes o muestras). Cualquiera sea el elemento cargado en la configuración inicial, el primer paso es la generación de una grilla de 2 dimensiones (ejes X e Y). Luego la altura en la tercera dimensión (eje Z) está influenciada por la cantidad de elementos ubicados en un sector del plano de dos dimensiones. Los picos más altos adquieren el color rojo y sus vecinos más relacionados (mayor similitud) son representados por uniones entre ambos picos que no permiten que la representación tridimensional alcance el plano inferior.

La ubicación de cada elemento (en X e Y) queda determinada por la similitud del mismo con respecto al contexto. Esta similitud puede ser determinada considerando dos contextos. Por un lado el método con 1 vecino, donde se considera la distancia entre dos elementos. Por otro lado el método con 2 vecinos, donde se considera la distancia entre dos elementos pero este resultado es influenciado por un tercer elemento que mediante continuas iteraciones van influenciando la distancia entre los dos elementos analizados.

#### - **Programas para el procesamiento bioinformático**

Los resultados de MS-MLPA fueron analizados mediante el programa GeneMarker v1.75 (Softgenetics, State College, PA, USA). Este software permite descartar amplificaciones inespecíficas y establecer con una certeza del 95% el estado de metilación de cada región [184]. Para considerar que un pico representa un evento de metilación en la región estudiada, se utilizó un umbral de 8% de la relación de la altura del pico con el entorno.

Los resultados de la secuenciación dependiente de bisulfito de sodio fueron analizados con el programa GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Los análisis de clústeres jerárquicos, generación del vector SOM, cálculos y representación de las matrices de distancias entre los perfiles de metilación, análisis de gene/simple shaving, algoritmos Bootstrap y Jackknife y representación de mapas terráneos fueron realizados con el programa Multi-Experiment Viewer v4.6 (TM4 group, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard University, Boston, USA) [191].

La exploración in silico de los genes para identificar las 49 islas analizadas fue realizada con el programa CLC Sequence Viewer v6.5.2 (CLC Bio, Katrinebjerg, Aarhus, Denmark).

#### **4.2.5. Reactivos y soluciones**

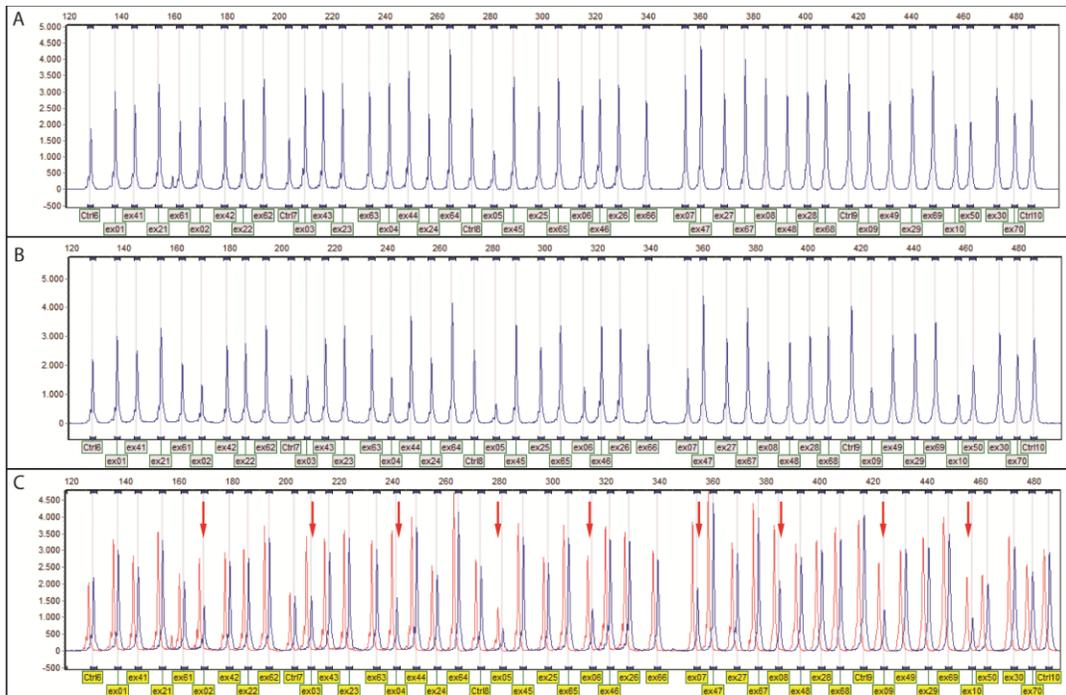
- Solución CTAB 2%
  - NaCl 1,4 M: 81,6 g/l
  - EDTA 20 mM: 7,4 g/l
  - Tris 100 mM: 12,1 g/l
  - 2-Mercapto Etanol 0,2%
  - CTAB 95%: 21 g/l

- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
  - Cloroformo: 480 ml/l
  - Alcohol Isoamílico: 20 ml/l
  - Agua destilada 500 ml/l
- Buffer DNA + Proteinasa K
  - Tris 50 mM
  - EDTA 1 mM
  - Tween-20 2,5%
  - Proteinasa K 20mg/ml: 40µl cada 1ml de solución
- Buffer T<sub>10</sub>E pH:8
  - Tris 10 mM
  - EDTA 1mM
  - Llevar a pH 8 con HCl
- Buffer T<sub>10</sub>E<sub>10</sub> pH:8
  - Tris 10 mM
  - EDTA 10 mM
  - Llevar a pH 8 con HCl
- PBS 10X:
  - NaCl 1,37 mM (80g/l)
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 78,1 mM (11,1g/l)
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14,7 mM (2g/l)
  - KCl 26,8 mM (2g/l)
  - Llevar a pH 7,4
- Bisulfito de Sodio 5M:
  - NaHSO<sub>3</sub> (99%): 530 g/l
  - Cada 10 ml agregar 526,3µl de NaOH 10 M para llevar a pH 5
- Hidroquinona 200 mM:
  - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>: 22 g/l
  - Almacenar en esta concentración y diluir a 10 mM para utilizar.

# **CAPÍTULO QUINTO – PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## 5.1. Alteraciones epigenéticas en la carcinogénesis mamaria

El primer paso de este trabajo de tesis doctoral fue encontrar herramientas para el análisis de metilación que permitieran el estudio de un gran número de regiones en pocas reacciones. Durante una investigación previa, nuestro trabajo se centró en la detección de portadoras de la enfermedad Distrofia Muscular de Duchenne. Esta enfermedad se produce por alteraciones en el gen de la distrofina que incluyen grandes deleciones que pueden afectar a más de un exón del gen. Existe una relación entre los exones afectados y el fenotipo de la enfermedad. Por lo tanto es importante analizar el comienzo y el final de la deleción, para ello es necesario testear más de una región dentro de este gen. La metodología que nos permitió el análisis simultáneo de todos los exones se denomina amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación (MLPA) (Figura 5.1). Esta técnica permitió analizar y correlacionar genotipos con fenotipos de esta enfermedad [192, 193].



**Figura 5.1: Electroferogramas del análisis por MLPA de deleciones en el gen DMD.** Los picos observados son el producto de la amplificación de 45 sondas hibridadas en el genoma, 5 reconocen regiones controles y 40 reconocen diferentes exones del gen DMD. **A-** ADN control **B-** ADN de mujer portadora de deleción entre el exón 2 y 10 del gen DMD. **C-** Superposición de los electroferogramas control (rojo) y portadora (azul). Las deleciones en el electroferograma de la portadora se observan como una reducción a la mitad de la altura del pico control.

### **5.1.1. Estandarización del análisis de perfiles de metilación aberrante.**

Existen distintos tipos de modificaciones a la técnica MLPA, uno de ellos es una adaptación para identificar regiones metiladas. Esta técnica se denomina MLPA específica de metilación cuyas siglas son MS-MLPA (del inglés methyl-specific MLPA). La diferencia fundamental respecto del MLPA convencional es que un porcentaje de las sondas hibridan sobre regiones que pueden presentar metilación. Durante el proceso de ligación se coloca *CfoI*, una enzima de restricción sensible a la presencia de metilación. Esta enzima solo digiere las sondas que presentan sitio de restricción constituidos por la secuencia 5'-GCGC-3' y que se encuentran no metiladas. El resultado de esta restricción selectiva es que las regiones no metiladas son cortadas mientras que las regiones metiladas no. Estas últimas son amplificadas por PCR y sus productos detectados por electroforesis capilar. La intensidad de la detección se relaciona directamente con el número de esas regiones metiladas presentes en el ADN bajo estudio (Figura 4.1).

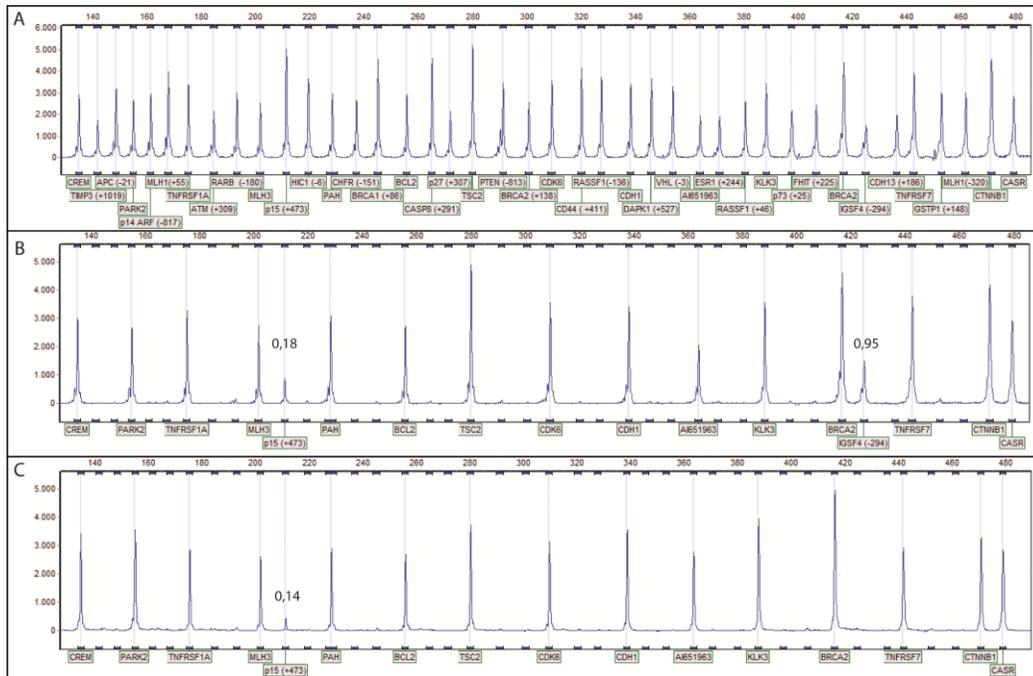
#### **- Análisis de metilación aberrante de líneas celulares**

Existen numerosas evidencias que muestran que las líneas celulares presentan metilación aberrante en varios genes [194].

La aplicación de MS-MLPA al ADN extraído de la línea celular HeLa muestra la metilación aberrante de dos regiones. Una de estas regiones está presente en el gen IGSF4 y la otra en el gen p15 (Figura 5.2B).

Debido al estado monoclonal de las células que crecen en cultivo, es posible establecer si la metilación aberrante ha afectado a uno o ambos alelos del gen. Para determinar el número de alelos metilados se debe aplicar la ecuación que relaciona el número de alelos metilados con el número de alelos totales. Esto resulta de la relación entre el área del pico metilado /el área del pico total [195]. Este análisis revela una relación de 0,95 para el gen IGSF4, lo que demuestra que ambos alelos de IGSF4 se encuentran metilados y una relación de 0,18 para el gen p15, lo que no puede ser considerado metilación monoalélica, lo cual hizo sospechar la potencial existencia de artefactos técnicos. Por otro lado el análisis de la metilación de

sangre de individuos sanos (n=5) revela la señal de metilación en el gen p15 (Figura 5.2C). Estos datos mostraron que esta señal puede deberse a un artefacto de la técnica MS-MLPA.

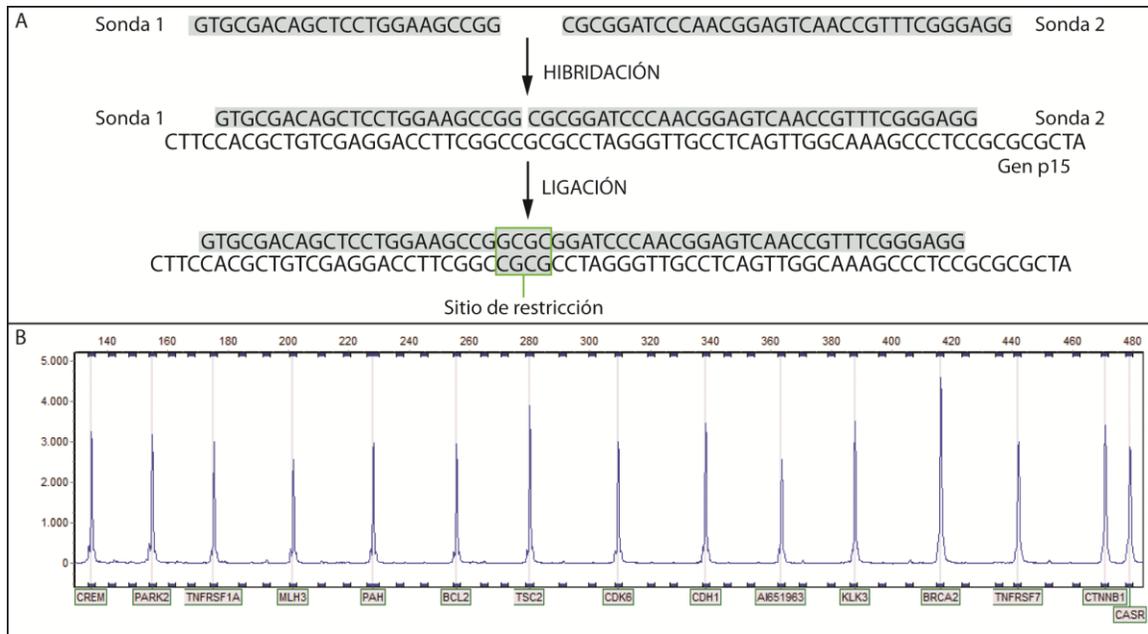


**Figura 5.2: Análisis del perfil de metilación mediante MS-MLPA. A-** Análisis del ADN de la línea celular HeLa sin utilizar la enzima de restricción. Se observa la amplificación de todas las sondas (41) hibridadas en el genoma. **B-** Análisis del ADN de la línea celular HeLa con la enzima de restricción (*CfoI*). Se observa la amplificación de 15 controles que no poseen sitio de restricción y dos señales de las sondas que testean metilación, una en p15 y la otra en IGSF4. La relación entre el área de los picos digeridos y no digeridos (B/A), muestra que el 18% de p15 y el 95% de IGSF4 no son digeridos. **C-** Análisis del ADN de control sano. Se observa una señal en p15 la cual representa el 14% de los alelos.

### 5.1.1.1. Eliminación de artefactos en el análisis del perfil de metilación.

Las sondas que reconocen la región del gen p15 presentan un sitio de restricción que solo es formado luego de que la ligación de ambas se ha completado (Figura 5.3A). El protocolo original de MS-MLPA indica que el proceso de ligación y digestión se realizan en una misma reacción a 49°C durante 30 minutos. La temperatura óptima de funcionamiento de la enzima ligasa es de 54°C, razón para pensar que a 49°C su rendimiento puede verse disminuido y con ello requerir más tiempo en completar la ligación de todas las sondas adyacentes. Por otro lado, la temperatura óptima de la enzima de restricción (*CfoI* o *HhaI*) es de 37°C, por lo que a 49°C su vida media es sensiblemente menor y con ello puede perder su

actividad antes de que los sitios de restricción se hayan formado correctamente. El paso de ligación-digestión se desdobló en dos pasos consecutivos, el primero a 54°C por 15 minutos solo con la enzima ligasa y el segundo a 37°C por 30 minutos agregando la enzima de restricción. Este protocolo modificado elimina el artefacto producido por la técnica convencional en el análisis del gen p15 (Figura 5.3B). Este nuevo protocolo para MS-MLPA fue publicado en el año 2010 [184].

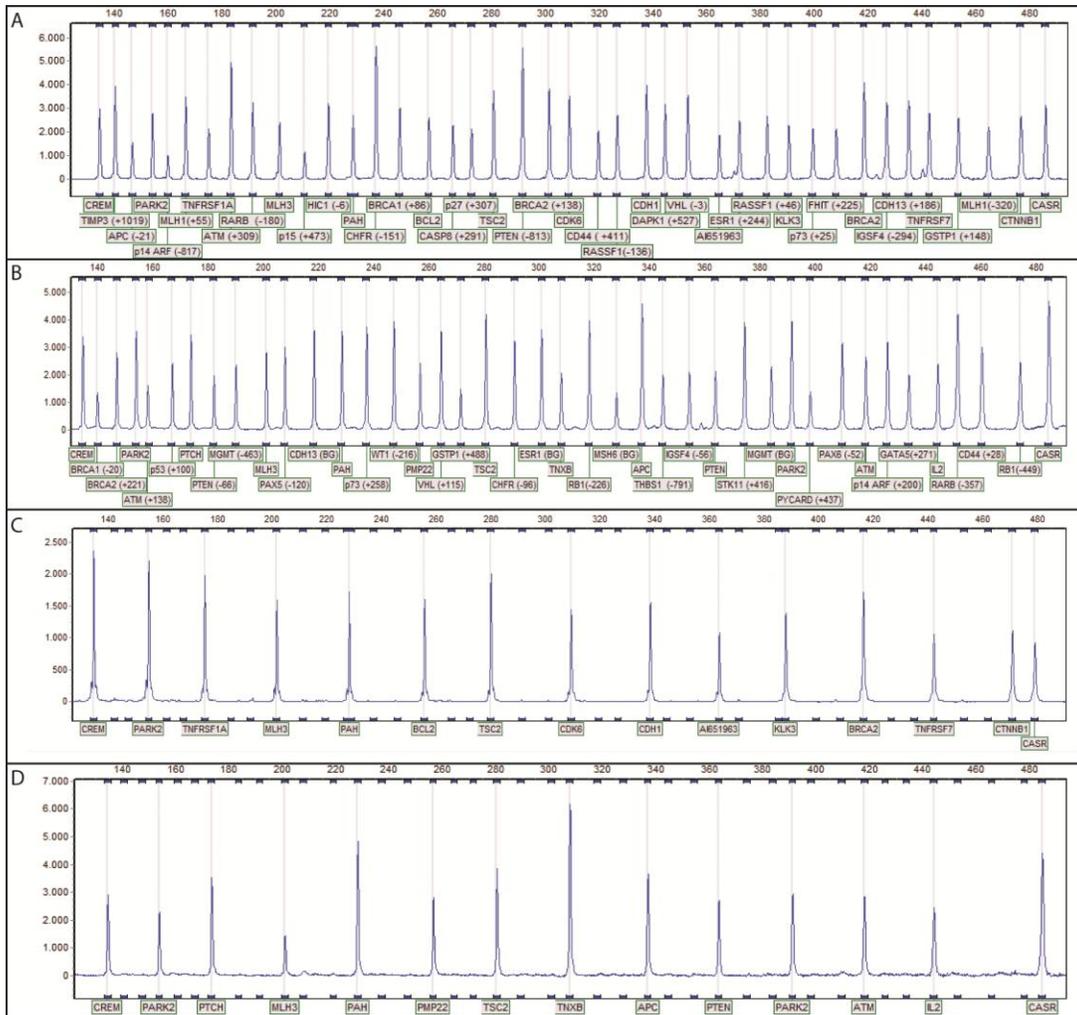


**Figura 5.3: Eliminación de artefactos en el análisis del perfil de metilación. A-** Esquema que representa la etapa de ligación de las sondas que testean el estado de metilación de p15. Nótese que el sitio de restricción solo es formado luego de completarse la ligación. **B-** Aplicación del protocolo modificado al análisis del perfil de metilación de ADN control sano.

- **Verificación de la estandarización del nuevo protocolo de MS-MLPA.**

Las modificaciones introducidas en el protocolo de MS-MLPA son sometidas al análisis de dos controles que representan situaciones del perfil de metilación extremas. Uno de estos controles es denominado “control universal no metilado” que consiste en el producto de dos amplificaciones por PCR consecutivas, a los efectos de eliminar la presencia de metilación. El otro control denominado “control universal metilado” es obtenido a partir de ADN genómico tratado con la enzima Sss1 metil-transferasa que metila todas las regiones

posibles. La estandarización del análisis del perfil de metilación por MS-MLPA demuestra ser consistente con los controles utilizados (Figura 5.4).



**Figura 5.4. Verificación de la eficiencia del protocolo de MS-MLPA modificado.** **A-** Análisis del perfil de metilación del ADN control universal metilado utilizando las sondas ME001. **B-** Análisis del perfil de metilación del ADN control universal metilado utilizando las sondas ME002. Obsérvese que en **A** y **B** todas las sondas han sido hibridadas, ligadas y amplificadas, ninguna de ellas ha sido digerida por la enzima de restricción sensible a metilación (*Cfo*I). **C-** Análisis del perfil de metilación del ADN control universal no metilado utilizando las sondas ME001. **D-** Análisis del perfil de metilación del ADN control universal no metilado utilizando las sondas ME002. Tanto en **C** como en **D** solo las sondas controles han sido amplificadas ya que las sondas que testean metilación han sido completamente digeridas por la enzima de restricción (*Cfo*I).

Estos resultados muestran que las modificaciones introducidas al protocolo de MS-MLPA original permiten determinar el estado de metilación de 49 ICpGs en sólo dos reacciones

(Tabla 4.3). Esta capacidad de la técnica MS-MLPA representa una gran ventaja en el análisis de perfiles de metilación respecto de las técnicas de análisis de metilación más utilizadas, basadas en la conversión con bisulfito de sodio, como MSP [174]. Estas permiten el análisis de una sola región por reacción lo cual lleva a que la mayoría de los trabajos realizados con MSP se limitan al estudio de un grupo reducido de regiones. Esto dificulta el análisis de perfiles de metilación que incluyen numerosas regiones.

### **5.1.2. Análisis del perfil de metilación de tejidos**

#### **5.1.2.1. Tejidos mamarios normales, células sanguíneas y ganglios linfáticos sin infiltración neoplásica.**

Para detectar la potencial influencia del tejido mamario normal en el análisis del perfil de metilación de tejidos tumorales se analizaron 6 tejidos mamarios normales, 9 muestras de sangre de donantes sanos y 3 ganglios linfáticos sin macro o micro metástasis detectadas. MS-MLPA muestra que en tejidos mamarios sanos, células sanguíneas y ganglios linfáticos no infiltrados con células neoplásicas, ninguna de las 49 regiones analizadas se encuentra metilada. Esto confirma que durante el análisis de tejido tumoral, las contaminaciones debidas a la presencia de tejido mamario normal o infiltraciones de células sanguíneas, no interfieren en la obtención de la información de las alteraciones en el perfil de metilación.

#### **5.1.2.2. Enfermedades mamarias benignas**

Debido a que las enfermedades benignas de la glándula mamaria presentan una alta tasa de crecimiento celular, se plantea que los genes reguladores del ciclo celular pueden presentar alteraciones en la metilación de sus promotores. El análisis del perfil de metilación de 5 fibroadenomas -considerada una enfermedad mamaria benigna- muestra que los genes estudiados no se encuentran metilados. Este resultado sugiere que el proceso de metilación aberrante de los genes incluidos en el estudio no tiene relación con estos procesos patológicos considerados benignos.

En el año 2005 el trabajo de Di Vinci y colaboradores mostró que el gen regulador del ciclo celular CDKN2A se encuentra metilado en fibroadenomas [196]. La región analizada por estos investigadores no es la misma que las analizadas en esta tesis doctoral. En el gen

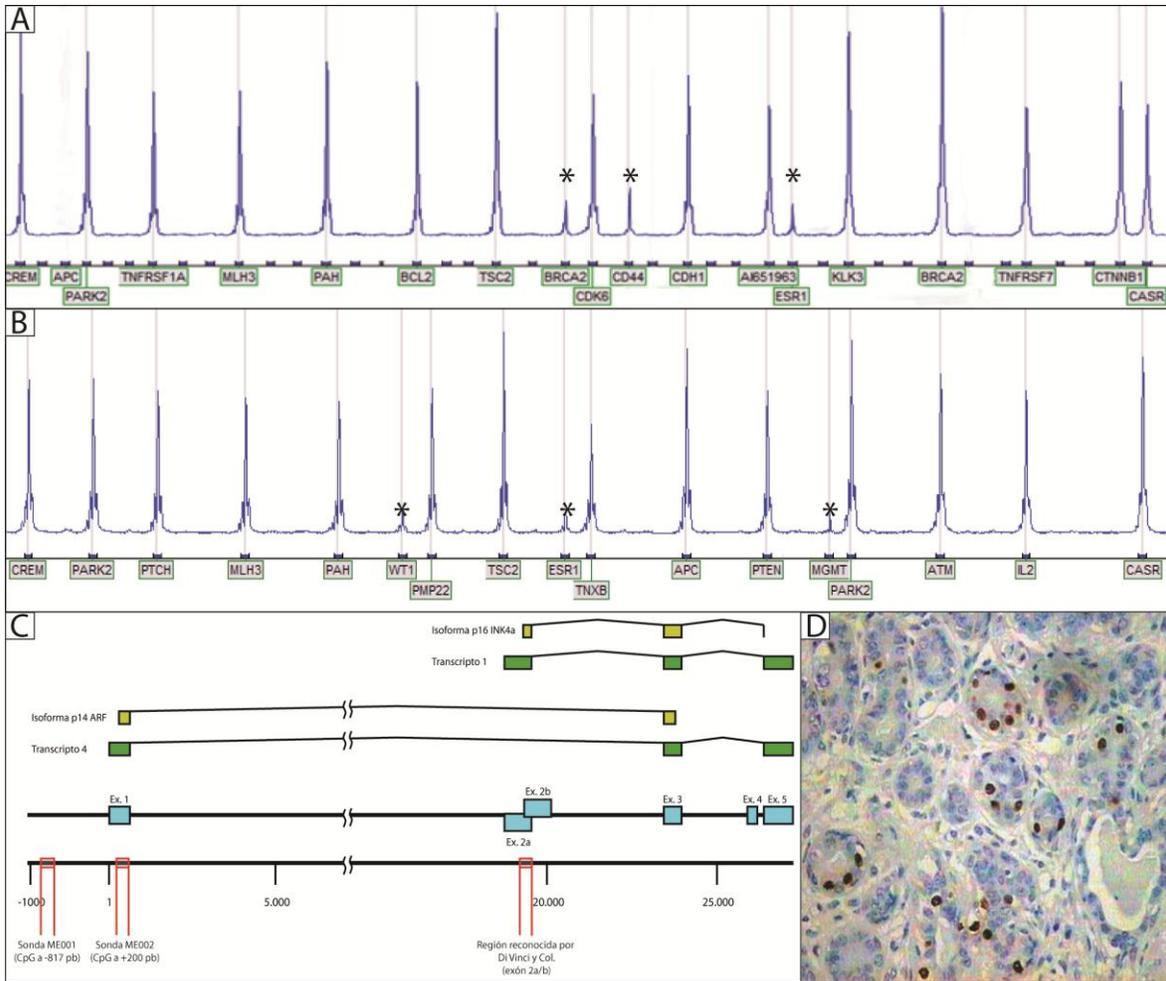
CDKN2A se generan al menos 5 variantes transcripcionales que difieren en sus primeros exones y en la ubicación de los promotores que las regulan. Dos de las proteínas (p14 y p16) codificadas bajo esta situación tienen función como inhibidoras de la quinasa promotora del ciclo celular CDK4. La diferencia entre ambas incluye un exón llamado 1 ubicado a 20 kb corriente arriba (p14). En el trabajo de Di Vinci y colaboradores, se ha analizado el estado de metilación de las ICpG situadas en el promotor de la isoforma p16 correspondiente al exón 2a/b del gen CDKN2A. En la presente tesis doctoral se analiza el estado de metilación del promotor y el primer exón del gen CDKN2A, ambas regiones regulan la expresión de la isoforma p14ARF (Figura 5.5C).

#### - **Análisis del perfil de metilación de un fibroadenoma gigante**

Un caso particular fue el estudio de un fibroadenoma gigante, el cual se manifestó clínicamente con un tamaño de 10 x 10 centímetros y con peso de 400 gramos en una paciente de 13 años.

El análisis del perfil de metilación de las células que constituyen el fibroadenoma gigante, muestra llamativamente alteraciones en la metilación de 6 regiones (Figura 5.5A y B). Estas regiones se encuentran en 5 genes: ESR1, WT1, MGMT, BRCA2 y CD44. Estos genes participan en diversas vías y capacidades de las células mamarias. ESR1 y WT1 participan en la proliferación celular, MGMT y BRCA2 participan ambos, por diferentes vías, de la reparación de daños producidos en el ADN, mientras que CD44 es una proteína importante para la adhesión celular. El análisis inmunohistoquímico del receptor de estrógeno alfa en el fibroadenoma gigante revela una expresión valorada en un 15%. Esta baja expresión de la proteína es consistente con la metilación aberrante del gen que la codifica (Figura 5.5D).

Este descubrimiento permite sospechar que esta infrecuente enfermedad puede presentar, al menos a nivel epigenético una diferente etiología respecto de los fibroadenomas no gigantes. El seguimiento de la paciente por 4 años no revela recurrencia de la enfermedad mamaria. Este caso ha sido reportado en el Journal of Medical Case Reports debido a que es la primera vez que se describen alteraciones en la metilación del ADN de fibroadenomas gigantes [197].



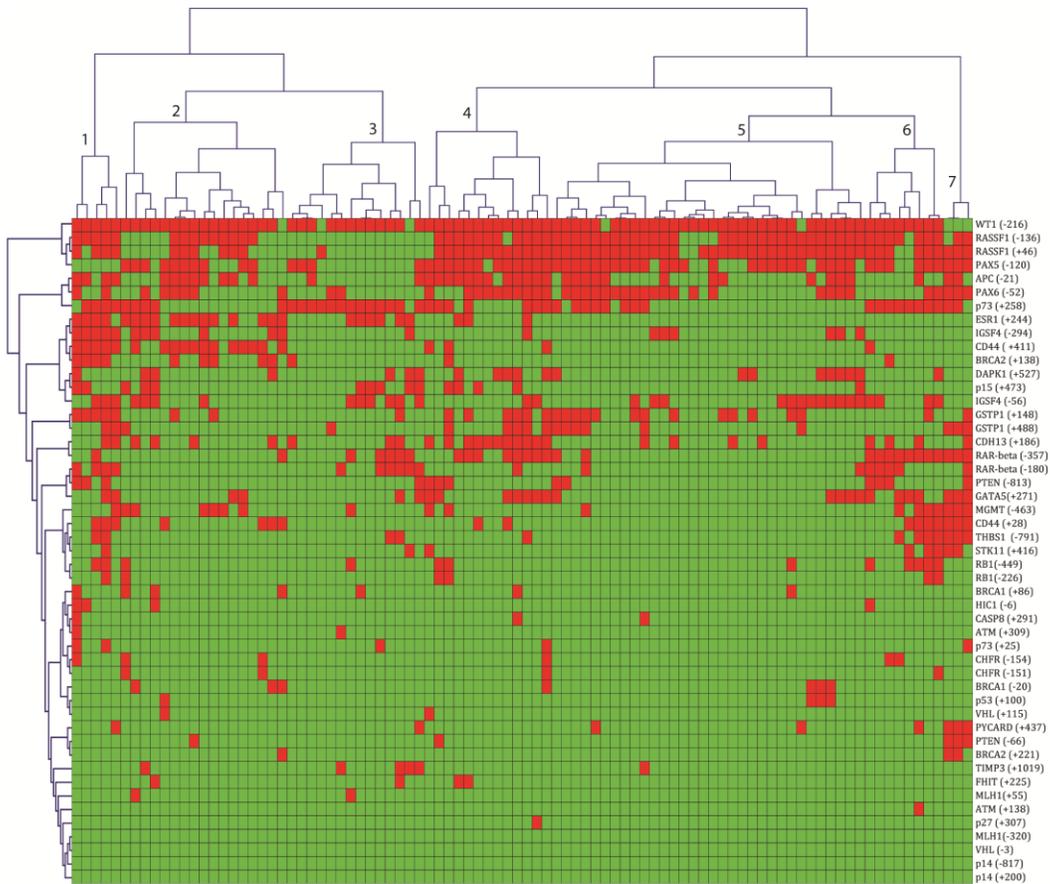
**Figura 5.5. Perfil de metilación aberrante en fibroadenoma gigante.** A y B- Análisis del perfil de metilación del ADN obtenido de un fibroadenoma gigante, utilizando las sondas ME001 (A) y ME002 (B). Se marcan con asterisco los 5 genes que presentan metilación aberrante. C- Esquema que compara las regiones analizadas en esta tesis con el análisis realizado por Di Vinci y colaboradores en fibroadenoma no gigante. Mediante el programa CLC Sequence Viewer 6 se representan el gen CDKN2A, la numeración de las bases respecto al inicio de la transcripción en el exón 1, los 6 exones descritos para este gen (recuadros celestes), dos variantes del ARN mensajero (transcripto 1 y 4 en recuadros verdes) y las isoformas p14ARF y p16INK4a (recuadros amarillos). D- Análisis inmunohistoquímico del fibroadenoma gigante con marcación del receptor de estrógeno alfa (color marrón).

### 5.1.2.3. Perfiles de metilación aberrante del cáncer de mama

El ADN extraído de 92 carcinomas mamarios invasores es analizado mediante MS-MLPA para establecer el perfil de metilación tumoral (PMT). Todos los tumores analizados presentan metilación aberrante al menos en dos de las 49 regiones.

## - Especificidad de las alteraciones en la metilación

La información generada en el análisis de la metilación permite elaborar un perfil o firma epigenética del tumor, el cual incluye la información de las regiones metiladas y no metiladas de cada caso. Se observa que estos perfiles son específicos del proceso de cada tumor. No se encuentran dos perfiles que presenten la misma información de la información epigenética (Figura 5.7). Es importante destacar que la especificidad epigenética de cada tumor no es posible de ser determinada si se analiza un número reducido de regiones por metodologías limitadas como MSP.



**Figura 5.7. Perfiles de metilación tumoral.** Mapa de calor que representa el estado de metilación (rojo) y no metilación (verde) de cada una de las 49 regiones analizadas (vertical) en cada uno de los 92 tumores mamarios invasores (horizontal). En la parte superior se muestra el árbol generado por el análisis de clúster de los tumores. Cada clúster es numerado del 1 al 7, siendo el más numeroso el clúster número 5. A la izquierda se representa el árbol generado por el análisis de clúster de las 49 regiones analizadas. Ambos análisis de clúster se realizan utilizando la distancia absoluta de Manhattan. Los análisis de bootstrap o Jackknife no soportan esta organización de las muestras en los 7 clústeres.

La similitud o diferencia entre los perfiles de metilación pueden ser analizadas mediante distancias estadísticas. Estas distancias asignan un valor numérico al grado de diferencia entre dos perfiles. El menor valor en la distancia estadística es 0 y corresponde a dos perfiles idénticos. El mayor valor es 1, que corresponde a la mayor diferencia entre dos perfiles.

En el análisis de las 92 muestras, el análisis de las distancias estadísticas confirma que cada tumor presenta un perfil de metilación específico (Figura 5.7 y Figura 5.8A). Los dos tumores con menor distancia (mayor similitud) son CMT43 y CMT48, con un valor de 0,0454. La diferencia entre ambos está dada por la metilación de una sola región, IGSF4 está metilado en CMT43 (Figura 5.8B).

#### - **Frecuencia de metilación de las regiones afectadas en la carcinogénesis**

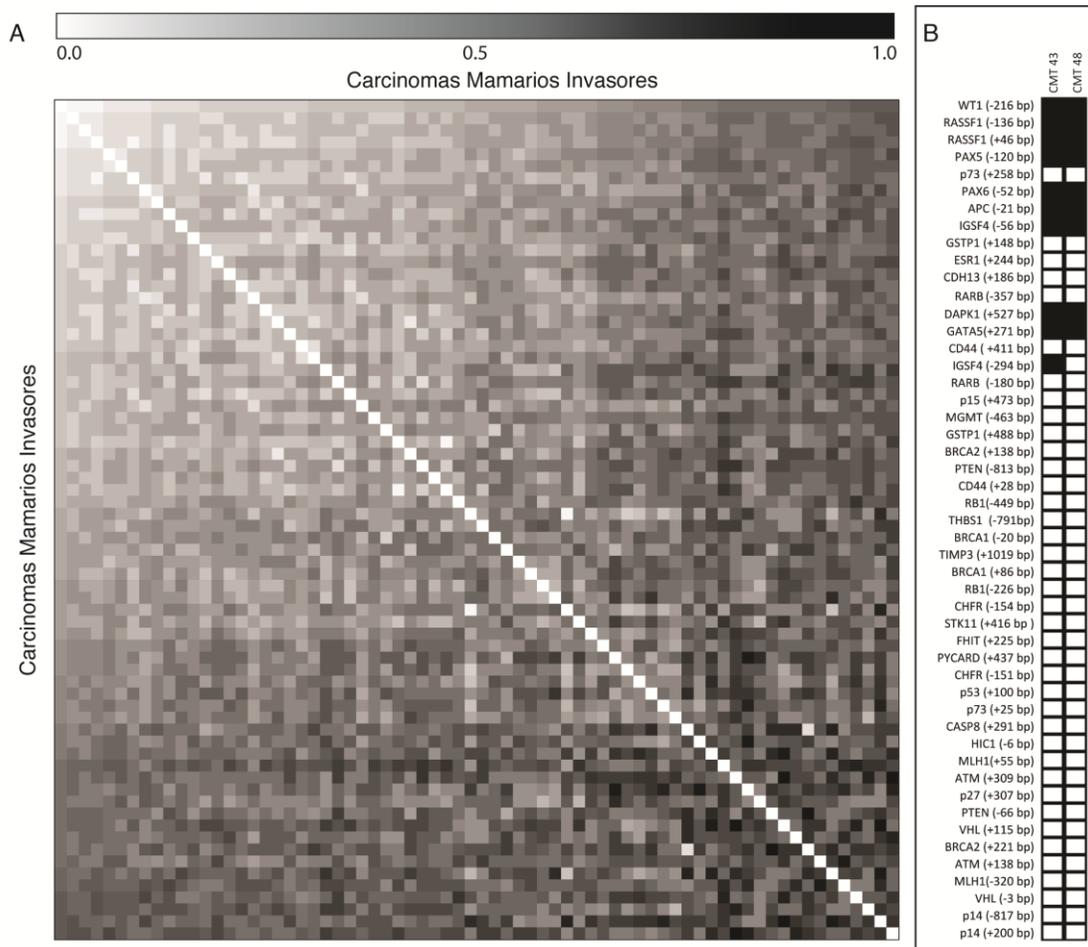
A pesar de observar que los perfiles de metilación son específicos de cada proceso tumoral, algunas de las regiones analizadas están más frecuentemente metiladas que otras.

Un grupo de 3 genes presenta metilación aberrante en más del 60% de los carcinomas invasores. La región promotora del gen WT1 se encuentra metilada en el 91,3% (84/92) de los tejidos tumorales. El gen RASSF1 es analizado en dos regiones, una en el promotor y la otra en el primer exón, ambas metiladas en el 67,4% (62/92). Finalmente el gen PAX5 se encuentra metilado en el 64,1% (59/92) de los carcinomas invasores (Figura 5.9).

En oposición, otro grupo de 5 genes prácticamente no muestran metilación aberrante en el proceso tumorigénico mamario. Este grupo está constituido por los genes p14, VLH, MLH1, ATM y p27 con una frecuencia de metilación en todos los casos menor al 2,1% (Figura 5.9).

Estos resultados sugieren que el proceso de metilación aberrante no es completamente al azar, sino que parece seguir un proceso relacionado con la progresión tumoral desde el tejido mamario sano hasta el carcinoma invasor. Esta idea fue sugerida previamente por Parrella y colaboradores [198]. Una explicación a este proceso de alteraciones epigenéticas, es que la metilación aberrante de una región puede ocurrir en cualquier momento del proceso tumoral y luego, ser seleccionada o no de acuerdo a la ventaja que le propicie al

desarrollo tumoral. Este proceso lleva a la conformación de una firma epigenética que reúne todas las alteraciones seleccionadas a lo largo de la carcinogénesis.



**Figura 5.8. Distancias estadísticas entre los perfiles de metilación tumoral.** **A-** Matriz de escala de colores generada por el programa Multi Experiment Viewer 4.7 representando las distancias de Manhattan de perfiles de metilación aberrante de los carcinomas mamarios analizados. La barra con la escala de grises representa el gradiente de distancias entre dos muestras: el color negro corresponde a la mayor distancia y el blanco a muestras idénticas. La matriz se encuentra ordenada de manera que los perfiles con mayor similitud se encuentran en el vértice superior izquierdo. **B-** Perfiles de metilación de los tumores mamarios con la menor distancia de Manhattan. En cuadros negros se representa la metilación de la región, mientras que en los cuadros blancos la no metilación de la región analizada. Se observa que comparten el estado de metilación de 48 de las 49 regiones estudiadas.

Considerando la tumorigénesis como un proceso análogo al evolutivo, donde los rasgos conservados confieren ventajas adaptativas, se puede inferir que la elevada frecuencia de metilación de algunos genes en los carcinomas mamarios sugiere que la alteración

epigenética de estos es un paso necesario para el desarrollo tumoral. La metilación de WT1 pareciera ser una alteración obligada para la carcinogénesis mamaria ya que este es un rasgo observado en más del 91,3% de los tumores analizados.

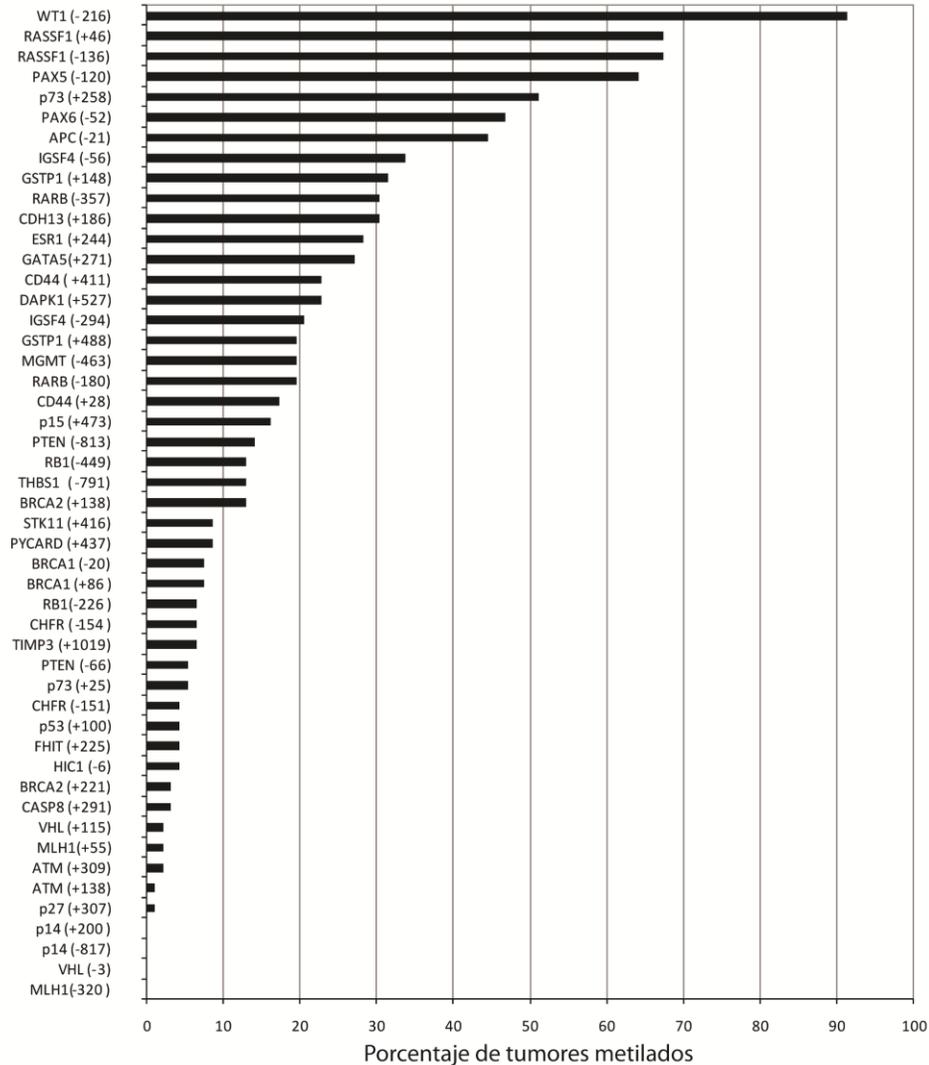


Figura 5.9. Frecuencias de metilación de regiones metiladas en carcinomas mamarios invasores.

- **Diferencias entre los perfiles de metilación de pacientes con cáncer de mama de distintas regiones geográficas.**

La metilación del ADN es un fenómeno influenciado por factores ambientales [93]. Por ello se analizan las diferencias en los perfiles de metilación aberrante de las pacientes con cáncer de mama de la provincia de Mendoza (n=80) y del estado de California, EEUU (n=12).

El análisis estadístico de Chi cuadrado y la fuerza de la asociación calculada mediante el coeficiente *Phi* muestran que las diferencias entre los grupos de pacientes se basan en el estado de metilación de 4 genes (Tabla 5.1).

Gen	Región	Mendoza		California		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
		No Met	Met	No Met	Met			
RASSF1	-136	21	59	9	3	11,285	0,350	0,001
WT1	-216	4	76	4	8	10,551	0,339	0,001
PTEN	-66	78	2	9	3	10,279	-0,334	0,001
IGSF4	-56	49	31	12	0	7,013	0,276	0,008

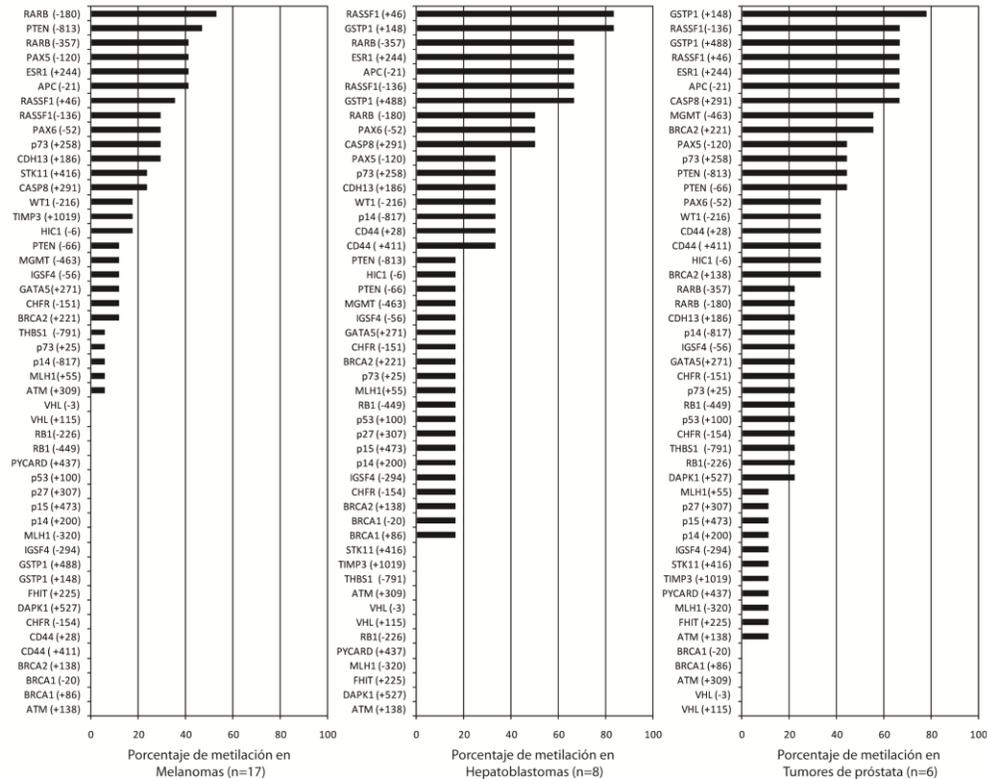
**Tabla 5.1: Regiones diferencialmente metiladas entre tumores mamarios de Mendoza y tumores mamarios de California.**

Este resultado sugiere que los procesos tumorales en las pacientes con cáncer de mama de la provincia de Mendoza presentan diferencias con los de las pacientes de California. Estas diferencias pueden ser atribuidas a distintos factores tanto ambientales como técnicos. Las muestras de las pacientes incluidas en California fueron embebidas en parafina, mientras que todas las muestras de pacientes de Mendoza son tejidos congelados.

Para evaluar el efecto de la parafina en el establecimiento del perfil de metilación se analizan muestras pareadas del mismo tejido congelado y embebido en parafina. Las muestras son obtenidas del banco de tejidos congelados y en parafina del Instituto John Wayne. Estas muestras pertenecen a metástasis cerebrales de 4 pacientes con melanoma. El resultado de este análisis revela que los perfiles de metilación de las muestras congeladas y embebidas en parafina son iguales. La diferencia se observa en el porcentaje de metilación de cada región. Esto sugiere que hay interferencia de las uniones entre ADN y proteínas generadas en la fijación del tejido y que este proceso influye el resultado final de MS-MLPA. Pero al considerar solo presencia o ausencia de metilación de una determinada región la parafina no interfiere en la observación. Para realizar análisis estadísticos de la información del perfil de metilación aberrante del cáncer mamario, se seleccionaron sólo las pacientes incluidas en la provincia de Mendoza, cuyas muestras han sido procesadas bajo los mismos protocolos.

- **El perfil de metilación tumoral es específico de cada tejido afectado**

Con el fin de determinar si la información obtenida del análisis de metilación es común a la carcinogénesis de cualquier tejido o específico del cáncer de mama, se analizan tumores con otros orígenes tisulares. En el análisis se incluyen 17 melanomas, 8 hepatoblastomas y 6 tumores de próstata. Al igual que lo mostrado en carcinomas mamarios, todos estos tumores presentan alteraciones epigenéticas de las regiones analizadas. Los melanomas presentan una mayor frecuencia de metilación de los genes RARB (52,9%) y PTEN (47%). En hepatoblastomas se observa una mayor frecuencia de metilación en los genes GSTP1 (77,7%) y RASSF1 (77,7%), mientras que en tumores de próstata el gen más frecuentemente metilado es el GSTP1 (83,3%) (Figura 5.10).



**Figura 5.10. Frecuencia de metilación en otros tipos de tumores.** Se detalla la frecuencia de metilación de las 49 regiones analizadas en 17 tumores malignos de melanocitos (izquierda), 8 tumores de hígado (centro) y 6 tumores de próstata (derecha).

En la figura 5.7 se observó el análisis de clústeres jerárquicos de 92 tumores mamarios invasores. La generación de 7 clústeres demuestra que entre los perfiles de metilación del

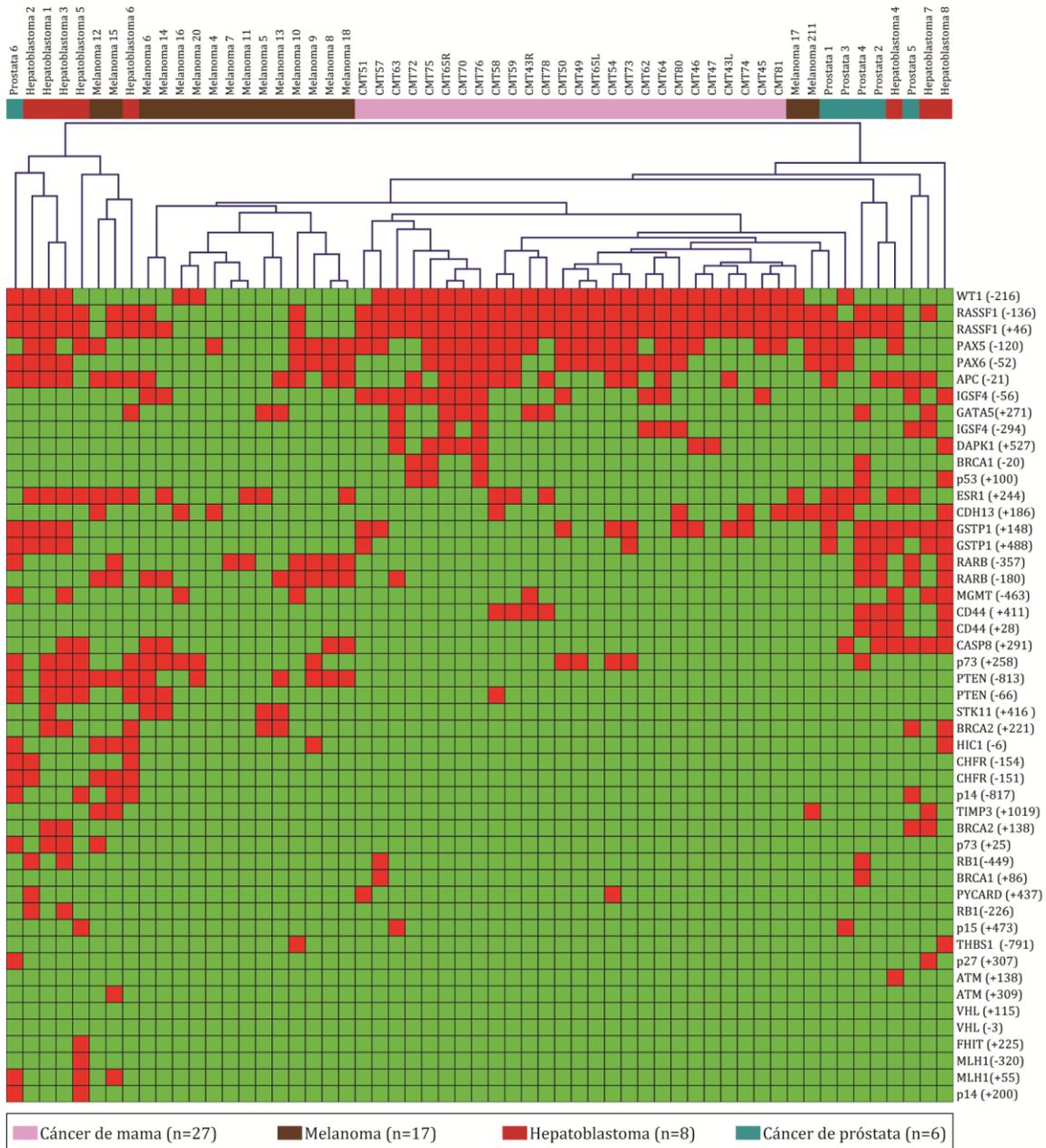
cáncer de mama existen diferencias que podrían estar relacionadas con rasgos clínicos de la enfermedad. Para comparar el perfil de metilación de estos tumores mamarios con los perfiles de los procesos neoplásicos de otros tejidos, se decidió primero seleccionar un clúster que fuera representativo del proceso tumoral mamario. Esta elección se basó en la frecuencia de metilación mostrada en la figura 5.9 y el número de integrantes de cada clúster. Utilizando este criterio se genera el vector SOM que contiene la información más representativa de los perfiles considerados y selecciona el clúster que más se ajusta a esta información. El resultado de este algoritmo determina que 27 carcinomas mamarios del clúster número 5 son los representativos del perfil de metilación del cáncer de mama.

Al analizar la generación de los clústeres jerárquicos con los 27 carcinomas mamarios seleccionados por el vector SOM, los 17 melanomas, los 8 hepatoblastomas y los 6 tumores de próstata, se observa la generación de un clúster que incluye todos los carcinomas mamarios más dos melanomas (Figura 5.11). Este resultado demuestra diferencias entre el proceso carcinogénico mamario y el resto de los tejidos estudiados.

A partir de la especificidad detectada, se compara la metilación de los 80 perfiles de metilación de carcinomas mamarios invasores de pacientes de Mendoza y los perfiles de metilación de melanoma, hepatoblastoma y próstata. La asociación más importante es observada en la metilación del gen WT1 ( $\Phi=0,724$ ,  $p<0,001$ ), el cual se encuentra diferencialmente metilado en cáncer de mama (Tabla 5.2).

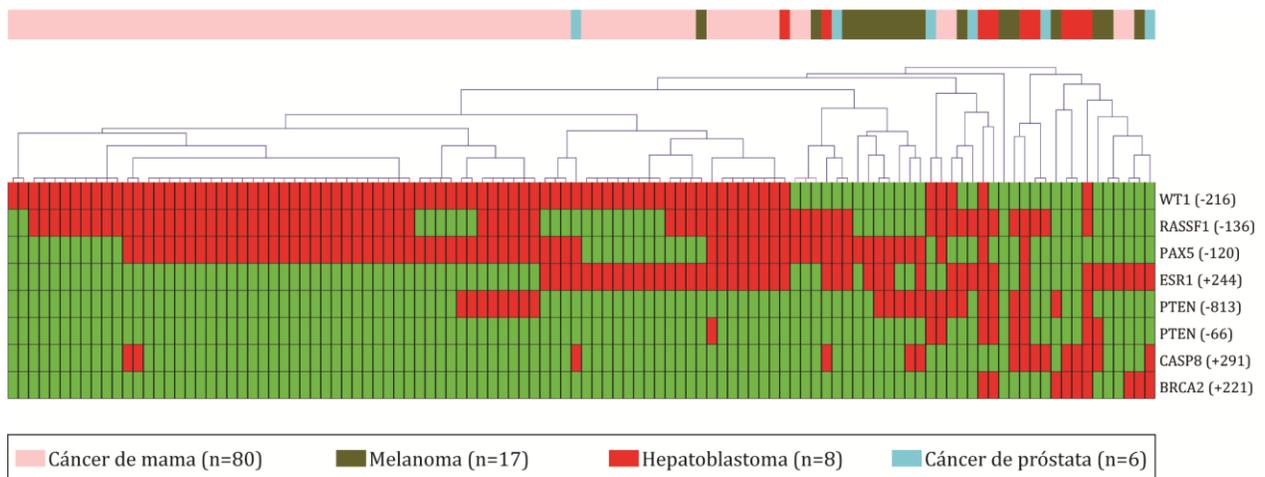
Gen	Región	Tumores de mama		Otros tumores		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
		No Met	Met	No Met	Met			
WT1	-216	4	76	23	8	58,112	0,724	<0,001
CASP8	+291	77	3	19	12	23,364	-0,459	<0,001
BRCA2	+221	79	1	24	7	15,200	-0,370	<0,001
PTEN	-66	78	2	24	7	12,092	-0,330	0,001
PTEN	-813	68	12	18	13	9,298	-0,289	0,002
ESR1	+244	56	24	14	17	5,918	-0,231	0,015
RASSF1	-136	21	59	15	16	4,996	0,212	0,025

**Tabla 5.2: Regiones diferencialmente metiladas entre tumores mamarios de Mendoza y otros tumores.**



**Figura 5.11. Análisis de clúster jerárquico de los perfiles de metilación de distintos tumores.** El mapa de calor muestra el resultado de los cálculos de las distancias estadísticas de Manhattan entre los perfiles de metilación tumoral de 27 tumores mamarios, 17 melanomas, 8 tumores hepáticos y 6 tumores de próstata. Los perfiles de metilación tumoral de mama (barra color rosa) forman un clúster con dos melanomas. Los perfiles de melanoma (barra color marrón) se agrupan en otro clúster, el análisis de Bootstrap muestra un soporte de esta agrupación del 75%. Los perfiles de hepatoblastoma y próstata (barras color rojo y celeste) aparecen distribuidos en los extremos del mapa sin manifestar una agrupación definida por tejido de origen, el análisis de Bootstrap muestra un soporte menor al 50%. Los 27 tumores mamarios fueron previamente seleccionados del análisis de clúster jerárquico mostrado en la figura 5.7 con el fin de utilizar los perfiles más representativos del tipo tumoral.

Con las regiones diferencialmente metiladas entre los tumores mamarios y los tumores no mamarios se puede generar un panel denominado panel predictivo del origen tumoral. Este panel contiene la información del estado de metilación de 8 regiones diferencialmente metiladas entre tumores mamarios y el resto: WT1 (-216pb), RASSF1 (-136pb), PTEN (-813 pb), PTEN (-66pb), ESR1 (+244pb), CASP8 (+291pb) y BRCA2 (+221pb). Con este panel se realiza el análisis de clústeres jerárquicos que evidencia la separación entre de los perfiles provenientes de tumores mamarios y el resto de los tejidos (Figura 5.12).



**Figura 5.12: Generación de clústeres jerárquicos de perfiles de metilación de tumores con distintos orígenes.** Se observa una separación entre los tumores mamarios y el resto de los tumores. A la derecha se detallan las 8 regiones consideradas como predictivas del origen tumoral. El análisis de bootstrap muestra que los clústeres generados no son únicos con un soporte del 50%.

- **Existen eventos de metilación concurrente entre las regiones analizadas.**

Los eventos de metilación aberrante pueden estar asociados entre ellos, es decir pueden presentar un grado de dependencia uno respecto del otro. La asociación positiva entre la metilación de dos regiones se denomina metilación concurrente [199], mientras que la asociación negativa es denominada metilación divergente [200]. Para evaluar el grado de asociación entre la metilación de las diferentes regiones, la fuerza de esta relación es establecida mediante el coeficiente *Phi*. Debido a que los eventos de no metilación tienen influencia en los análisis estadísticos de asociación y correlación [188], se consideran las asociaciones establecidas entre las regiones metiladas en más del 20% de los carcinomas (ver figura 5.9).

Los resultados del análisis estadístico muestran que entre las regiones analizadas hay dos tipos de asociaciones. Por un lado, asociaciones positivas o eventos de metilación concurrente. Entre los casos más destacados se destaca una fuerte asociación entre la metilación del promotor del gen RASSF1 y su primer exón ( $\Phi=0,860$ ,  $p<0,001$ ). Esta observación concuerda con los conceptos previamente publicados que sugieren una progresión de la metilación aberrante intragénica durante el proceso carcinogénico en mama [201]. Por otro lado, se observan asociaciones negativas o metilación divergente. El caso más destacado se observa entre la metilación del gen ESR1 y la metilación del primer exón de RASSF1 ( $\Phi=0,478$ ,  $p<0,001$ )

Este análisis además revela que la metilación del gen RASSF1 es concurrente con un grupo de genes: PAX5, PAX6, APC y GSTP1. Así mismo, se observa que la metilación de RASSF1 es divergente con dos genes: ESR1 y p73. A su vez, el gen ESR1 presenta metilación concurrente con IGSF4 y CD44. Mientras que el gen p73, presenta metilación concurrente con el gen RARB (Tabla 5.3).

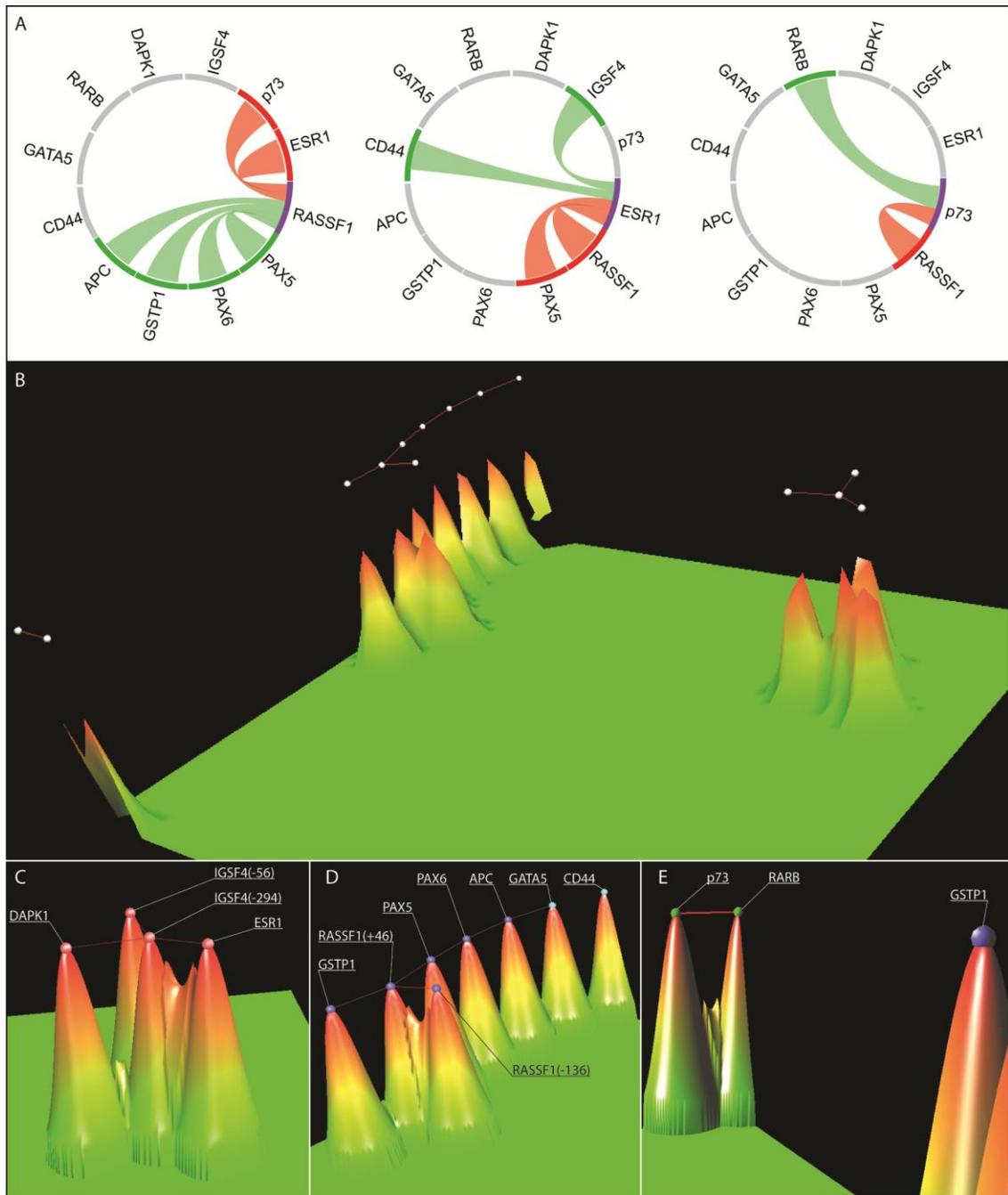
	RASSF1(-136)	RASSF1(+46)	PAX5(-120)	PAX6(-52)	GSTP1(+148)	APC(-21)	CD44(+411)	GATA5(+271)	RARB(-357)	DAPK1(+527)	IGSF4(-56)	IGSF4(-294)	p73(+258)	ESR1(+244)	
1	0,860**	0,295**	0,254*	0,366**	0,311**	-	-	-	-	-	-	-0,298**	-0,415**	RASSF1(-136)	
1		0,351**	0,359**	0,326**	0,252*	-	-	-	-	-	-	-0,250*	-0,478**	RASSF1(+46)	
1			0,327**	-	0,221*	-	-	-	-	-	-0,285*	-	-0,340**	PAX5(-120)	
1				-	0,343**	-	-	-	-	-	-	-	-	PAX6(-52)	
1					-	-	-	-	-	-	-	-	-	GSTP1(+148)	
1						0,260*	0,290**	-	-	-	-	-	-	APC(-21)	
1							-	-	-	-	-	-	0,291**	CD44(+411)	
1								-	-	-	-	-	-	GATA5(+271)	
1									-	-	-	0,319**	-	RARB(-357)	
1										-	0,220*	-	-	DAPK1(+527)	
1											0,340**	-	-	IGSF4(-56)	
1												-	0,276*	IGSF4(-294)	
1													-	p73(+258)	
1														ESR1(+244)	

**Tabla 5.3: Análisis de asociación entre la metilación de las distintas regiones.** En el análisis se incluyen las regiones metiladas en más del 20% de los carcinomas mamarios. Solo se representan en la tabla las regiones que muestran metilación concurrente (recuadro verde) o divergente (recuadro rojo). El valor mostrado corresponde al coeficiente  $\Phi$  a una significancia estadística  $p$  menor al 0,05 (\*) y menor al 0,01 (\*\*).

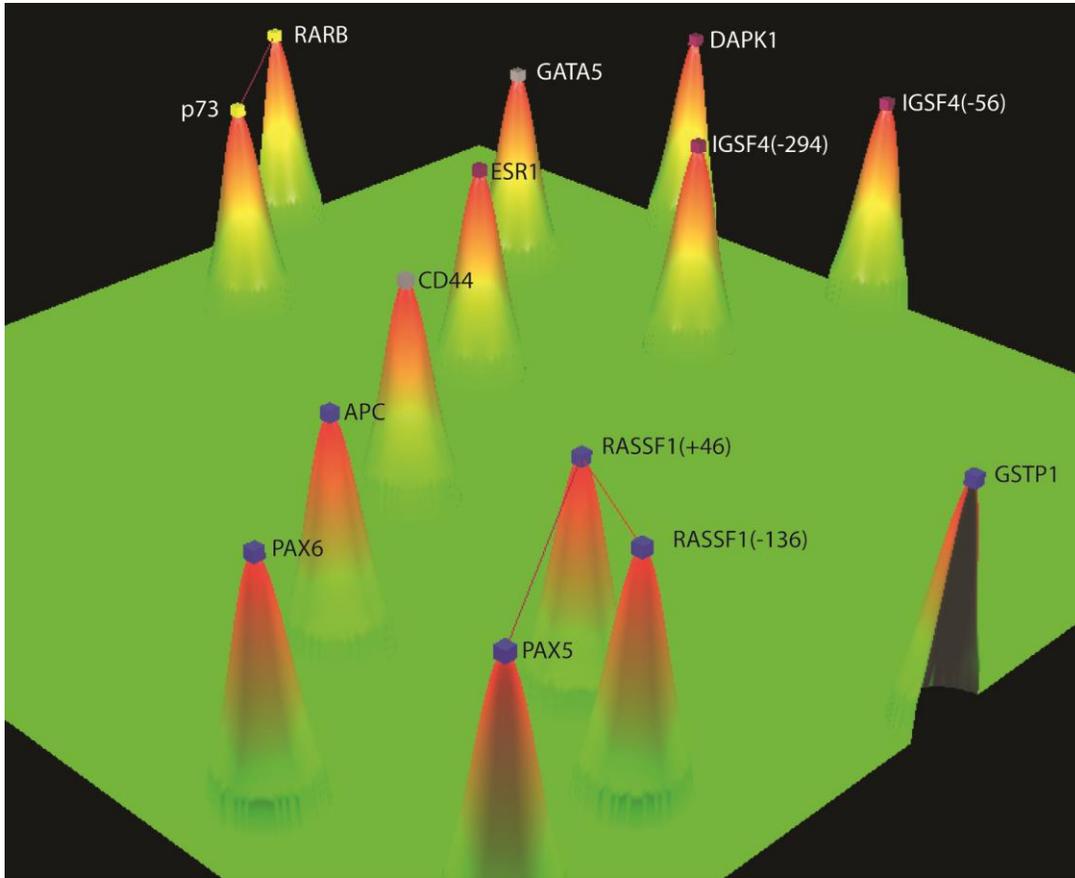
Estos datos sugieren la existencia de tres grupos de genes que son afectados en la carcinogénesis mamaria y muestran que la metilación en los tumores mamarios pareciera seguir una u otra vía de alteraciones y que estas vías son excluyentes entre sí: el grupo RASSF1 integrado por PAX5, PAX6, APC, GSTP1 y RAFFS1, el grupo p73 integrado por RARB y p73 y el grupo ESR1 integrado por IGSF4, DAPK1 y ESR1.

En la figura 5.13B-E se observa la representación de la generación del mapa de terreno entre las 14 regiones que muestran asociaciones positivas o negativas. Se observa claramente la generación de tres grupos de montañas que contienen los tres agrupamientos de regiones genéticas y que son excluyentes entre sí. Este mapa sugiere que los tumores mamarios que adquieren las alteraciones de uno de estos grupos, no son proclives a adquirir las alteraciones de los otros dos grupos. El análisis de relación muestra que entre los grupos que contienen a p73 y a ESR1 no hay asociación ni positiva, ni negativa. Ambos grupos, presentan asociación negativa con el grupo que contiene a RASSF1. El análisis representado en la figura 5.13 tiene en cuenta la distancia entre genes individuales; el punto que ocupa cada región se representa en relación al resto teniendo en cuenta la distancia entre una región y otra.

Otro análisis interesante es observar la distancia entre dos regiones pero considerando la influencia de una tercer región sobre esta distancia. Así se representa en la figura 5.14 el grupo de regiones que contiene a RASSF1 que se mantiene en un extremo, mientras los grupos de ESR1 y p73 se unifican en un extremo opuesto. El factor común que los une, es su metilación divergente con el grupo de RASSF1 (Figura 5.14). Entonces se puede proponer que los tumores que adquieren las alteraciones de la metilación contenidas en el grupo del gen RASSF1 no son proclives a conservar además alteraciones contenidas en los otros dos grupos.



**Figura 5.13: Concurrencia y divergencia de la metilación de las regiones analizadas.** **A-** Diagrama de cintas de las asociaciones. En verde se representan las asociaciones positivas (concurrente) y en rojo las asociaciones negativas (divergente) de los genes RASSF1 (izquierda), ESR1 (centro) y p73 (derecha). **B-** Mapa del terreno generado con las distancias de Manhattan entre las 14 regiones que presentan asociación. Se observa la generación de tres agrupaciones distantes una de otra. **C-** Ampliación del aglomerado de las regiones que contiene ESR1. **D-** Ampliación del aglomerado de regiones que contiene RASSF1. **E-** Vista posterior del aglomerado que contiene al gen p73. En C, D y E se observan las uniones (líneas rojas) que generan cada grupo.



**Figura 5.14: Mapa del terreno generado del análisis de la concurrencia y divergencia de la metilación de las regiones analizadas considerando la distancia respecto a dos regiones vecinas.** La distancia entre una región y otra es calculada considerando el aporte de una tercera. De este modo, las regiones del grupo que contiene a RASSF1 (cuadrados azules) se mantienen cercanas en el vértice inferior del mapa. Los grupos conteniendo a ESR1 (cuadrados bordó) y a p73 (cuadrados amarillos) se acercan en el vértice superior del mapa. La aproximación entre estos no está dada por una asociación positiva entre los integrantes del grupo, sino por su común metilación divergente con el grupo de RASSF1. Los genes que en el análisis de asociación no muestran una definición clara del grupo de pertenencia se encuentran distribuidos entre los grupos (cuadrados grises). Las líneas rojas marcan las asociaciones que presentan un coeficiente mayor a 0,7.

#### 5.1.2.4. Metilación aberrante de las metástasis en ganglios linfáticos.

El escape de las células tumorales y el posterior anclaje en los ganglios linfáticos es el factor pronóstico más importante del cáncer de mama.

Los 21 ganglios linfáticos con infiltración neoplásica revelan metilación aberrante en el 100% de los casos. El análisis de 3 ganglios sin infiltración muestra ausencia de metilación

aberrante, por lo que el análisis de metilación por MS-MLPA se muestra en concordancia con los resultados establecidos por anatomía-patológica. El análisis estadístico de la concordancia entre los métodos muestra un índice  $kappa = 1$  y un  $p < 0,001$ .

Los ganglios linfáticos con metástasis presentan un mínimo de 6/49 y un máximo de 15/49 regiones metiladas (media: 10,48). El número de regiones metiladas en ganglios no presenta diferencias significativas con el número de regiones metiladas en tumores primarios.

#### - **Especificidad de los perfiles de metilación de ganglios linfáticos afectados**

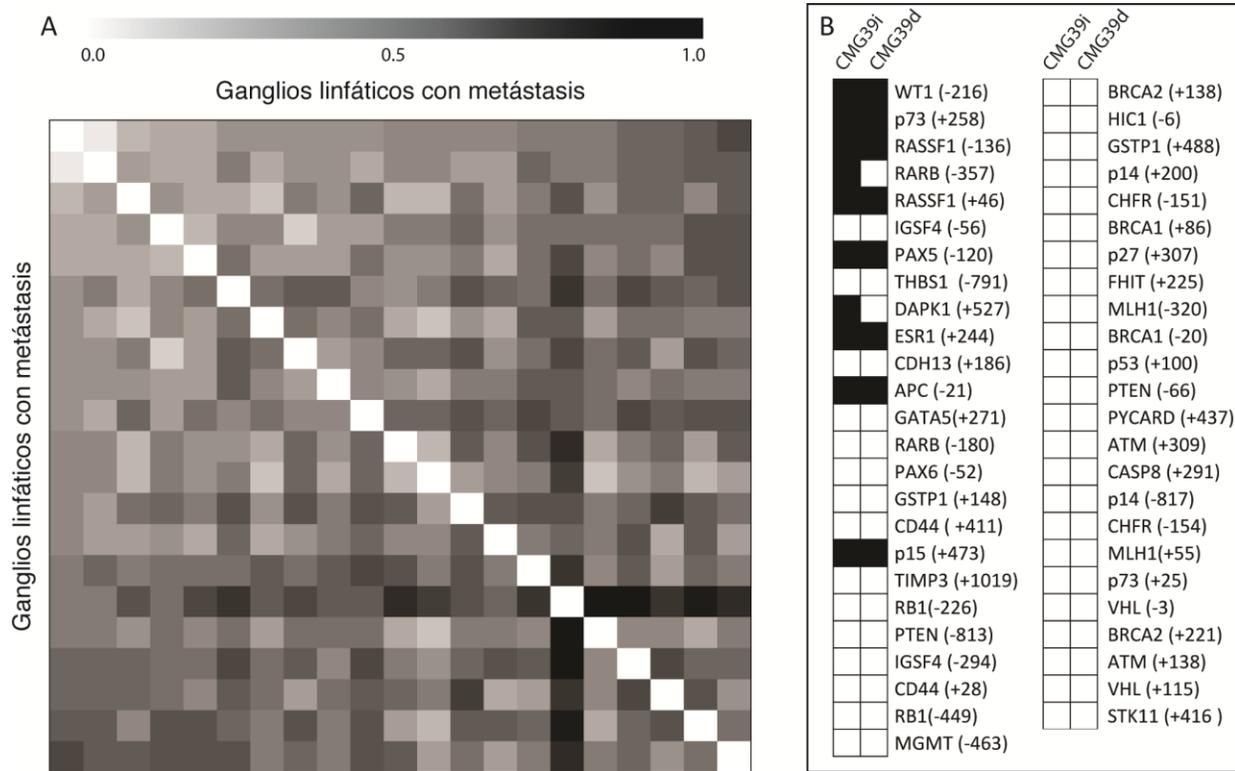
El análisis del perfil de metilación de los 21 ganglios linfáticos con metástasis revela que los perfiles son específicos de cada caso (Figura 5.15A y Figura 5.16A). La menor distancia estadística de Manhattan es observada entre los ganglios CMG39i y CMG39d, que son metástasis en la cadena linfática de la mama izquierda y derecha respectivamente de la paciente CM39. Estos ganglios comparten el estado de metilación de 47/49 regiones. Las dos regiones diferencialmente metiladas son RARB (-136) y DAPK1 (+527) (Figura 5.15B). Esta diferencia representa una distancia de Manhattan = 0,091.

#### - **Frecuencia de metilación de las regiones afectadas en ganglios linfáticos**

Los perfiles de metilación de ganglios afectados presentan algunas regiones más frecuentemente metiladas que otras.

Todos los ganglios analizados presentan la metilación del gen WT1. La metilación de PAX5 y del primer exón de RASSF1 es menos frecuente en ganglios que en tumores primarios. Por otro lado se observa que la metilación de las regiones p73 (+258) y RARB (-357) es más frecuente en ganglios que en tumores primarios, 81% y 66,6% respectivamente. Otro gen que muestra importantes diferencias en la frecuencia de metilación en ganglios respecto de tumores primarios es THBS1, metilado en el 47,62% de los ganglios linfáticos y 13% de tumores primarios (Figura 5.9, Figura 5.16B y Tabla 5.4). Una hipótesis para esta observación podría ser que las células que han escapado del tumor hacia el ganglio, continúan un proceso de metilación aberrante independiente del tumor, con otras ventajas

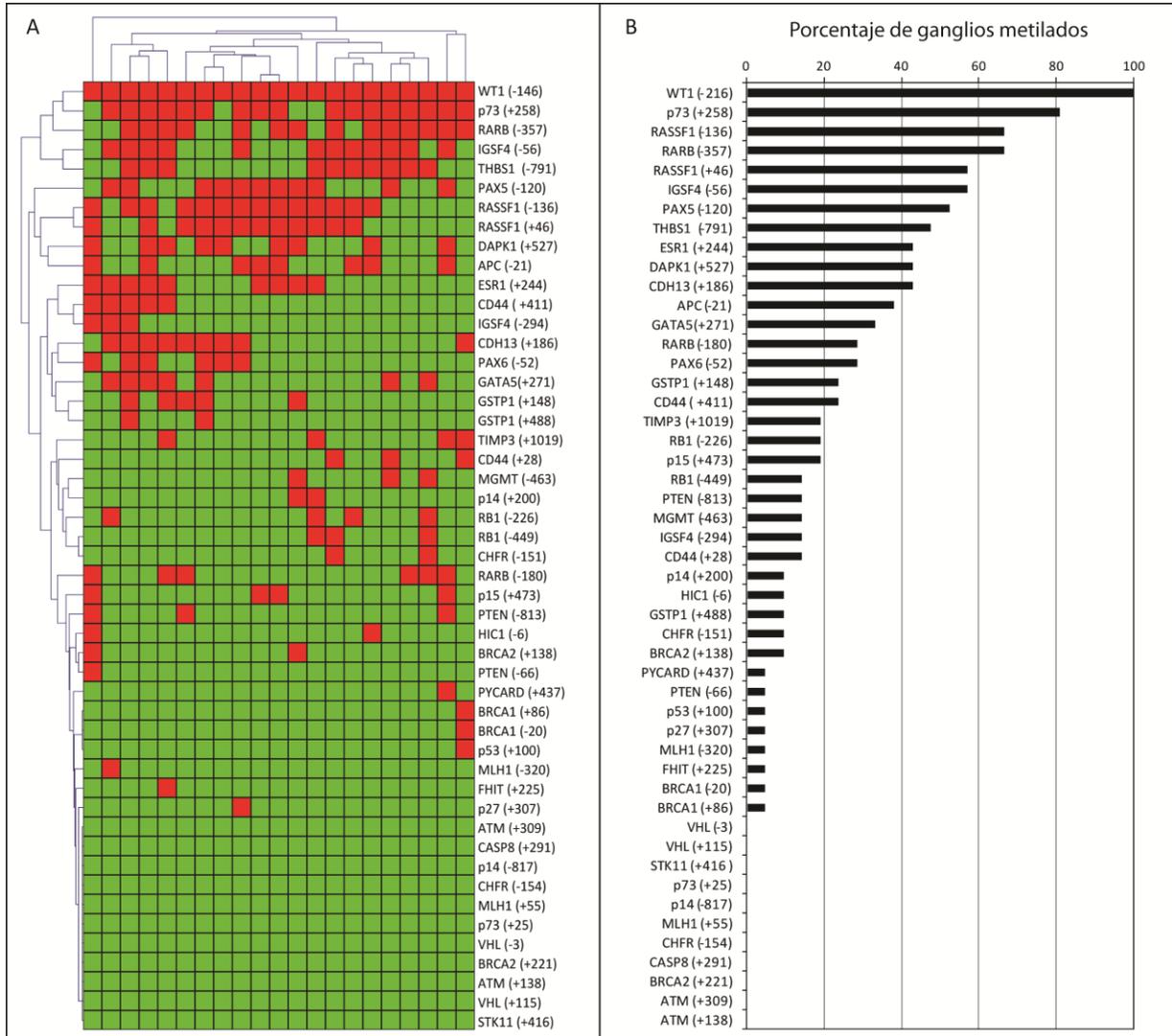
adaptativas, que puede derivar en un perfil de metilación de las células que generaron la metástasis inicial.



**Figura 5.15. Distancias estadísticas entre los perfiles de metilación ganglionar.** **A-** Matriz de distancias de Manhattan entre los perfiles de metilación de ganglios linfáticos con metástasis. La barra con la escala de grises representa la distancia entre dos muestras, el color negro corresponde a la mayor distancia mientras que el blanco a muestras idénticas. La matriz se encuentra ordenada de manera que los perfiles con mayor similitud se encuentran en el vértice superior izquierdo. **B-** Comparación de los perfiles de metilación de los ganglios con la menor distancia de Manhattan. En cuadros negros se representa la metilación de la región, mientras que en cuadros blancos la no metilación de la región analizada. Se observa que comparten el estado de metilación de 47 de las 49 regiones estudiadas.

Gen	Región	Tumores de mama		Ganglios linfáticos		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
		No Met	Met	No Met	Met			
THBS1	-791	71	9	11	10	14,405	-0,378	<0,001
RARB	-357	57	23	7	14	10,302	-0,319	0,001
p73	+258	39	41	4	17	6,002	-0,244	0,014

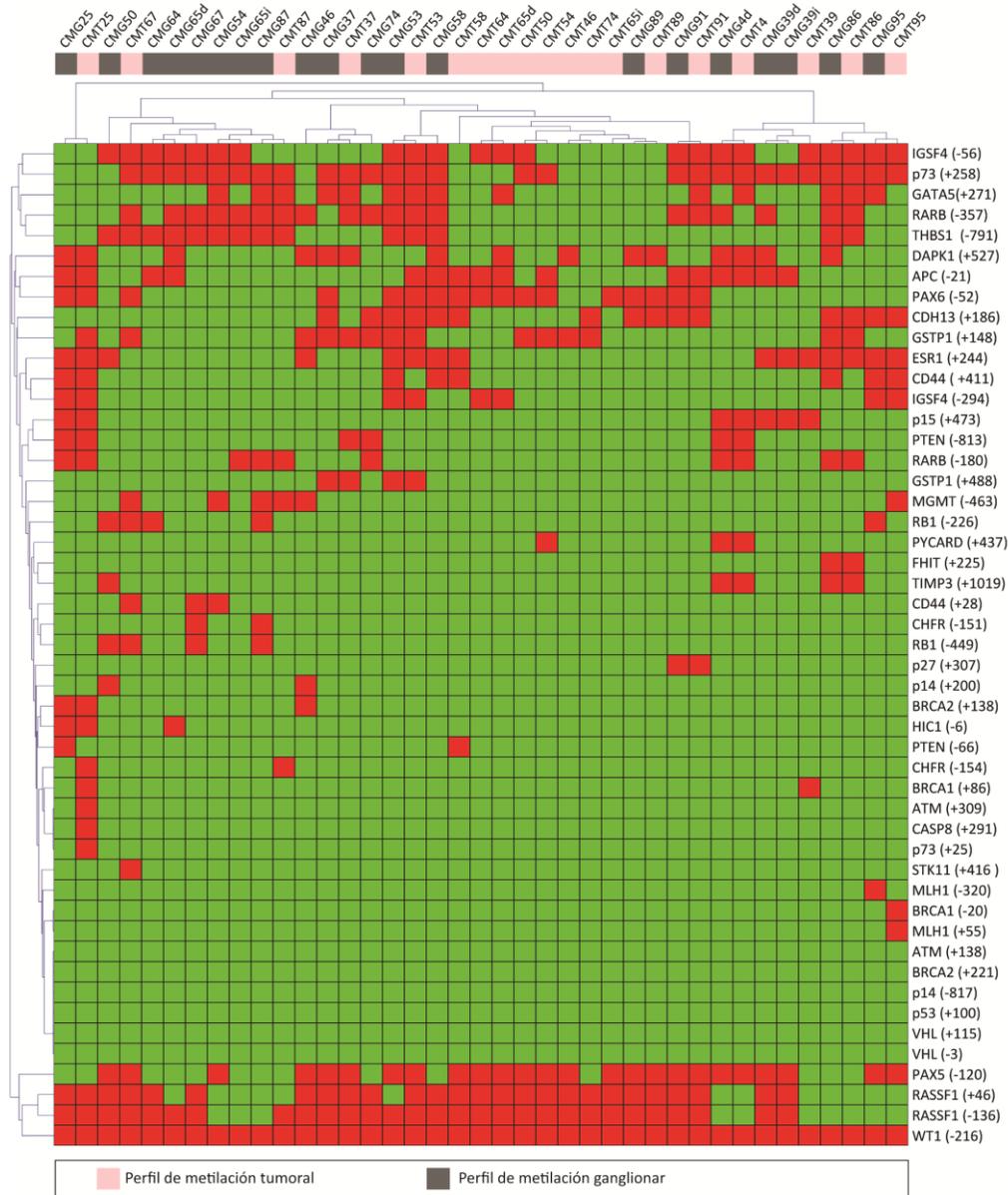
**Tabla 5.4: Comparación entre el perfil de metilación ganglionar y tumoral.** Se representan las tres regiones diferencialmente metiladas. Las tres regiones se encuentran más metiladas en ganglios linfáticos que en tumores primarios.



**Figura 5.16: Perfiles y frecuencias de metilación ganglionar.** **A-** Generación de clústeres jerárquicos con distancia métrica de Manhattan de los perfiles de metilación ganglionar. **B-** Frecuencia de metilación de las regiones analizadas en los 21 ganglios linfáticos con metástasis.

- **Las células tumorales que escapan a ganglios linfáticos mantienen rasgos de las alteraciones epigenéticas de los tumores primarios**

La comparación entre la información del PMT con la del perfil de metilación ganglionar (PMG) de una misma paciente muestra distintos grados de identidad. En algunos casos los PMT son idénticos a los PMG, mientras que otros perfiles presentan diferencias pero mantienen relaciones con el perfil de metilación del tumor de donde han escapado las células (Figura 5.17).

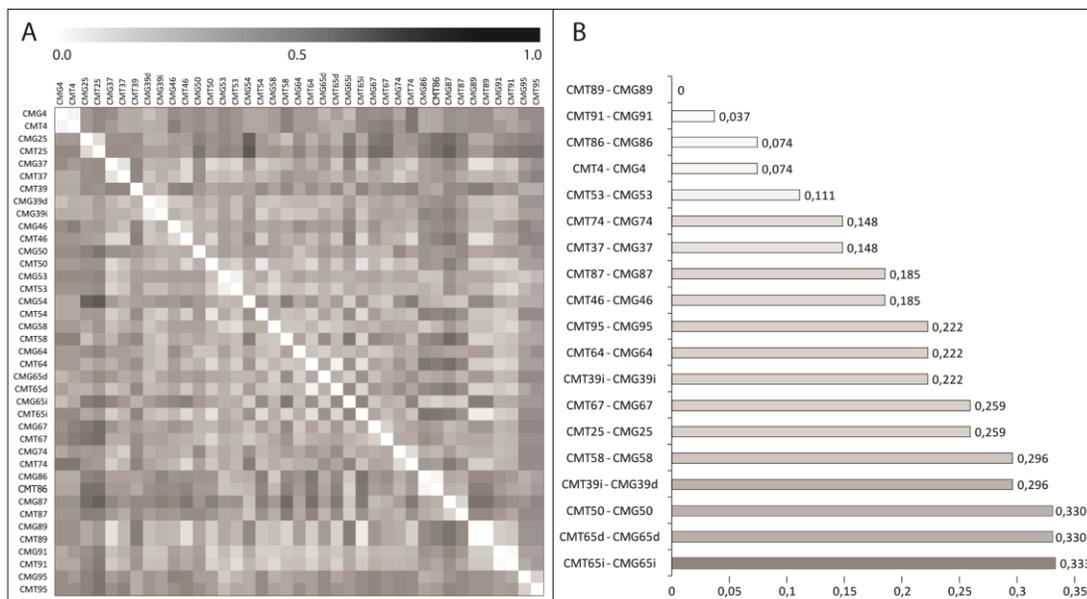


**Figura 5.17: Comparación de la información del perfil de metilación tumoral con el perfil de metilación ganglionar.** Mapa de calor de la generación de clústeres jerárquicos entre los perfiles de metilación tumoral (barras rosas) y perfiles de metilación ganglionar (barras grises). Bootstrap muestra que el clúster de los genes PAX5, RASSF1 y WT1 es el único con más de 70% de soporte.

Como puede observarse en la generación de clústeres jerárquicos, en la mayoría de los casos se observa que los PMT y PMG de una misma paciente son agrupados formando un mismo clúster (CM25, CM87, CM37, CM53, CM58, CM89, CM91, CM4, CM39, CM86 y CM95). Otras pacientes presentan procesos con diferencias más acentuadas (CM64, CM65, CM67, CM54, CM50 y CM58). Estas diferencias llevan a la formación de un clúster con los PMG y otro con

los PMT (Figura 5.17 y Figura 5.18A). Estos análisis de clúster concuerdan con la hipótesis de que los diferentes ambientes seleccionan adaptaciones distintas en los tumores y en los ganglios afectados.

En los extremos de esta situación encontramos por un lado que el caso de la paciente CM89 donde se observa que la información de ambos perfiles es idéntica, esto representa una distancia estadística de Manhattan igual a 0, mientras que el caso de la paciente CM65 muestra la mayor diferencia. La distancia de Manhattan entre el perfil de metilación del tumor situado en la mama izquierda y el perfil de metilación de los ganglios linfáticos de la misma mama es de 0,333 (Figura 5.18B).



**Figura 5.18: Distancias estadísticas entre los perfiles de metilación tumoral y ganglionar. A-** Matriz de distancias estadísticas de Manhattan entre perfiles de metilación tumoral y ganglionar pareados de cada paciente. La barra de escala de grises superior referencia la distancia estadística. **B-** Diagrama de barras que representa las distancias de Manhattan entre perfiles de metilación tumoral y ganglionar. Cada barra presenta el color correspondiente a la distancia representada en la barra de la parte A.

Una posible explicación a esta observación es que la porción del tejido analizada puede no corresponder al sector tumoral del cual se han escapado las células con capacidad metastásica. Suponiendo que las masas tumorales analizadas presentan un mismo grado de heterogeneidad, postulamos que la probabilidad de analizar una porción tumoral distinta a

la que libera las células metastásicas aumenta con el tamaño tumoral. Por lo tanto se sugiere que al aumentar el tamaño tumoral, aumenta la distancia entre PMT y PMG. Sin embargo, el análisis estadístico del coeficiente de correlación *Rho* de Spearman muestra que no hay correlación entre el tamaño tumoral y la distancia estadística entre los perfiles (Tabla 5.5 y Tabla 5.6)

Paciente	Distancia de Manhattan	Tamaño tumoral (cm)	Estado de los ganglios (N)
CMT89 - CMG89	0,00	3,00	1
CMT91 - CMG91	0,04	2,00	2
CMT4 - CMG4	0,07	0,90	1
CMT86 - CMG86	0,07	3,00	1
CMT53 - CMG53	0,11	4,00	2
CMT37 - CMG37	0,15	3,00	1
CMT74 - CMG74	0,15	8,00	2
CMT46 - CMG46	0,19	3,00	2
CMT87 - CMG87	0,19	3,00	1
CMT39i - CMG39i	0,22	1,60	2
CMT64 - CMG64	0,22	4,00	2
CMT95 - CMG95	0,22	1,00	1
CMT25 - CMG25	0,26	3,50	3
CMT67 - CMG67	0,26	2,50	1
CMT39i - CMG39d	0,30	1,60	2
CMT58 - CMG58	0,30	2,00	1
CMT50 - CMG50	0,33	4,00	3
CMT65d - CMG65d	0,33	1,50	2
CMT65i - CMG65i	0,33	2,70	3

**Tabla 5.5: Relación de la distancia estadística entre perfiles de metilación tumoral y ganglionar y los datos de tamaño tumoral y afección de ganglios linfáticos.**

Otra posible explicación a las diferencias entre las distancias está relacionada con la variable tiempo. Dónde aquellos perfiles idénticos, o muy similares serían el producto de metástasis recientes en ganglios linfáticos. Este planteo supone que a un tiempo  $t=0$  los perfiles de metilación son idénticos (distancia estadística=0), lo que lleva a postular que el aumento del tiempo desde el inicio de la metástasis ( $t>0$ ) aumentaría la diferencia entre los perfiles de metilación (distancia estadística $>0$ ). Para realizar una estimación del tiempo transcurrido desde el inicio del proceso metastásico a ganglios, se utilizó la información clínico-

patológica del avance de la afección ganglionar. Postulando que las pacientes con estado ganglionar N=1 presentan metástasis con menor tiempo de evolución que las pacientes con N=2 o N=3, en el mismo sentido las pacientes con N=2 menor tiempo de evolución que las pacientes con N=3 (Tabla 5.5). El análisis estadístico entre las variables distancia entre PMT y PMG y el valor N muestra un coeficiente de correlación *Rho* de Spearman sustancial (Tabla 5.6).

		Tamaño tumoral (cm)	Estado de los ganglios (N)
Distancia Escalar	Coeficiente <i>Rho</i> de Spearman	-0,12	0,476
Manhattan	Significancia (p)	0,623	0,039

**Tabla 5.6: Análisis estadístico de la correlación de Spearman entre la distancia estadística de Manhattan, el tamaño tumoral y el estado de afección ganglionar.**

No existen trabajos que establezcan el tiempo transcurrido desde el inicio de la metástasis y el grado de afección de los ganglios linfáticos. El resultado presentado sugiere que las diferencias observadas entre PMT y PMG podrían deberse al tiempo transcurrido desde el escape de las células originadoras de la metástasis ganglionar. Si bien las células que escapan y anidan los ganglios linfáticos pueden haber adquirido capacidades genéticas y epigenéticas que le permitan originar este proceso, la sola llegada de las mismas al tejido ganglionar desencadena una serie de cambios autócrinos y parácrinos. Estos cambios del microambiente tisular pueden propiciar el desarrollo de clones celulares con diferencias en el perfil de metilación original (tumoral). Y es aquí donde la consideración del tiempo toma relevancia para explicar que perfiles de metilación idénticos o similares corresponderían a procesos más recientes, mientras que perfiles con mayores diferencias podrían ser el producto de procesos iniciados anteriormente. Un caso que respalda este postulado es el de la paciente CM39. Al momento de la cirugía, esta paciente presentó un tumor en la mama izquierda y metástasis en ganglios de la axila izquierda y de la axila derecha. En un primer momento se sospechó de la presencia de un tumor oculto en la mama derecha, no detectable por los análisis pre-quirúrgicos. Luego del análisis y comparación de los perfiles de metilación tumoral (CMT39), ganglionar izquierdo (CMG39i) y ganglionar derecho

(CMG39d), la similitud entre los tres perfiles indicaría un evento inicial común. El dato que apoya la idea que los perfiles distintos corresponden con procesos de mayor evolución es que la distancia estadística entre CMT39 (mama izquierda) y CMG39i es menor que la distancia entre CMT39 (mama izquierda) y CMT39d (Figura 5.18). La metástasis en los ganglios de la axila derecha probablemente ha sido un proceso posterior al observado en la axila izquierda.

## **5.2. Relación entre las alteraciones epigenéticas y los factores clínico-patológicos de la enfermedad.**

Las manifestaciones clínicas del cáncer de mama muestran que esta es una enfermedad sumamente heterogénea, la cual no debe ser entendida como una enfermedad sino como un conjunto. Los factores clínicos, como estado de ganglios linfáticos, tamaño tumoral o expresión de receptores hormonales son muy importantes en la identificación del tipo y la agresividad de la enfermedad que padece una paciente. El análisis del origen tisular del carcinoma permite considerar principalmente cuatro tipos de enfermedades distintas, carcinomas lobulillares *in situ* (CLIS), carcinomas lobulillares invasores (CLI), carcinomas ductales *in situ* (CDIS) y carcinomas ductales invasores (CDI).

Para realizar análisis de relación entre las alteraciones epigenéticas y los factores pronóstico y predictivos es muy importante utilizar una población de pacientes con tumores que presenten parámetros comunes a todos ellos. Por este motivo se eligió un grupo de pacientes que presentaron carcinomas ductales invasores puros, es decir sin presencia de de otro tipo histológico en la arquitectura tumoral (Tabla 4.1 y 4.2). El grupo de trabajo está conformado por 70 pacientes operadas y tratadas en la provincia de Mendoza que presentan distintos factores pronóstico y predictivos.

### **5.2.1. Análisis de metilación de carcinomas ductales invasores**

A partir de los datos de MS-MLPA se realizó un análisis descriptivo de frecuencias de metilación de cada región lo que revela que la región más frecuentemente metilada es WT1 (-216). Esta región está metilada en 67 de los 70 carcinomas ductales invasores, lo que representa un 95,7% de los mismos (CI95%:88,1-98,5) de los CDIs. Otras regiones que

presentan frecuente metilación son RASSF1 (-136) en el 71,4% (CI95%:60-80,7) y RASSF1 (+46) en el 65,7% y PAX5 (-120) en el 65,7% (CI95%:54-75,7) de los CDIs (Figura 5.19).

El análisis de las alteraciones epigenéticas cualitativas muestra que los CDIs presentan al menos 2 regiones metiladas (correspondientes a 2 genes) y el máximo número de regiones metiladas detectado es 18 (correspondiente a 14 genes). La media de los genes afectados es de 7,87.



**Figura 5.19: Perfil de metilación de los carcinomas ductales invasores puros.** A la izquierda se observa la región estudiada, a la derecha el número de veces que se encuentra metilada, el porcentaje que representa.

### **5.2.2. Alteraciones epigenéticas de carcinomas ductales con capacidad de invadir ganglios linfáticos**

Entre los CDIs estudiados, no todos habían adquirido la capacidad de invadir los ganglios linfáticos, al menos al momento de la cirugía. Determinar cuáles son las diferencias epigenéticas entre tumores con y sin esta capacidad permite pronosticar con mayor exactitud la evolución de la paciente. En el año 2005 Shinozaki y colaboradores demostraron que tumores de pacientes con metástasis macroscópica en los ganglios centinela presentaban diferencias epigenéticas respecto de los tumores de pacientes sin ganglios afectados [202].

La comparación de la información del perfil de metilación de tumores de pacientes con ganglios positivos y pacientes con ganglios negativos, realizada en esta tesis revela importantes diferencias epigenéticas que podrían contribuir al mejor entendimiento del proceso de invasión ganglionar como así también a la estadificación del cáncer de mama.

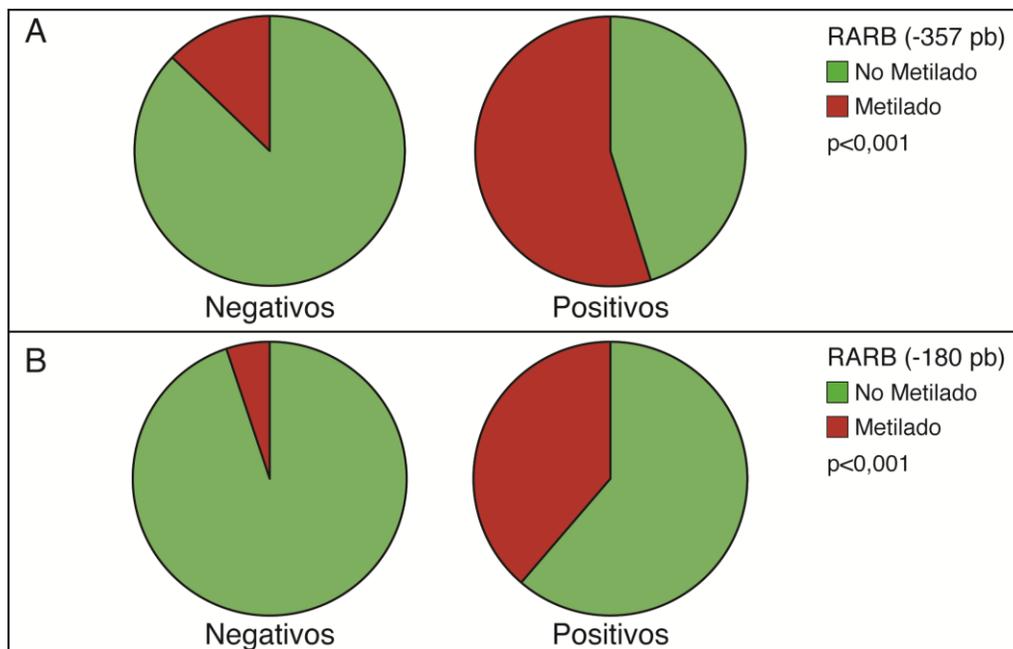
Nuestros datos muestran que la metilación de la región RARB (-357) es observada en solo en 5 de 39 CDI de pacientes con ganglios negativos (12,8%; CI95%:5,6-26,7) y en 17 de 31 CDI de pacientes con ganglios positivos (54,83%; CI95%:37,7-70,8). Esto muestra una asociación sustancial ( $\Phi=0,450$ ) entre la metilación de esta región y la capacidad de metástasis ganglionar ( $p<0,001$ ). Otra región del gen RARB (-180) presenta también metilación en tumores de pacientes con enfermedad en los ganglios linfáticos ( $p<0,001$ ). Estas observaciones sugieren que la metilación del gen RARB es un evento importante en la invasión ganglionar (Figura 5.20 y Tabla 5.7)

En el análisis de concurrencia y divergencia de la metilación se observa que la metilación de p73 (+258) presenta alta concurrencia con la metilación de RARB (-357) (Tabla 5.3). Los tumores que presentan la metilación concurrente de estas dos regiones se encuentran asociados con tumores de pacientes que presentan metástasis en ganglios linfáticos. La metilación de ambas regiones solo es observada en 5 de 25 tumores de pacientes con ganglios negativos, mientras que 13 de 21 tumores de pacientes con ganglios positivos presentan metilación concurrente ( $p<0,001$ ) (Tabla 5.7).

	RARB (-357)		RARB (-180)		RARB + p73	
	No Met	Met	No Met	Met	No Met	Met
Ganglios Negativos	34	5	37	2	20	5
Ganglios Positivos	14	17	19	12	8	13
Fuerza de asociación	<i>Phi</i> = 0,450		<i>Phi</i> = 0,417		<i>Phi</i> = 0,428	
Significancia	p < 0,001		p < 0,001		p = 0,004	

**Tabla 5.7: Análisis de asociación entre alteraciones epigenéticas en tumores de pacientes con y sin metástasis en ganglios linfáticos.** La metilación concurrente mostrada es entre p73 (+258) y RARB (-357)

Es importante destacar que la metilación de la región THBS1 (-791) que se encuentra altamente metilada en los PMG, no presenta diferencias entre DCI de pacientes con ganglios positivos o negativos. Esto sugiere que la metilación de esta región podría ser un evento propio de la evolución tumoral luego de su colonización del tejido ganglionar.



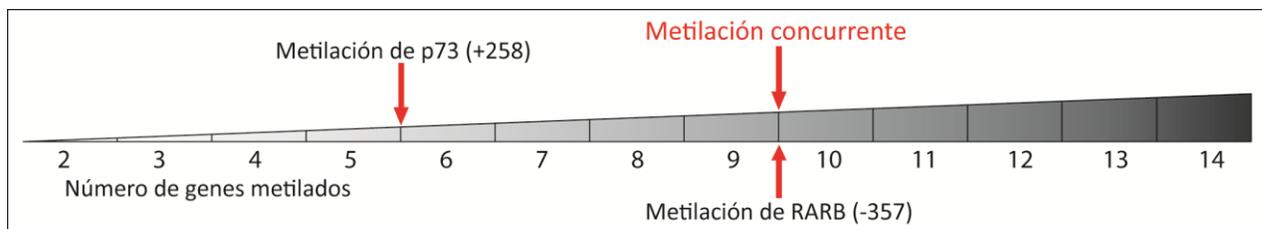
**Figura 5.20: Diagramas de torta de la distribución de las alteraciones epigenéticas de carcinomas ductales invasores que invaden ganglios linfáticos.** A- Metilación de la región -357 del gen RARB. B- Metilación de la región -180 del gen RARB.

Otra variable epigenética que distingue tumores de pacientes con ganglios positivos de tumores de pacientes con ganglios negativos es el número de genes aberrantemente

metilados (NGM). El análisis de correlación entre el NGM y el estado de los ganglios linfáticos revela una correlación (aunque débil) entre estos factores ( $Rho=0,257$ ;  $p=0,032$ ).

Por otro lado se observa que entre el NGM y la metilación concurrente de p73 (+258) y RARB (-357) hay una fuerte correlación ( $Rho=0,688$ ;  $p<0,001$ ). A mayor NGM, se observa mayor frecuencia de metilación de RARB (-357) (Figura 5.21). Este dato sugiere que la metilación concurrente sería un evento que ocurre en la carcinogénesis cuando el epigenoma del tumor ya ha adquirido una gran cantidad de regiones aberrantemente metiladas. Por ello se sugiere que el escape de las células tumorales a los ganglios linfáticos se relacionaría más bien con una alteración cualitativa (metilación de RARB) más que una alteración cuantitativa (mayor NGM), es decir sugiere que la relación observada entre el NGM y la metástasis en ganglios es por influencia de la metilación del gen RARB.

El análisis de asociación entre el NGM y la metilación de las regiones analizadas revela que p73 (+258) se metila cuando la cantidad de genes metilados es mayor a 5 ( $Phi=0,333$ ;  $p=0,005$ ) y RARB (-357) cuando la cantidad de genes metilados es mayor a 9 ( $Phi=0,452$ ;  $p<0,001$ ). La metilación concurrente es observada cuando hay más de 9 genes metilados ( $Phi=0,724$ ;  $p=0,001$ ). Si se supone que el NGM en términos generales es una variable dependiente del tiempo, estos valores de asociación estarían dando indicios del orden en el que ocurren la metilación de RARB y p73. Suponiendo que bajos valores de NGM ocurren anteriormente que altos valores de NGM, se puede inferir que la metilación de p73 es un evento que ocurre antes que la metilación de RARB en la evolución de los CDIs.



**Figura 5.21: Diagrama que representa la asociación de la metilación de p73 y RARB con el número de genes metilados.** Se representan la cantidad de genes metilados detectada en los carcinomas ductales invasores y se señala la cantidad de genes en la que p73 y RARB presentan cambios del estado de metilación estadísticamente significativos.

Estos datos sugieren que el factor epigenético que distingue tumores de pacientes con ganglios linfáticos afectados tiene como protagonista la metilación del gen RARB, más que la cantidad de genes alterados.

### **5.2.3. Alteraciones epigenéticas de carcinomas ductales con distintos grados tumorales**

El grado tumoral es de gran importancia para el pronóstico y la elección del tratamiento. Esta graduación de los tumores está determinada por el índice mitótico, el grado de diferenciación y la relación entre los núcleos y los citoplasmas de las células tumorales. Esto permite tener un panorama completo del comportamiento del tumor y establecer grados de agresividad. Uno de los principales problemas de este método de graduación es la subjetividad del observador a la hora de puntuar cada uno de los componentes del sistema. Se ha demostrado que esta subjetividad lleva a que entre el 30 al 60% de los carcinomas mamarios sean clasificados como grado tumoral 2 [62]. Esta clasificación intermedia no es informativa para la elección de tratamiento por parte del médico y las decisiones clínicas deben basarse en otros factores.

El análisis de los CDIs con distintos grados tumorales incluidos en este trabajo, revela marcadas diferencias epigenéticas, principalmente entre tumores con grado 1 y tumores con grado 3.

El análisis de la relación entre el grado tumoral y las alteraciones epigenéticas cualitativas revela una correlación entre el aumento del grado tumoral y el aumento del NGM ( $Rho=0,4$ ;  $p=0,001$ ). Los carcinomas ductales invasores con más de 9 genes metilados se asocian con un mayor grado tumoral ( $V$  de Cramer= $0,482$ ;  $p<0,001$ ).

En el análisis de la relación del grado tumoral y las alteraciones epigenéticas cualitativas se observa que los tumores con mayor grado presentan una asociación sustancial con la metilación de RARB (-357) y GSTP1 (+488) y una fuerte asociación con la metilación de la región p73 (+258). La metilación concurrente entre p73 y RARB presenta una asociación fuerte con tumores de alto grado tumoral (Tabla 5.8).

Gen (Región)	Grado tumoral 1		Grado tumoral 2		Grado tumoral 3		Chi Cuadrado	V de Cramer	Valor de p
	No Met	Met	No Met	Met	No Met	Met			
p73 (+258)	11	1	16	14	5	23	19,668	0,530	<0,001
RARB (-357)	12	0	21	9	15	13	8,452	0,347	0,015
GSTP1 (+488)	12	0	28	2	20	8	8,089	0,340	0,018
RARB + p73	11	0	13	6	4	12	16,169	0,593	<0,001

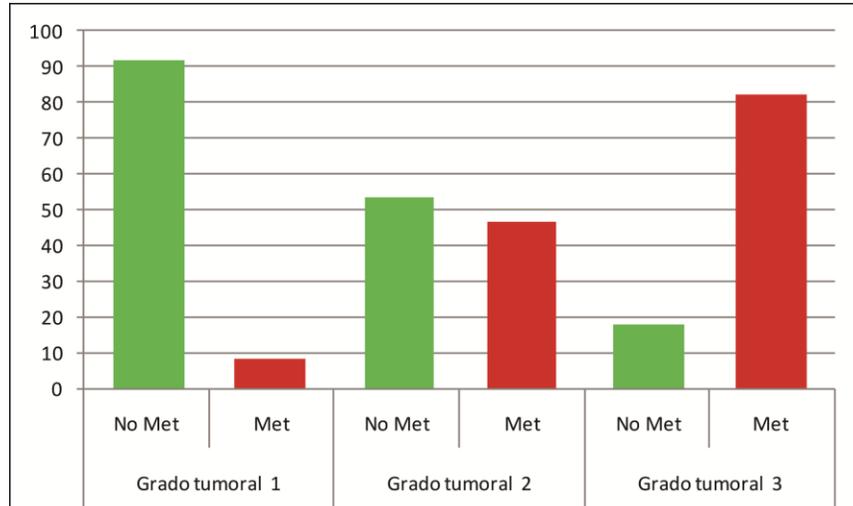
**Tabla 5.8: Comparación entre perfiles de metilación con distintos grados tumorales.** Se representan las tres regiones diferencialmente metiladas y la metilación concurrente de RARB (-357) y p73 (+258).

Es llamativo el hecho que los tumores con grado tumoral 2 presentan una distribución de la metilación y no metilación de p73 (+258) muy similar (Figura 5.22). Esta observación es consistente con la idea de que en algunos casos los tumores grado 2 se encontrarían mal clasificados. Para estimar la relación de la metilación de p73 con el grado tumoral alto y bajo, se quitan del análisis los tumores con grado 2. Esto revela diferencias epigenéticas muy marcadas entre tumores grado 1 y grado 3 (Tabla 5.9). Tumores con grado 3 presentan una mayor cantidad de genes aberrantemente metilados, mayor porcentaje de metilación de p73, RARB y GSTP1. A su vez, al analizar la metilación concurrente de p73 junto con RARB, se detectó que es un evento muy fuertemente asociado con tumores de grado 3 ( $p < 0,001$ ), y que no hay metilación concurrentes de estos genes en tumores grado 1 (Tabla 5.9).

Esta diferencia entre tumores grado 1 y 3 podría contribuir a la decisión del tratamiento cuando es dudosa. Por ejemplo, tumores grado 2 con p73 no metilado podrían comportarse como grado tumoral 1 y tumores grado 2 con p73 metilado, se comportarían como grado 3.

Gen	Región	Grado tumoral 1		Grado tumoral 3		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
		No Met	Met	No Met	Met			
p73 +258		11	1	5	14	19,067	0,690	<0,001
RARB -357		12	0	15	13	8,254	0,454	0,004
RARB -180		12	0	19	9	4,977	0,353	0,026
GSTP1 +488		12	0	20	8	4,286	0,327	0,038
RARB + p73		11	0	4	12	14,850	0,742	<0,001

**Tabla 5.9: Comparación entre el perfil de metilación de carcinomas con grado tumoral 1 y 3.** Se muestran asociaciones entre la metilación de cuatro regiones y el grado tumoral 1 y 3. Tumores de grado 1 presentan menor frecuencia de metilación de las cuatro regiones y ninguno de estos tumores presenta metilación concurrente de RARB (-357) y p73 (+258).



**Figura 5.22: Distribución de la metilación de p73 en distintos grados tumorales.** Diagrama de barras que representa el porcentaje de tumores con la metilación (barras rojas) o la no metilación (barras verdes) de p73.

Aparentemente la metilación de p73 (+258) y RARB (-357) está relacionada con una mayor agresividad de los tumores ya que además de su relación con el grado tumoral se observa una fuerte asociación con la metástasis en ganglios linfáticos.

#### 5.2.4. Relaciones entre el tamaño tumoral y las alteraciones epigenéticas.

Se observa que los carcinomas ductales con mayor tamaño presentan correlación con la metilación de las regiones RARB (-357) y THBS1 (-791) ( $Rho=0,260$ ;  $p=0,04$  y  $Rho=0,321$ ;  $p=0,007$ ; respectivamente). Tumores con la metilación concurrente de RARB, p73 y THBS1 presentan mayor tamaño ( $Rho=0,432$ ;  $p=0,008$ ).

La correlación entre el tamaño tumoral y el número de genes metilados revela que tumores de mayor tamaño presentan más de 7 genes metilados ( $Rho=0,240$ ;  $p=0,040$ ).

#### 5.2.5. Diferencias epigenéticas entre tumores con distinto índice pronóstico de Nottingham

Los índices pronósticos como el de Nottingham disminuyen el impacto del error acumulado en la evaluación del grado tumoral. Este índice validado considera tres variables de medición independientes: el estado de ganglios linfáticos, el tamaño tumoral y el grado

tumoral. Este índice clasifica a las pacientes en tres categorías de pronóstico: bueno, moderado y malo.

La comparación de las alteraciones epigenéticas de carcinomas ductales invasores de pacientes con buen, moderado y mal pronóstico revela diferencias. La metilación de RARB, p73 y THBS1 correlacionan con el aumento del índice pronóstico de Nottingham (Tabla 5.10). Los tumores que presentan la metilación concurrente de RARB y p73 presentan la mayor correlación con este índice pronóstico ( $Rho=0,544$ ;  $p<0,001$ ).

		RARB (-357)	p73 (+258)	RARB (-180)	THBS1 (-791)	IGSF4 (-56)
Índice Pronóstico de Nottingham	<i>Rho</i> de Spearman	0,435	0,410	0,323	0,320	0,284
	Significancia (p)	<0,001	<0,001	0,006	0,007	0,017

**Tabla 5.10: Correlación entre el valor del índice de pronóstico de Nottingham y la metilación aberrante.** De izquierda a derecha se organizan las regiones en orden descendente de correlación.

Cuando se comparan los tres grupos generados por el índice pronóstico de Nottingham se observan alteraciones epigenéticas relacionadas con cada grupo. El gen p15 se encuentra exclusivamente metilado en los tumores clasificados como de riesgo moderado, no se observa metilación de este gen en tumores con buen pronóstico o con mal pronóstico ( $p<0,001$ ). La misma situación se observa con la metilación de la región -180 del gen RARB ( $p=0,044$ ) y con la región +488 del gen GSTP1 ( $p=0,014$ ), mientras que la mayoría de los tumores de pacientes clasificadas con mal pronóstico presentan la metilación de la región +258 del gen p73 ( $p=0,010$ ). Solo 3 de 25 tumores de bajo riesgo presentan la metilación de la región -357 del gen RARB ( $p=0,001$ ). La metilación del gen THBS1 es otro evento observado en tumores con mal pronóstico ( $p=0,015$ ). Por lo tanto la metilación concurrente de RARB, p73 y THBS1 es un evento observado en tumores de mal pronóstico según la clasificación del índice de Nottingham (Tabla 5.11).

Estas observaciones son el producto de la relación entre la metilación aberrante de estos genes y los distintos factores que son tenidos en cuenta para la estimación del riesgo mediante el índice pronóstico de Nottingham.

Además se observa una correlación entre el NGM y el NPI ( $Rho=0,410$ ;  $p<0,001$ ). Los tumores que presentan 9 o más genes metilados son clasificados con peor pronóstico que aquellos que no han adquirido la metilación de 9 genes ( $Rho=0,454$ ;  $p<0,001$ ). Solo 3 de 11 pacientes clasificadas en el grupo de mal pronóstico tienen menos de 9 genes metilados en sus tumores. Hay correlación positiva entre el número de regiones metiladas y el NPI ( $R$  de Pearson= $0,385$ ;  $p=0,001$ ). El análisis de regresión lineal entre estas variables ( $R^2=0,135$ ) indica que cada región metilada aumenta un 13,5% el valor de NPI.

Gen (Región)	Índice Pronóstico de Nottingham						Chi Cuadrado	V de Cramer	Valor de p
	Bueno		moderado		Malo				
	No Met	Met	No Met	Met	No Met	Met			
p15 (+473)	25	0	20	14	11	0	18,529	0,514	<0,001
RARB (-357)	22	3	23	11	3	8	13,098	0,433	0,001
p73 (+258)	17	8	13	21	2	9	9,130	0,361	0,010
GSTP1 (+488)	25	0	25	9	10	1	8,532	0,349	0,014
THBS1 (-791)	24	1	31	3	7	4	8,347	0,345	0,015
RARB (-180)	24	1	24	10	8	3	6,246	0,299	0,044
RARB+p73	17	3	9	7	2	8	12,045	0,512	0,002

**Tabla 5.11: Comparación entre el perfil de metilación de tumores con buen, moderado y mal pronóstico según el índice de Nottingham.** Se representan las regiones diferencialmente metiladas, la metilación concurrente de RARB (-357) y p73 (+258).

### 5.2.6. Tumores con alta tasa de proliferación presentan diferencias en las alteraciones epigenéticas

La proliferación de las células tumorales es otro factor responsable de las diferencias en la supervivencia y recaídas de las pacientes con esta enfermedad oncológica. La determinación de la expresión de PCNA y Ki-67 refleja el grado de proliferación tumoral. Se considera que los tumores que presentan PCNA mayor a 40% o Ki-67 mayor a 20% tienen alta proliferación.

La comparación de los perfiles de metilación de tumores con alta y baja tasa de proliferación revela que existen también diferencias a nivel epigenético. La tasa de proliferación tumoral se correlaciona con el NGM ( $Rho=0,459$ ;  $p<0,001$ ): tumores con alta proliferación tienen 5 o más genes aberrantemente metilados ( $Phi=0,555$ ;  $p<0,001$ ). Al analizar la metilación de las regiones, se observa que tumores con alta proliferación presentan la metilación de CDH13 (+186) y p73 (+258) e incluso cuando ambos genes se encuentran metilados en un mismo tumor, su proliferación es alta (Tabla 5.12).

La asociación observada entre p73 y tumores con alta proliferación es otra evidencia junto a las anteriormente mostradas de su relación con factores de mal pronóstico en cáncer de mama. Esta región (+258), junto con las regiones presentes en el gen RARB (-357) y en menor medida regiones en los genes GSTP1 (+488), THBS1 (-791) y RARB (-180) podrían ser potenciales marcadores epigenéticos que pudieran contribuir con el pronóstico de las pacientes con carcinomas ductales invasores.

Gen (Región)	Baja proliferación		Alta proliferación		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
	No Met	Met	No Met	Met			
p73 (+258)	15	3	17	35	13,818	0,444	<0,001
CDH13 (+186)	17	1	31	21	7,527	0,328	0,006
p73 + CDH13	14	0	11	15	12,923	0,568	<0,001

**Tabla 5.12: Comparación entre el perfil de metilación de tumores con baja y alta proliferación.** Se presentan las dos regiones diferencialmente metiladas, la metilación concurrente de CDH13 (+186) y p73 (+258).

### 5.2.7. Relaciones entre las alteraciones epigenéticas y los factores predictivos del cáncer de mama

La evaluación de los factores que permiten predecir la respuesta a determinados tratamientos es muy importante para la correcta decisión clínica de los procedimientos más adecuados y personalizados para cada paciente. La determinación de las firmas genéticas de los tumores ha demostrado una gran utilidad para decidir la utilización o no de quimioterapia en determinadas pacientes. Las diferencias en los perfiles de metilación de los carcinomas ductales pueden estar relacionadas con diferencias en los factores predictivos de tratamientos.

#### - Relación entre alteraciones epigenética y la expresión del receptor de estrógeno $\alpha$

El análisis de la relación entre el NGM y la expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$  revela que no hay correlación entre estos factores. Para analizar la posible relación del ER con la metilación de cada una de las regiones, los datos obtenidos por inmunohistoquímica se organizan de dos maneras. Por un lado se dicotomizan de acuerdo a las guías para la utilización de terapia hormonal en expresión negativa (expresión menor al 1%) y en

positivo (expresión mayor o igual al 1%) (Tabla 5.13). En un segundo análisis, se considera el nivel de expresión del receptor en nivel bajo (expresión menor al 20%), nivel moderado (entre el 20% y 40%) y nivel alto (expresión mayor al 40%) (Tabla 5.14).

Gen (Región)	ER Negativo		ER Positivo		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
	No Met	Met	No Met	Met			
RASSF1(+46)	19	17	5	29	11,249	0,401	0,001
THBS1(-791)	28	8	34	0	8,530	-0,349	0,003
PAX6(-52)	26	10	13	21	8,186	0,342	0,004
IGSF4(-56)	17	19	27	7	7,760	-0,333	0,005
p73(+258)	11	25	21	13	6,863	-0,313	0,009
RASSF1(-136)	15	21	5	29	6,228	0,298	0,013
ESR1(+244)	20	16	28	6	5,826	-0,289	0,016
RARB (-357)	20	16	28	6	5,826	-0,289	0,016
CD44(+28)	28	8	33	1	5,802	-0,272	0,023
MGMT(-463)	25	11	31	3	5,161	-0,272	0,023
STK11(+416)	32	4	34	0	4,007	-0,239	0,045

**Tabla 5.13: Regiones diferencialmente metiladas en relación a la expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$ .** ER significa receptor de estrógeno  $\alpha$ .

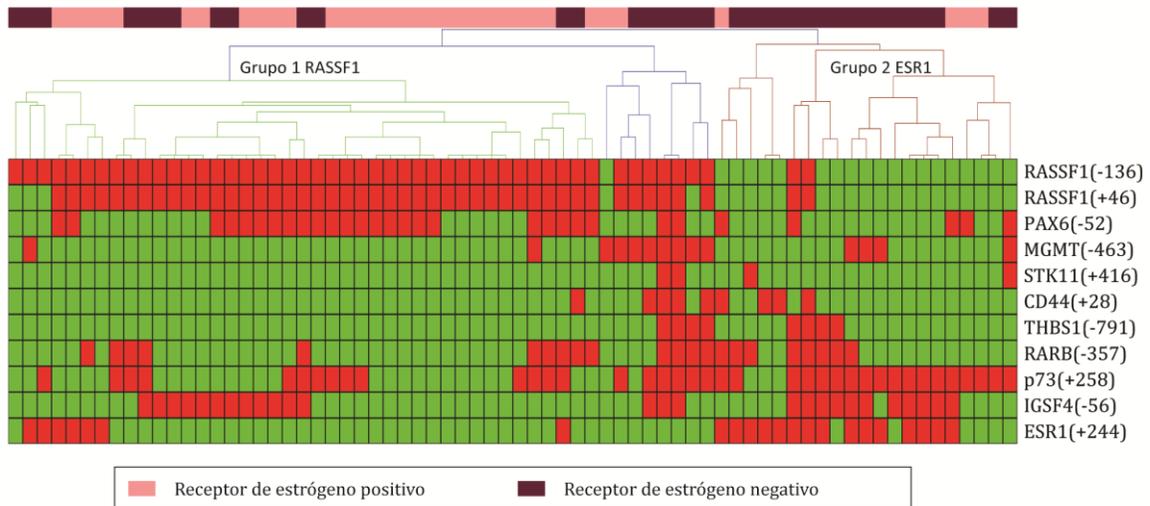
En el análisis de la metilación aberrante entre tumores clasificados como ER positivos y negativos se observa una metilación diferencial de 11 de las 49 regiones. La relación de la metilación de estas regiones puede clasificarse en dos grupos, un grupo contiene regiones que se asocian de manera positiva con la expresión de ER y el otro de manera negativa.

En el primer grupo con asociación positiva se encuentra la metilación del gen PAX6 y de dos regiones dentro del gen RASSF1 (-136 y +46). Estas regiones se encuentran metiladas cuando los tumores expresan el receptor de estrógeno. El análisis de metilación concurrente y divergente muestra que estas tres regiones presentan metilación concurrente y metilación divergente con las regiones del otro grupo.

En el segundo grupo con asociación negativa se encuentra la metilación de 8 regiones: THBS1 (-791), IGSF4 (-56), p73 (+258), ESR1 (+244), RARB (-357), CD44 (+28), MGMT (-493) y SKT11 (+416). Estas regiones se encuentran con mayor frecuencia metiladas en tumores que no expresan el receptor de estrógeno.

La información epigenética de estas 11 regiones divide a los tumores de acuerdo a expresión del receptor de estrógeno  $\alpha$  (Figura 5.23). El análisis de clústeres jerárquicos

realizado con estas regiones, muestra tres grupos principales. El primero contiene tumores que presentan mayor frecuencia de metilación de RASSF1 y menor frecuencia de metilación de ESR1. En este grupo se observa a su vez mayor probabilidad de que el tumor analizado presente expresión del receptor de estrógeno. El 68% (28/41) de estos tumores expresan el receptor de estrógeno. El segundo grupo contiene mayor frecuencia de metilación de ESR1 y p73 y el 81% de los tumores no expresan el receptor de estrógeno (17/21). En la figura 5.23 se observa un grupo intermedio que presenta la metilación de genes pertenecientes al primer y segundo grupo. En este grupo se observa mayor frecuencia de tumores que no expresan ER (6/8). El análisis estadístico revela una diferencia significativa entre los grupos (Coeficiente V de Cramer = 0,470 y  $p < 0,001$ ).



**Figura 5.23: Generación de clústeres jerárquicos de perfiles de metilación de tumores con distinta expresión del receptor de estrógeno.** Se generan 3 clústeres con los 70 perfiles de metilación de carcinomas ductales invasores. El primer clúster (árbol verde) incluye tumores con alta frecuencia de metilación de RASSF1 y PAX6. El segundo clúster o intergrupo (árbol azul) incluye tumores que presentan tanto alta frecuencia de metilación de RASSF1 como de p73 y RARB. El tercer clúster (árbol rojo) incluye tumores con mayor frecuencia de metilación de ESR1 y p73. La barra superior representa el estado de expresión del receptor de estrógeno, positivo (barra rosa) o negativo (barra bordó). El análisis es generado utilizando las distancias estadísticas de Manhattan. Esta distribución de las muestras en los tres clústeres es confirmada mediante el análisis Bootstrap (más de 70% de soporte).

La relación entre la metilación de las regiones analizadas muestra que la metilación de los genes involucrados presenta mayor fuerza de asociación con los niveles de expresión del receptor (Tabla 5.14).

Llamativamente la metilación del gen ESR1 se encuentra asociada de manera débil con la expresión del receptor de estrógeno (Tabla 5.13). Seis de 22 tumores que presentan ESR1 metilado mantienen la expresión de la proteína. Esta observación concuerda con lo detectado en el caso del fibroadenoma gigante, donde la metilación del gen ESR1 se asocia con una disminución de la expresión del ER (ver punto 5.1.2.2.). Una explicación a esta observación es que el análisis MS-MLPA realizado no discrimina la metilación monoalélica de la bialélica. Por lo tanto, un tumor con un solo alelo metilado sería detectado por MS-MLPA, pero mantendría la expresión de ER detectable por inmunohistoquímica. Por otro lado, no debe desconocerse que los tumores analizados son policlonales y dentro de un mismo tumor, algunas células pueden presentar la metilación del gen ESR1 y otras no. Este fenómeno puede reflejarse en una disminución en la evaluación mediante el score de Allred (negativa, débil, moderada o fuerte), por ejemplo en el cálculo de la proporción. Finalmente otra explicación al fenómeno observado involucra la región del gen ESR1 analizada por MS-MLPA (+244). No existe evidencia previa de si la metilación de esta sola región es suficiente para provocar el silenciamiento completo del gen, o si la metilación de otras islas es requerida para que esto ocurra.

Gen (Región)	ER Negativo		ER Positivo						Chi Cuadrado	V de Cramer	Valor de p
	No Met	Met	Débil		Moderado		Alto				
	No Met	Met	No Met	Met	No Met	Met	No Met	Met			
RASSF1(+46)	17	10	3	10	3	11	1	15	17,189	0,496	0,001
ESR1(+244)	12	15	12	1	10	4	14	2	13,405	0,438	0,004
PAX6(-52)	22	5	5	8	4	10	8	8	13,226	0,435	0,004
RASSF1(-136)	14	13	2	11	3	11	1	15	12,534	0,423	0,006
STK11(+416)	26	1	10	3	14	0	16	0	9,295	0,364	0,026
RARB (-180)	17	10	12	1	12	2	15	1	8,305	0,344	0,040

**Tabla 5.14: Regiones diferencialmente metiladas en relación con el nivel de expresión del receptor de estrógeno.** Se resumen las regiones que presentan metilación diferencial entre los niveles de expresión del receptor de estrógeno medido por el score de Allred. ER significa receptor de estrógeno  $\alpha$ .

- **Relación entre alteraciones epigenéticas y la expresión del receptor de progesterona**

El otro factor evaluado para predecir la respuesta a hormonoterapia es el receptor de progesterona. El análisis de la relación entre las alteraciones epigenéticas y la expresión del receptor de progesterona revela una correlación negativa débil entre la expresión de este receptor y el número de genes metilados ( $Rho = -0,219$ ;  $p = 0,015$ ). La metilación de los genes

RARB y p73 se presentan como el evento epigenético más relacionado con la ausencia de expresión del receptor de progesterona. Por el contrario, la metilación del gen PAX6 es un evento asociado a tumores que expresan el receptor de progesterona (Tabla 5.15).

Gen (Región)	PR Negativo		PR Positivo		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
	No Met	Met	No Met	Met			
RARB(-357)	16	17	32	5	11,688	-0,409	0,001
p73(+258)	9	24	23	14	8,556	-0,350	0,003
PAX6(-52)	24	9	15	22	7,324	0,323	0,007
RARB(-180)	22	11	34	3	6,937	-0,315	0,008
CHFR(-154)	28	5	37	0	6,037	-0,294	0,014
ESR1(+244)	18	15	30	7	5,699	-0,285	0,017
FHIT(+255)	29	4	37	0	4,757	-0,261	0,029
RARB + p73	6	14	22	4	14,157	-0,555	<0,001

**Tabla 5.15: Regiones diferencialmente metiladas en relación a la expresión del receptor de progesterona.** PR significa receptor de progesterona.

Otra forma de organizar los datos de expresión del receptor de progesterona es evaluando los niveles de expresión. Este análisis revela mayor diferencia en la expresión del receptor de progesterona entre tumores que presentan RARB y p73 metilados y tumores que presentan ambos genes no metilados (Tabla 5.16)

Gen (Región)	PR Negativo		PR Positivo						Chi Cuadrado	V de Cramer	Valor de p
	No Met	Met	Débil		Moderado		Alto				
	No Met	Met	No Met	Met	No Met	Met	No Met	Met			
RARB(-357)	16	17	8	3	14	2	10	0	13,510	0,439	0,004
p73(+258)	9	24	6	5	11	5	6	4	9,112	0,361	0,028
RARB(-180)	22	11	11	0	13	3	10	0	8,932	0,357	0,030
PAX6(-52)	24	9	6	5	6	10	3	7	8,709	0,353	0,033
ESR1(+244)	18	15	8	3	12	4	10	0	7,991	0,338	0,046
RARB+p73	6	14	6	3	10	1	6	0	16,153	0,593	0,001

**Tabla 5.14: Regiones diferencialmente metiladas en relación con el nivel de expresión del receptor de progesterona.** Se resumen las regiones que presentan metilación diferencial entre los niveles de expresión del receptor de progesterona medido por el score de Allred. PR: Receptor de Progesterona.

**- Relación entre alteraciones epigenéticas y la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (Her2/neu)**

Los anticuerpos monoclonales que inhiben vías de crecimiento de células tumorales son una herramienta para el tratamiento de muchos tipos de cáncer. Un tipo de cáncer de mama presenta la hiper-activación de la vía de señal regulada por el receptor HER2. La hiper-

activación de la vía se produce por una sobre-expresión del receptor. Estos tumores muestran un comportamiento más agresivo que los que no lo sobre-expresan. Este receptor ha sido blanco del diseño y generación de un anticuerpo monoclonal llamado trastuzumab. Además de presentarse como una enfermedad con diferencias respecto de los tumores que no lo expresan, la determinación de HER2 es fundamental para predecir la respuesta al tratamiento con los anticuerpos. La utilización de este anticuerpo ha mostrado beneficios en la supervivencia de las pacientes.

Los análisis de los patrones de metilación aberrante de los tumores que expresan HER2, muestran diferencias respecto de los que no lo expresan. Se realizan cálculos del riesgo para un intervalo de confianza del 95%. De este modo se busca relativizar los resultados de Chi cuadrado a la población real de tumores HER2 positivos (Tabla 5.17).

La metilación de CDH13, p73 y ESR1 está presente con mayor frecuencia en tumores que expresan HER2. Por el contrario la metilación de RASSF1 está más frecuentemente presente en tumores HER2 negativos. Cuando p73 (+258) y CDH13 (+186) se encuentran concurrentemente metilados se observa una probabilidad 21 veces mayor (IC95%:2,2-197).

Gen (Región)	HER2 Negativo		HER2 Positivo		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p	OR (IC = 95%)
	No Met	Met	No Met	Met				
CDH13(+186)	45	15	3	7	8,054	0,339	0,005	7 (1,6 – 30,5)
ESR1(+244)	45	15	3	7	8,054	0,339	0,005	7 (1,6 – 30,5)
RASSF1(+46)	17	43	7	3	6,605	-0,307	0,010	<sup>1</sup> /5,9 ( <sup>1</sup> /25,5 – <sup>1</sup> /1,3)
p73(+258)	31	29	1	9	5,999	0,293	0,014	9,6 (1,14 – 80,7)
p73+CDH13	24	8	1	7	10,667	0,516	0,001	21 (2,2 – 197)

**Tabla 5.17: Regiones diferencialmente metiladas en relación a la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico.** Los valores del riesgo para RASSF1 están expresados como la inversa del riesgo debido a que en ese caso la metilación se asocia con el rasgo negativo. OR: odd ratio; IC: intervalo de confianza = 95%

- **Relaciones entre las alteraciones epigenéticas y la clasificación molecular del cáncer de mama**

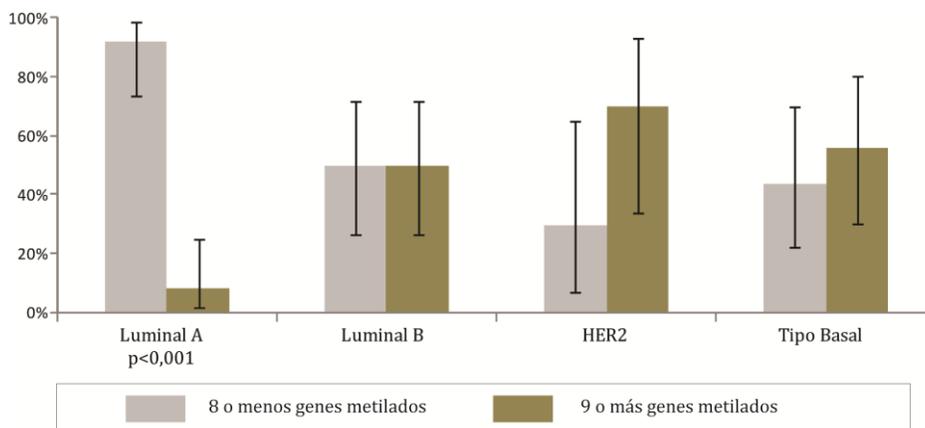
En los últimos 10 años el aporte de la tecnología de microarreglos ha permitido identificar subtipos de la enfermedad que presentan diferentes pronóstico y respuesta a tratamientos. Estos subtipos moleculares constituyen la llamada “clasificación molecular del cáncer de

mama”. Debido a la complejidad de la tecnología para identificarlos se realizan análisis para identificar alteraciones epigenéticas que aporten datos que colaboren con esta clasificación.

El análisis de las alteraciones epigenéticas cuantitativas muestra que los tumores luminales A presentan 8 o menos genes metilados. El resto de los subtipos moleculares del cáncer de mama no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto del número de genes metilados (Tabla 5.18 y Figura 5.24). Los tumores clasificados como luminales A son los que mejor pronóstico presentan entre estos subtipos, por lo tanto la baja cantidad de genes metilados sugiere una relación con el pronóstico de la enfermedad.

Subtipo tumoral	8 o menos genes metilados (%)	9 o más genes metilados (%)	Chi Cuadrado	Valor de p
Luminal A	22 (91,7)	2 (8,3)	16,667	<0,001
Luminal B	10 (50)	10 (50)	0,000	n.s.
HER2	3 (30)	7 (70)	1,600	n.s.
Tipo Basal	7 (43,8)	9 (56,3)	0,250	n.s.

**Tabla 5.18: Número de genes afectados en los subtipos tumorales.** Se presenta el número de tumores que presentan más o menos de 9 genes metilados (n.s.: no significativo).



**Figura 5.24: Número de genes afectados en los subtipos tumorales.** Se representa el porcentaje de tumores con máximo 8 o mínimo 9 genes afectados.

El análisis de las alteraciones cualitativas muestra diferencias en los porcentajes de metilación de distintas regiones entre los subtipos moleculares. Por un lado se observa que la metilación de las regiones PAX6 (-52), RASSF1 (+46) y RASSF1 (-136) son más frecuentes en tumores del tipo Luminal B, la metilación de ESR1 (+244) y p73 (+258) es frecuente en

tumores HER2, mientras que la metilación de p15 (+473), RARB (-357) y RARB (-180) es más frecuente en tumores Tipo Basal (Tabla 5.19).

Esta metilación diferencial de las regiones analizadas indica nuevamente el comportamiento opuesto en los eventos de metilación de genes del grupo de RASSF1 y genes del grupo de ESR1 o p73 y sugiere que los tumores con la metilación de los genes del primer grupo pueden presentar mejor pronóstico (luminales) respecto de los tumores que presentan la metilación de los genes del segundo grupo (no luminales).

Gen (Región)	Luminal A (n=24) % Met	Luminal B (n=20) % Met	HER2 (n=10) % Met	Tipo Basal (n=16) % Met	Chi Cuadrado	V de Cramer	Valor de p
RASSF1 (+46)	66,7	95	30	50	15,038	0,463	0,002
p73(+258)	33,3	45	90	75	12,843	0,428	0,005
RARB(-357)	8,3	30	50	56	12,133	0,416	0,007
ESR1(+244)	16	20	70	43,8	11,669	0,408	0,009
RASSF1(-136)	70	95	40	62	10,914	0,395	0,012
RARB(-180)	4,2	15	30	43,8	10,339	0,384	0,016
p15(+473)	0	25	30	37	10,000	0,378	0,019
PAX6(-52)	50	65	30	18	8,851	0,356	0,031

**Tabla 5.19: Regiones diferencialmente metiladas en relación a la clasificación molecular.**

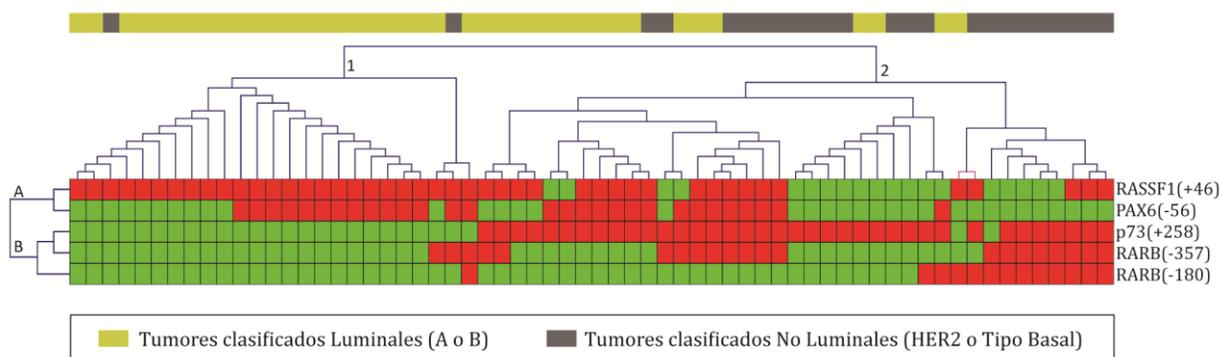
Este resultado sugiere que estos 4 subtipos tumorales clínicamente heterogéneos presentan diferencias epigenéticas adquiridas en el proceso tumorigénico. Por otro lado, las regiones involucradas tienen potencial aplicación en la discriminación del subtipo molecular.

Se observan importantes diferencias epigenéticas entre tumores clasificados como luminales (A o B) y tumores clasificados como no luminales (HER2 o tipo basal). El valor positivo del coeficiente *Phi* indica que la metilación de los genes RASSF1 y PAX6 se asocia con los tumores clasificados como luminales, mientras que el valor negativo de *Phi* indica que la metilación de los genes p73, p15 y RARB se asocia con tumores no luminales (Tabla 5.20). La metilación concurrente de los genes p73 y RARB es un evento que se asocia fuertemente con los tumores no luminales y el cálculo del riesgo revela que en estos tumores esta metilación concurrente es 16,6 (IC95:3,54–77) más probable que en tumores luminales. También se observa que tumores con cualquiera de los genes, p73 o RARB metilados tienen 10,1 (IC95:2,63-38,46) veces mayor probabilidad de ser no luminales.

Gen (Región)	Luminales		No Luminales		Chi Cuadrado	Phi	Valor de p
	No Met	Met	No Met	Met			
p73(+258)	27	17	5	21	11,690	-0,409	0,001
RASSF1(+46)	9	35	15	11	10,058	0,379	0,002
RARB(-357)	36	8	12	14	9,646	-0,371	0,002
RARB(-180)	40	4	16	10	8,811	-0,355	0,003
PAX6(-52)	19	25	20	6	7,541	0,328	0,006
RASSF1(-136)	8	36	12	14	6,266	0,299	0,012
p15(+473)	39	5	17	9	5,522	-0,281	0,019
RARB + p73	25	6	3	12	15,609	-0,583	<0,001

**Tabla 5.20: Regiones diferencialmente metiladas entre tumores clasificados como Luminales (A o B) y tumores clasificados como No Luminales (HER2 o Tipo Basal).**

Resumiendo, los tumores luminales presentan la metilación de RASSF1 y PAX6 junto a la no metilación de p73 y RARB. Utilizando la información epigenética de estos genes se genera un panel predictivo de tumores luminales (Figura 5.25). La generación de clústeres con la información de estas 5 regiones muestra que dependiendo del estado de metilación de las mismas los tumores tienden a ser clasificados como luminales o no luminales.



**Figura 5.25: Generación de clústeres jerárquicos con tumores clasificados como luminales o no luminales.** Se observa la generación de dos clústeres entre las pacientes. El clúster 1 presenta la mayoría de los tumores luminales (rectángulos amarillos) y se destaca por la metilación de RASSF1 y PAX6 y la no metilación de RARB y p73. El clúster 2 presenta mayor cantidad de tumores no luminales (rectángulos grises). Entre las 5 regiones consideradas se observa la generación de dos clústeres. El clúster A está constituido por RASSF1 y PAX6 y el clúster B por dos regiones de RARB y p73. Los árboles que forman los clústeres 1 y 2 como A y B son soportados por el análisis de bootstrap.

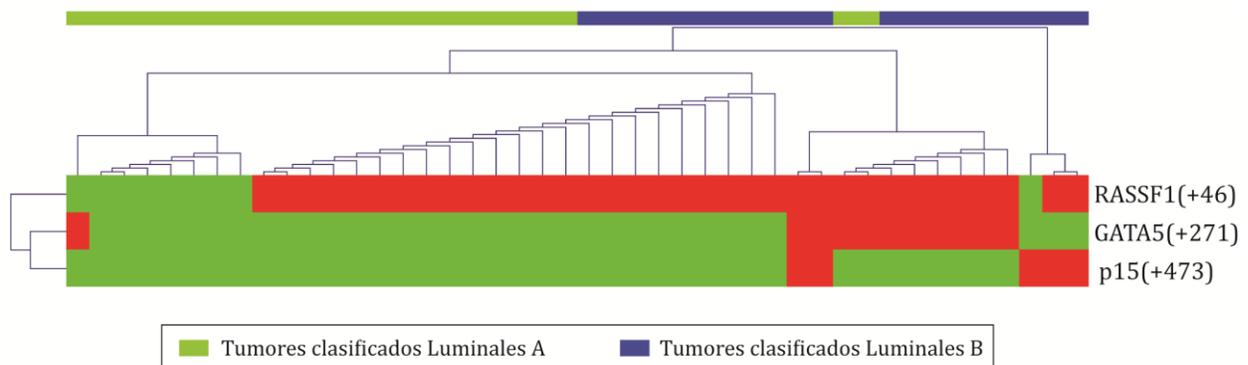
Del análisis de la figura del panel predictivo de tumores luminales, surge la observación que la metilación o no metilación de las regiones en p73 o RARB tienen mayor influencia en la determinación del subtipo molecular que el estado de metilación de RASSF1 o PAX6.

Luego de establecer los genes cuyo estado de metilación marca diferencias entre tumores luminales y no luminales, se puede realizar la búsqueda de regiones diferencialmente metiladas entre tumores luminales A y tumores luminales B. La diferencia clínica más importante entre estos tumores es la agresividad del tumor y el pronóstico que presentan lo que se traduce en la elección del tratamiento. Las pacientes con tumores luminales A pueden ser tratadas solo con hormonoterapia, mientras las pacientes con tumores luminales B requieren la combinación de hormono y quimioterapia [89].

La comparación de las alteraciones epigenéticas entre estos tumores muestra diferencias en la metilación de tres regiones (Tabla 5.21). En este caso, los valores negativos de *Phi* indican que la metilación de estas tres regiones se asocia con tumores clasificados como luminales B. El cálculo de riesgo (OR) muestra que dada la metilación de p15 (+473) o de GATA5 (+271) la probabilidad de que el tumor sea luminal B es 8,55 (IC95:1,9-38,2) veces mayor a que sea luminal A.

Gen (Región)	Luminales A		Luminales B		Chi Cuadrado	<i>Phi</i>	Valor de p
	No Met	Met	No Met	Met			
p15(+473)	24	0	15	5	6,769	-0,392	0,009
RASSF1(+46)	8	16	1	19	5,382	-0,350	0,020
GATA5(+271)	21	3	12	8	4,400	-0,316	0,036

**Tabla 5.21: Regiones diferencialmente metiladas entre tumores luminales A y luminales B.**



**Figura 5.26: Generación de clústeres jerárquicos con la información epigenética de tres regiones asociadas con tumores luminales B.** Aunque se observa una marcada tendencia de separación entre luminales A y B, ningún clúster es soportado por el análisis de bootstramp.

### **5.3. Alteraciones epigenéticas en la circulación de pacientes con cáncer**

La información epigenética encontrada en los carcinomas mamarios es un rasgo que solo presentan las células tumorales o en riesgo de desarrollo de tumor. Por ello la detección de la metilación aberrante en células presentes en biopsias puede indicar la presencia de procesos tumorales. En caso de estar frente a pacientes cuyo tumor primario se desconoce, la especificidad demostrada por el perfil de metilación del cáncer de mama podría contribuir con la identificación del origen tumoral.

Se plantea que la detección no invasiva del cáncer de mama, puede realizarse mediante el análisis de las alteraciones en la metilación en ADN tumoral circulante. Para esto, se analizan muestras de sangre pre-quirúrgicas de 9 pacientes con cáncer de mama sin tratamiento neoadyuvante.

Los análisis de MS-MLPA del ADN obtenido de las muestras de sangre de cada una de las pacientes sugieren que todos los genes analizados se encuentran no metilados. Con este resultado no se puede discernir si en estas pacientes no existe ADN tumoral circulando o si la sensibilidad de la técnica no es suficiente para detectar ese ADN tumoral diluido en la gran cantidad de ADN normal.

#### **- Detección de ADN tumoral mediante la aplicación de la estrategia Nested-MSP**

Distintos autores han publicado la detección y cuantificación de ADN tumoral en la sangre de pacientes con cáncer [203-205]. Nuestra hipótesis postula que la no-detección de metilación en sangre, es consecuencia de una baja sensibilidad de la técnica MS-MLPA. Para resolver esto se diseña una estrategia basada en una técnica de mayor sensibilidad: PCR anidada (Nested-MSP). Este diseño consta de dos pasos. El primero es la amplificación específica del ADN convertido con bisulfito de sodio, que disminuye la influencia del ADN no convertido en la detección de alelos metilados. El segundo paso es realizado en dos amplificaciones independientes, una específica para alelos no metilados y la otra específica para alelos metilados (Figura 5.27A). Como se planteó anteriormente, la desventaja de la técnica MSP es que solo permiten el análisis de una o un grupo reducido de ICpGs. Por ello

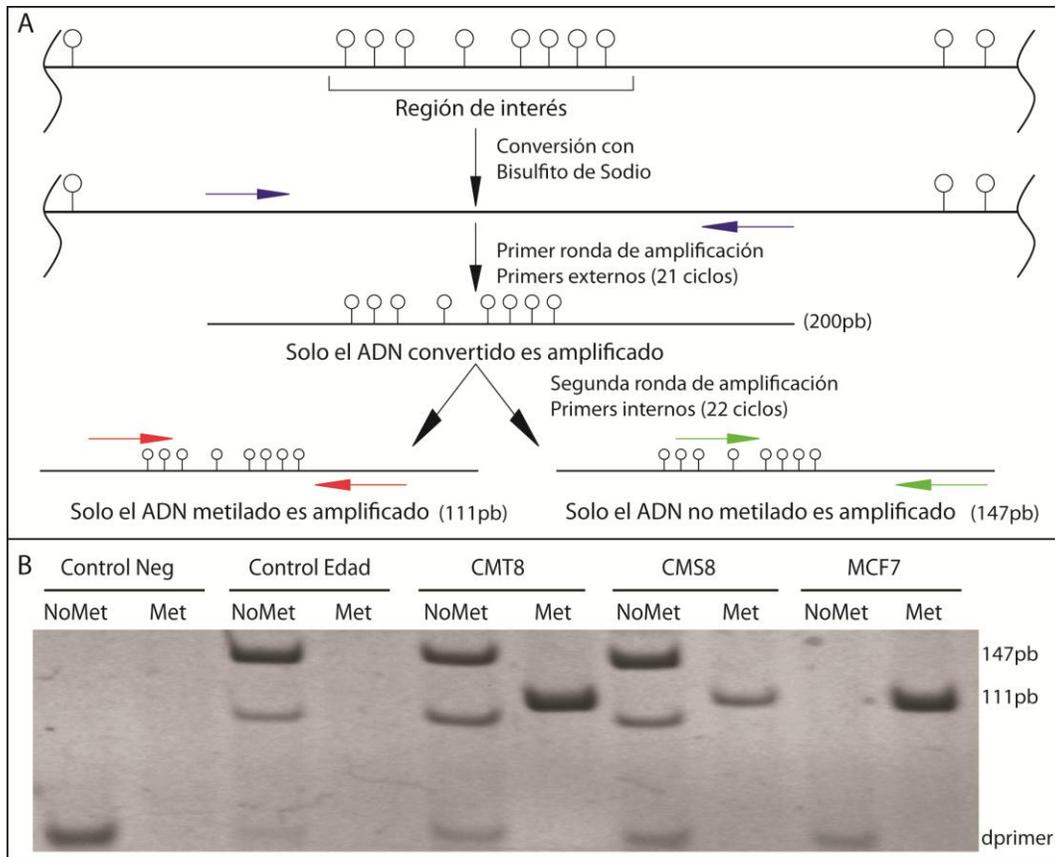
se elige la región RASSF1 (-136) que se encuentra metilada en el 67,4% de los tumores mamarios.

Con esta técnica se analizan distintas muestras:

- ADN de tumores mamarios cuyo perfil de metilación tumoral establecido por MS-MLPA presenta la metilación de RASSF1 (-136) (n=5).
- ADN de sangre de pacientes con RASSF1 (-136) metilado en el tumor primario (n=5).
- ADN de sangre de individuos sanos sin evidencia de enfermedad oncológica (n=2).
- ADN de la línea celular MCF7 que presenta la metilación de ambos alelos de RASSF1 (-136).

La aplicación de esta estrategia detecta la metilación aberrante del gen RASSF1 en los tumores y en la sangre de las pacientes. En ambos casos se detecta la presencia de los alelos aberrantemente metilados junto a los alelos no metilados. En el ADN obtenido de la línea celular MFC7 solo se detecta la presencia de alelos metilados, debido a la monoclonalidad de las líneas células. Debido a que se ha relacionado una mayor cantidad de alteraciones epigenéticas con el aumento de la edad, se analiza ADN extraído de sangre de mujeres sanas con edades similares a las pacientes analizadas. En estos controles solo se detecta la presencia de ADN no metilado (Figura 5.27B). Este resultado demuestra la presencia de ADN tumoral circulante detectable en base al perfil de metilación del tumor original.

La especificidad de la amplificación de estos fragmentos fue confirmada mediante la secuenciación bisulfito dependiente.



**Figura 5.27: PCR específica de metilación anidada (MSP-Nested) para la detección de ADN tumoral circulante.** **A-** Esquema de la estrategia anidada. Primero se amplifica selectivamente el ADN convertido con bisulfito de sodio, esta amplificación consta de 21 ciclos y su producto de 200 pares de bases no es visible con tinción de bromuro de etidio. Dos microlitros de la primera ronda, sirven de templado para dos amplificaciones independientes, una con un par de primers específico de alelos metilados (111pb) y la otra con un par de primers específico de alelos no metilados (147pb). **B-** Resolución de los productos amplificados por MSP-Nested. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%. De izquierda a derecha, calles 1 y 2 reacción con agua como templado inicial, calles 3 y 4 ADN extraído de la sangre de una donante sana de 67 años, calles 5 y 6 ADN extraído del tumor de la paciente CM8, calles 7 y 8 ADN extraído de la sangre de la paciente CM8 y calles 9 y 10 ADN extraído de la línea celular MCF7. dprimers: dímeros formados por la amplificación de la complementariedad de los primers.

- **Incremento de la sensibilidad de la técnica MS-MLPA**

Los resultados presentados anteriormente demuestran que la información de la metilación de una región no es suficiente para establecer relaciones con características clínicas o patológicas de la enfermedad. Debido a la importancia de establecer perfiles de metilación tumoral en vez de la identificación del estado de metilación de una región aislada, se plantea

la necesidad de aumentar la sensibilidad de MS-MLPA para la detección de ADN tumoral circulante. Para tal propósito se introduce una nueva modificación al protocolo original llamada “MS-MLPA doble ronda” (drMS-MLPA), que consta de dos rondas de amplificación por PCR del producto obtenido por hibridación y ligación de las sondas.

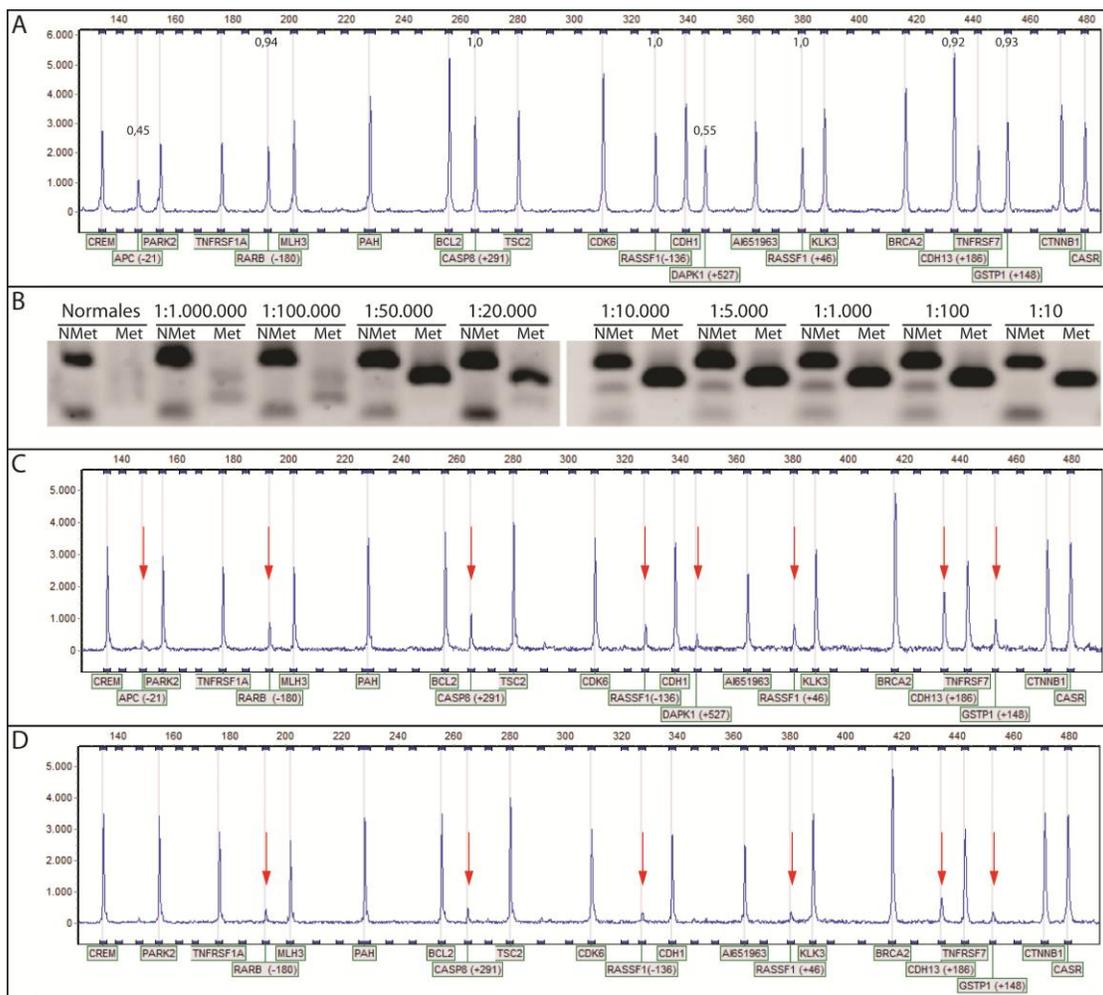
La estrategia drMS-MLPA consiste en la realización completa de MS-MLPA y luego 2µl del producto de PCR de esta primer amplificación son utilizados para una nueva amplificación. La segunda amplificación requiere de una cantidad de ciclos controlada ya que un exceso de ciclos, lleva a una excesiva amplificación de señales basales consideradas artefactos técnicos. Por tanto, se realiza una curva con los distintos números de ciclos extra (13, 14, 15, 16, 18, 20 y 22). Se observa una amplificación excesiva de señales basales al utilizarse más de 20 ciclos. La mejor condición para drMS-MLPA se fijó en 35 ciclos de amplificación inicial seguidos por 16 ciclos de amplificación doble ronda.

Para comparar la sensibilidad de las técnicas MSP-Nested, MS-MLPA y drMS-MLPA se desarrolla un modelo in vitro que simula distintas concentraciones de ADN tumoral circulante. Este modelo consiste en diluciones seriadas del ADN de la línea celular MCF7 y el ADN obtenido de donantes sanos. Las diluciones consisten en 1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:50.000, 1:100.000, 1:1.000.000 (células MCF7: células normales) y finalmente solo células normales.

El análisis del perfil de metilación de la línea celular MCF7 mediante las sondas ME001 muestra la metilación de APC (-21), RARB (-180), CASP8 (+291), RASSF1 (-136), DAPK1 (+527), RASSF1 (+46), CDH13 (+186) y GSTP1 (+148). La relación entre el área del pico digerido sobre el no digerido establece que APC (-21) y DAPK1 (+527) se encuentran metilados en un solo alelo (0,45 y 0,55 respectivamente), el resto de las regiones se encuentran metiladas en ambos alelos (Figura 5.28A). Este perfil es posteriormente buscado en las distintas diluciones de MCF7 en células normales. La técnica MS-MLPA detecta este perfil hasta una dilución de 1 célula MCF7 en 5.000 células normales (Tabla 5.22). La técnica MSP-Nested tiene la capacidad de detectar la metilación de RASSF1 (presente en el perfil de MCF7) hasta una dilución de 1 célula MCF7 en 50.000 células normales (figura 5.28B). Finalmente drMS-MLPA detecta el perfil de metilación de MCF7 hasta una dilución de 1

célula MCF7 en 20.000 células normales (Figura 5.28C). Cuando la célula MCF7 está diluida en 50.000 células normales, drMS-MLPA detecta un perfil relacionado a MCF7. Se observa que las regiones que en el perfil de MCF7 se encuentran metiladas solo en un alelo (APC y DAPK1), no son detectadas en esta dilución (Figura 5.28D).

Al comparar la detección de MSP-Nested y drMS-MLPA se observa que la metilación de RASSF1 es detectada por ambas técnicas en la misma dilución (1 célula MCF7 en 50.000 células normales).



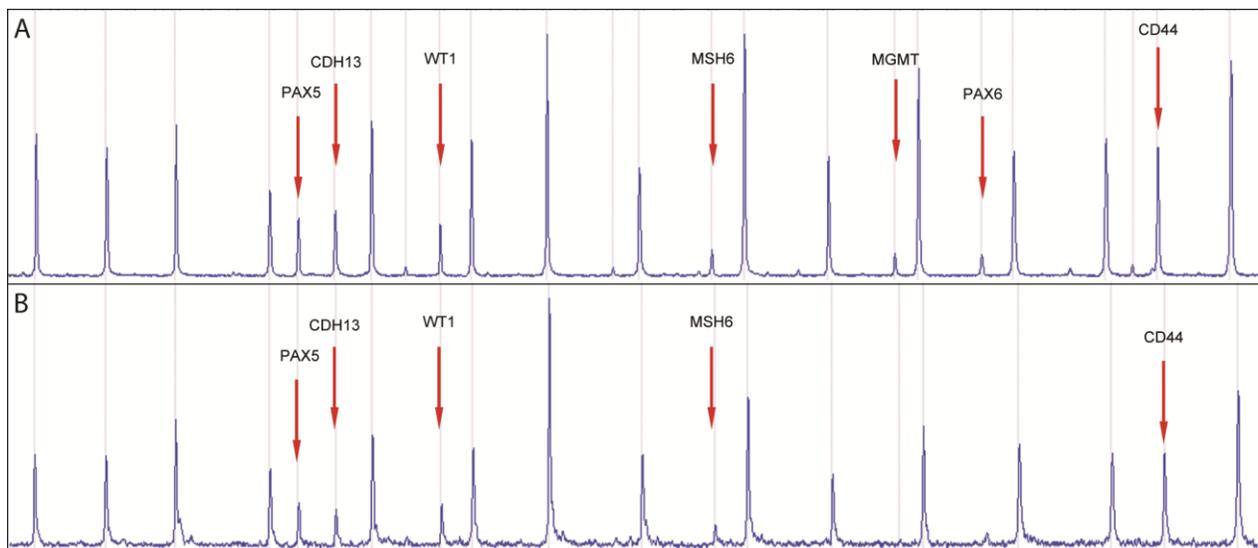
**Figura 5.28: Comparación de la sensibilidad en la detección de ADN tumoral circulante. A-** Perfil de metilación de la línea celular MCF7 establecido con la técnica MS-MLPA. Se indica la relación entre el área de los picos digeridos sobre no digeridos. **B-** Curva de detección de la metilación de la región RASSF1 (-136) con la técnica MSP-Nested. **C y D-** Utilización de drMS-MLPA para la detección del perfil de metilación de MCF7 en un entorno de 10.000 (C) y 50.000 células normales.

Técnica	1:10	1:100	1:1.000	1:5.000	1:10.000	1:20.000	1:50.000	1:100.000	1:1.000.000
MS-MLPA	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MSP-Nested	+	+	+	+	+	+	+	-	-
drMS-MLPA	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-

**Tabla 5.22: Comparación de la sensibilidad de las técnicas utilizadas en la detección de ADN tumoral circulante.** + significa la detección del ADN de MCF7, - la no detección del ADN de MCF7 y +/- significa que se detectan algunas regiones mientras que otras no.

- **Aplicación de la técnica doble-ronda MS-MLPA para la detección de perfiles de metilación tumoral en sangre de pacientes con cáncer de mama.**

Con la utilización de drMS-MLPA se identifican perfiles de metilación en la sangre prequirúrgica de pacientes con alteraciones epigenéticas previamente detectadas en el tumor primario. Los resultados revelan que los perfiles de metilación en las muestras de sangre de las pacientes no son idénticos al perfil del tumor primario, si bien son similares (Figura 5.29). Es interesante recordar que en los análisis comparando perfiles de metilación ganglionar y tumoral, surgían diferencias similares a las observadas en este análisis.



**Figura 5.29: Detección de ADN tumoral circulante con la técnica drMS-MLPA.** A- Análisis del perfil de metilación tumoral utilizando la técnica MS-MLPA. B- Análisis del ADN tumoral circulante de la misma paciente utilizando la técnica drMS-MLPA.

En el análisis se observa la detección de metilación aberrante en sangre pre-quirúrgica de 5 de las 7 regiones presentes en el perfil de metilación tumoral. Además se observa que la línea de base de la fluorescencia no es uniforme, esto es observado en todos los análisis de drMS-MLPA que requieren la re-amplificación de los fragmentos. Esta adaptación y su aplicación ha sido publicada en 2010 [184].

## **CAPÍTULO SEXTO – DISCUSIÓN**

La evidencia acumulada durante la última década demuestra que las alteraciones en la regulación epigenética son un componente fundamental en la carcinogénesis humana. Específicamente, la metilación aberrante del ADN ha sido utilizada como marcador de aspectos fundamentales de la oncología clínica, como lo son el diagnóstico y la respuesta al tratamiento del cáncer. El estudio epigenético del cáncer de mama humano ha permitido enriquecer el entendimiento de este proceso oncológico.

El principal objetivo de esta tesis ha sido el análisis de la alteración en los patrones de metilación de genes cuya función se relaciona con distintos procesos carcinogénicos. Para este estudio se ha utilizado la técnica MS-MLPA y solo se han incluido tejidos frescos, es decir sin fijación en formol ni inclusión en parafina.

Las ventajas de este diseño de estudio fueron: i) evitar cualquier alteración en la información epigenética producto del procesamiento de las muestras, ii) evitar la utilización de la conversión con bisulfito de sodio y iii) analizar el estado de metilación de 49 regiones en solo dos reacciones.

En investigaciones enfocadas en el estudio de la metilación aberrante y su impacto en las decisiones clínicas, es frecuente encontrar discrepancias en los resultados. Por ejemplo, algunos autores han publicado que la metilación del gen RARB no presenta diferencia entre pacientes con y sin metástasis en ganglios axilares [206], mientras que en esta tesis y otros autores hemos encontrado que la metilación de este gen es un factor que predice la presencia de metástasis en los ganglios axilares [202]. Otro caso de discrepancia llamativa se observa en el análisis de la metilación de un grupo de genes en tumores de colon denominados CIMP (del inglés CpG Island Methylator Phenotype). Algunos autores reportan que la metilación de este grupo de genes se relaciona con menor supervivencia de los pacientes [207-209], mientras que otros trabajos lo asocian a una baja mortalidad [210]. Tounier y colaboradores han manifestado que estas discrepancias pueden ser el resultado de diferencias en la elección y el procesamiento de las muestras a analizar [211]. En cuanto al tipo de muestra, la conservación de los tejidos congelados ofrece la mayor protección al ADN. Sin embargo este tipo de muestras frescas son las más difíciles de conseguir. Los tacos de parafina son el método de conservación más común de los tumores. Y la desventaja es

que este proceso requiere que los tejidos sean preservados con un fijador que generalmente es formol, el cual degrada el ADN y genera enlaces cruzados entre el ADN y las proteínas. En cuanto a la metodología para estudiar la metilación, la conversión con bisulfito de sodio induce la degradación del 84 a 96% del ADN [212]. La mayoría de las técnicas que analizan el estado de metilación del ADN requieren de un diseño específico para cada región. La utilización de la técnica MS-MLPA ha permitido evitar la utilización de ADN convertido con bisulfito de sodio, y además en solo dos reacciones se generó información sobre el estado de metilación de 49 regiones. Como desventaja, se observó que la sensibilidad de MS-MLPA es inferior a la de las técnicas basadas en la conversión con bisulfito de sodio, como MSP [184].

A esta altura caben mencionar dos limitaciones del diseño de estudio: i) la falta de acceso a metodología que permitiera la microdissección de los tejidos tumorales, ii) el corto seguimiento de las pacientes incluidas en el estudio. Elaborar estrategias para sortear estas limitaciones puede ampliar enormemente los resultados obtenidos en esta tesis, y deben ser consideradas para nuevos estudios a realizarse en este como en otros tipos de cáncer.

Los análisis de tejidos tumorales tienen la particularidad de brindar información de una población heterogénea de células, entre ellas la presencia de porcentajes variables de células normales. Existen diversas técnicas para disminuir la influencia del tejido fenotípicamente normal. Estas técnicas varían en complejidad y en la pureza del resultado obtenido. La microdissección con captura laser es una técnica que garantiza la extracción de células únicamente tumorales [213, 214]. Otra técnica menos compleja es la microdissección con aguja fina [215]. Si bien esta técnica no evita la presencia de células normales, enriquece la población de las células tumorales. El inconveniente de ambas técnicas es que requieren tejidos embebidos en parafina, que como se dijo previamente son propensos a presentar interferencias en los estudio sobre ADN. En el presente trabajo de tesis se utilizaron secciones de tejidos tumorales en las que coexisten principalmente células tumorales que pueden o no pertenecer a diferentes clones del tumor, porciones de tejido mamario normal y células linfocitos infiltrantes. Por lo cual se debe tener en cuenta que los resultados obtenidos en esta tesis deben ser considerados como la *suma* de las alteraciones presentes en los distintos tipos de células. En relación a esta observación, en marzo del 2012 Gerlinger

y colaboradores publicaron un trabajo en el cual se demuestra que los análisis de pequeñas regiones del tumor representan solo datos parciales de las alteraciones del mismo [216]. Por lo cual la utilización de grandes secciones de tumor podría brindar una información más general de las alteraciones que coexisten en la masa celular. En este sentido es imprescindible que se establezcan protocolos de procesamiento de muestras que apunten a obtener los datos más representativos de la enfermedad, por ejemplo combinando la información obtenida de distintas porciones.

Debido a la naturaleza prospectiva del trabajo de tesis, el seguimiento de las pacientes luego de las cirugías fue muy breve. Esto influyó en la imposibilidad de establecer conclusiones definitivas respecto del impacto de las alteraciones de la metilación sobre la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global de las pacientes.

### **6.1. Metilación de genes reguladores del cáncer en tejido mamario no tumoral**

Los resultados presentados en este trabajo de tesis sugieren que la metilación aberrante del panel de genes analizados es un rasgo exclusivo de los procesos oncológicos de la glándula mamaria. Esta observación coincide con los resultados de investigaciones previas reflejados en las publicaciones de Burbee [217] y Krop [218]. En otros trabajos se ha sugerido que alteraciones en la metilación de este tipo de genes se asocia con el riesgo del tejido mamario “fenotípicamente normal” a desarrollar tumores [219].

Existe un número discreto de publicaciones que reflejan estudios de alteraciones de la metilación del ADN en fibroadenomas. Uno de esos trabajos fue publicado por Di Vinci y colaboradores en el año 2005. Estos autores analizaron 15 fibroadenomas y demostraron que la frecuencia de metilación del gen CDKN2A en esta enfermedad es similar a la observada en carcinomas invasores [196]. El gen CDKN2A presenta 2 isoformas p14 y p16 con sus respectivos promotores. En esta tesis se analizaron 3 tejidos mamarios con esta patología benigna. Los resultados obtenidos sugieren que las 49 regiones analizadas, (entre las cuales 2 están ubicadas en el gen CDKN2A), se encuentran desmetiladas en esta enfermedad. Cabe mencionar que las dos regiones consideradas en esta tesis, corresponden a la región promotora y primer exón de la isoforma p14, mientras que el análisis de Di Vinci

y colaboradores fue enfocado en la región promotora de la isoforma p16. Por lo tanto no es posible realizar una comparación entre estos resultados. En este contexto en el cual los fibroadenomas estudiados presentaron un perfil de metilación normal similar a tejido mamario normal, es llamativa la observación de metilación aberrante en el tejido de una paciente con fibroadenoma *gigante*. Como fue expuesto anteriormente, esta es una enfermedad mamaria benigna poco frecuente, por lo cual existen muy pocos reportes de casos de pacientes con este cuadro clínico y ninguno analizando el estado de metilación de genes relacionados con procesos tumorales. Los resultados de esta tesis mostraron alteraciones en la metilación de 5 de las 49 regiones analizadas. Noguchi y colaboradores analizaron la metilación del gen del receptor de andrógeno, pero únicamente como indicador de policlonalidad de un fibroadenoma gigante [220]. Por lo cual, el caso presentado en esta tesis representa la primera publicación de alteraciones en la metilación de genes relacionados con el desarrollo del cáncer en fibroadenoma gigante [197].

## **6.2. Metilación de genes reguladores del cáncer en carcinomas mamarios**

El entendimiento del cáncer de mama como una enfermedad heterogénea cuenta cada vez con mayor respaldo desde el análisis de la patología a nivel molecular. El análisis transcriptómico del cáncer mamario mostró que esta enfermedad puede ser clasificada en al menos 4 subtipos: Luminal A, Luminal B, HER2, Tipo Basal [85]. Hoy se acepta que al menos seis subtipos pueden ser distinguidos y que existen diferencias en la evolución clínica de estas pacientes. A los 4 subtipos anteriores se han sumado el tipo normal y el grupo de tumores con baja expresión de genes de la familia claudin [221]. A pesar de estas clasificaciones aún se observan diferencias en la evolución clínica y en la respuesta al tratamiento, lo que sugiere la presencia de subgrupos aún no identificados. En el trabajo de Gatzka y colaboradores se plantea que el cáncer de mama puede ser clasificado en 18 subtipos moleculares distintos [222]. Los resultados presentados en esta tesis muestran que los tumores de todas las pacientes analizadas presentan alteraciones epigenéticas exclusivas. No se encontraron 2 pacientes que compartan el mismo perfil de metilación de los genes estudiados. Estas diferencias epigenéticas entre los tumores que afectan a las pacientes podrían ser el reflejo de una combinación de factores. Evidencia bibliográfica

demuestra que distintos factores ambientales pueden afectar las marcas epigenéticas en el genoma. Entre ellos se encuentran la alimentación, la influencia hormonal y la historia reproductiva de las pacientes [223-226]. Este último año, el entendimiento de la plasticidad del epigenoma humano ha demostrado que incluso el estilo de vida puede afectar la metilación del ADN. Ejemplo de ello es el trabajo de Barrès y colaboradores publicado en marzo de 2012 en la revista *Cell Metabolism*. En este trabajo los autores demostraron cómo el ejercicio físico agudo induce la desmetilación y consiguiente expresión de PGC-1 $\alpha$ , PDK4, y PPAR- $\delta$  [227]. En este contexto, la observación de que cada paciente presenta un perfil de metilación único refuerza la idea de que el tratamiento del cáncer de mama debe ser personalizado, enfocándose en características moleculares además de en el tipo o subtipo tumoral.

En este trabajo de tesis se han identificado grupos de genes cuya metilación aberrante se relaciona con el cáncer de mama y grupos de genes que no están alterados en esta enfermedad. La frecuencia de metilación observada es similar a los datos publicados por van der Auwera y colaboradores [206]. Estos autores observaron una frecuencia de metilación del 74% para RASSF1, 60% para APC, 31% para DAPK1 y 21% para RARB. Mientras que en el trabajo de Shinozaki y colaboradores la frecuencia observada fue 81% RASSF1A, 49% APC, 24% RARB y 21% GSTP1 [202]. Es importante remarcar que la frecuencia de metilación del gen WT-1 (91,3%) observada en esta tesis no ha sido reportada previamente, por lo cual es muy importante realizar estudios que validen esta observación utilizando otro grupo de pacientes e incluso otras metodologías. La presencia de marcadores cuya alteración es observada en un porcentaje tan alto de las pacientes es muy importante para el diseño de estrategias diagnósticas de la patología. Un caso similar se ha observado en la metilación del gen GSTP1 en pacientes que padecen cáncer de próstata. Este gen está metilado en más del 80% de los casos y se ha convertido en un marcador diagnóstico no invasivo de la enfermedad [158, 228].

La observación de perfiles de metilación específicos del cáncer de mama respecto de otros tipos tumorales es un fenómeno que se ha reportado en trabajos previos [229, 230]. Los datos presentados en esta tesis no permiten distinguir perfiles específicos de melanoma,

hepatoblastoma o cáncer de próstata ya que las comparaciones carecen de significancia estadística debido al número reducido de muestras analizadas en cada caso.

La comparación de los perfiles de metilación de tumores primarios con los de los ganglios linfáticos sugiere que las células metastásicas mantienen las alteraciones epigenéticas adquiridas en el tumor primario. Esta observación ha sido recientemente profundizada en dos trabajos que utilizaron la técnica de secuenciación completa del genoma (del inglés Whole Genome Sequencing). Ding y colaboradores mostraron el análisis de una paciente con cáncer de mama tipo basal en el cual las alteraciones genéticas del tumor primario se encontraban presentes en una metástasis en cerebro 8 meses posteriores a la cirugía. Solo dos mutaciones y una delección fueron las diferencias más importantes. Estos autores sugieren que las diferencias pueden deberse a que las células del tumor primario que iniciaron la cascada de metástasis pertenecían a una población minoritaria en el tumor primario, no detectadas mediante “Whole Genome Sequencing” [231]. Turajlic y colaboradores en una publicación más reciente compararon las alteraciones genéticas de un melanoma acral primario con las presentes en células tumorales en un ganglio linfático y observaron que las alteraciones están conservadas en ambos tejidos [232].

En esta tesis se ha mostrado que los tumores primarios que presentan metilación aberrante del gen RARB tienen mayor probabilidad de escapar a ganglios linfáticos que aquellos que presentan a RARB no metilado. Esta observación concuerda con las publicaciones previas de Shinozaki y colaboradores [202]. La metilación aberrante de muchos genes se ha relacionado con las características clínicas o patológicas de los tumores mamarios. Por ejemplo, la metilación de PTEN fue relacionada con tumores de alto grado tumoral, expresión de HER y gran tamaño tumoral [233]. En esta tesis se han analizado dos regiones distintas del gen PTEN y no se ha encontrado relación con características clínicas de ninguna de ellas.

Esta tesis ha sugerido que tumores con gran número de genes metilados presentan un mayor grado tumoral. Esta observación ha sido previamente publicada por distintos autores [230, 234]. En lo que se refiere a tumores con alto grado, en esta tesis se muestra que estos tumores presentan una alta frecuencia de metilación del gen p73, algo que no ha sido

reportado hasta la fecha. La utilización de p73 como marcador de grado tumoral podría contribuir con la decisión de clasificación de tumores con grado 2. Para esto es necesario realizar más estudios que incluyan otro grupo de pacientes, otros patólogos y otras técnicas para evaluar la metilación de p73.

### **6.3. Detección no invasiva del cáncer de mama**

Los marcadores tumorales han demostrado ser muy útiles en la identificación de distintas etapas de la carcinogénesis de la glándula mamaria. Entre los más utilizados se encuentran los antígenos carcinoembrionarios (CA) séricos, como CA 15-3. Estos han demostrado la capacidad de reflejar la progresión y la recurrencia de la enfermedad, sin necesidad de procedimientos altamente invasivos. Sin embargo estos marcadores no cuentan con la especificidad para reemplazar los métodos diagnósticos del cáncer de mama, como mamografía, ecografía, resonancia magnética o tomografía por emisión de positrones y posterior confirmación del diagnóstico mediante biopsias [235]. En las últimas dos décadas, la utilización de alteraciones en el ADN como marcador diagnóstico ha tomado protagonismo en la detección y seguimiento de pacientes con cáncer. Entre las alteraciones utilizadas se encuentran las mutaciones, las amplificaciones, las translocaciones, la pérdida de heterocigocidad, la inestabilidad de los microsatélites y más recientemente la metilación aberrante [236, 237]. En 1965 Bendich, Wilczok y Borenfreund reportaron la presencia de ADN en la sangre de ratones, proveniente de tumores inducidos por el virus del papiloma. En ese momento estos autores relacionaron la presencia de esta molécula a la generación de metástasis en órganos distantes, sugiriendo que este ADN presentaba una capacidad infectiva para otros órganos [238]. Actualmente, esta observación no se acepta como válida. Hoy se sabe que los tumores liberan al torrente sanguíneo ADN tumoral sin una capacidad metastásica particular, sino como consecuencia del mismo proceso tumorigénico y de la respuesta inmunológica del huésped. La presencia de ADN de tumores sólidos en la circulación de pacientes está adquiriendo importancia diagnóstica de la enfermedad.

Comparado con la utilización de proteínas como marcadores de la presencia de tumores, el uso del ADN tumoral circulante presenta tres ventajas principales: i- el ADN es más estable que las proteínas, por lo que su vida media en la circulación sanguínea es mayor, ii- su

cantidad puede ser amplificada exponencialmente mediante PCR y iii- las alteraciones del ADN son específicas de los procesos oncológicos mientras que las proteínas evaluadas, generalmente se encuentran también circulantes en sangre de individuos sanos. En este sentido, la alteración de la metilación del ADN representa un marcador útil para identificar distintas etapas de la carcinogénesis. Otra característica importante de un marcador tumoral sanguíneo es su especificidad del órgano afectado. Hasta hoy el único marcador que cumple con este aspecto es el antígeno prostático (PSA). Como se mencionó anteriormente, la metilación de ciertos genes es específica de distintos procesos tumorales [229]. Por ejemplo, la metilación de MLH1 ha sido frecuentemente observada en cáncer de colon [239] y cáncer gástrico [240], pero no en cáncer de esófago [241] y/o hepatoblastoma [242]. Los resultados de este trabajo de tesis sugieren que la metilación de este gen es infrecuente en cáncer de mama.

Específicamente en cáncer de mama, varias investigaciones han evaluado la utilidad diagnóstica de la metilación aberrante de genes en el ADN tumoral circulante [243-246]. Hoque y colaboradores evaluaron la metilación de los genes APC, GSTP1, RASSF1 y RARB en plasma obtenido de mujeres con cáncer de mama. En ese trabajo reportaron que al menos uno de estos cuatro genes está metilado en la circulación del 62% de las pacientes [247]. Estos resultados sugieren que el 38% de las pacientes no presentaron ningún tipo de alteración en la circulación, por lo cual podrían ser consideradas como pacientes sin recurrencia cuando en verdad no se ha analizado el panel de genes que garantice la detección en el 100% de los casos. Por supuesto que es necesario realizar estudios con mayor número de pacientes, pero los resultados mostrados en este trabajo de tesis indican que todas las pacientes presentaron metilación aberrante de al menos 2 genes en sus tumores. Por lo cual es muy importante la utilización de una técnica que analice un panel de genes en lugar de un único gen por vez como lo hace MSP.

En esta tesis se ha comparado la capacidad de detección de la técnica MSP con la de la técnica MS-MLPA y se ha demostrado que la primera técnica presenta una mayor sensibilidad para la detección de los bajos niveles de ADN tumoral circulando en la sangre de las pacientes. Para evaluar la metilación de un panel de genes en lugar de solo uno, se ha

tratado de incrementar la sensibilidad de la técnica MS-MLPA mediante sucesivas amplificaciones por PCR. Los resultados obtenidos indican presencia de ADN con metilación aberrante en genes relacionados con el tumor primario de la paciente.

Este trabajo de tesis ha contribuido a confirmar que el cáncer de mama es un proceso específico de cada paciente. Los resultados contribuyen a promover el desarrollo de estrategias de detección, seguimiento y tratamiento de la enfermedad menos generalizadas y más personalizadas. Estas observaciones están en línea con los nuevos desafíos de la oncología molecular que alientan el desarrollo de la llamada Medicina Personalizada.

# **CAPÍTULO SÉPTIMO – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## 7.1. Conclusiones

La técnica MS-MLPA ha demostrado una gran capacidad en la determinación del estado de metilación de 49 regiones relacionadas con procesos carcinogénicos. A pesar de presentar menor sensibilidad que las técnicas basadas en la conversión con bisulfito de sodio y PCR, la gran cantidad de regiones analizadas la convierte en una técnica muy poderosa para el estudio de procesos tumorales, no solo de la glándula mamaria sino de otros tejidos. En lo referido a la capacidad de detección de ADN tumoral circulante, la técnica MS-MLPA requiere diseños que aumenten su sensibilidad como el utilizado en esta tesis denominado “MS-MLPA doble ronda”.

La metilación de estas regiones un proceso relacionado con el tejido tumoral. La evaluación de 49 regiones permite establecer perfiles de metilación tumoral los cuales son específicos de cada paciente. La especificidad determinada en estos perfiles aporta información a la observación clínica de que el cáncer de mama es una enfermedad personal y que el tratamiento debe ser apuntado al paciente más que a la enfermedad en su conjunto. Existe un grupo de regiones cuya metilación aberrante se relacionó con el proceso tumoral mamario. Existen diferencias epigenéticas entre el cáncer de mama y otros tumores. La alta frecuencia de metilación del gen WT1 sólo es observada en tumores mamarios. La metilación de otro grupo de regiones no está relacionada con la carcinogénesis de los tumores analizados.

En la carcinogénesis mamaria hay regiones cuya metilación depende del estado de metilación de otra región. Esta dependencia llevó a la identificación de tres grupos: El grupo 1 presenta la metilación concurrente de los genes RASSF1, PAX5, PAX6, GSTP1 y APC. Este grupo presenta metilación divergente con los otros dos grupos. El grupo 2 presenta la metilación concurrente de los genes ERS1, IGSF4 y DAPK1 y el grupo 3 presenta la metilación concurrente de los genes p73 y RARB. No hay dependencia entre la metilación del grupo 2 y 3, pero ambos tienen metilación divergente con el grupo 1.

Las células que escapan de la masa primaria mantienen la metilación aberrante adquirida en la masa primaria. La metástasis en ganglios linfáticos está relacionada con la metilación del

gen RARB. Los carcinomas con grado tumoral 3 presentan una mayor frecuencia de metilación del gen p73. La metilación concurrente de p73 y RARB es un rasgo tumoral asociado a un mal pronóstico de las pacientes. Los tumores candidatos a ser tratados con hormonoterapia, presentan la metilación de los genes RASSF1 y PAX6 y la no metilación de ESR1 como principales rasgos epigenéticos.

## **7.2. Perspectivas**

La modificación MS-MLPA doble ronda tendiente a incrementar la sensibilidad de MS-MLPA requerirá de un estudio diseñado para evaluar su capacidad en la detección de ADN tumoral circulando. Es sabido que la concentración de este tipo de ácidos nucleicos es mayor en suero. Por lo cual el estudio debería planificarse en base a la utilización de ADN tumoral circulante presente en el suero de las pacientes y no en sangre completa, un protocolo en el que nuestro grupo ya se encuentra trabajando. En este estudio puede incluirse sangre prequirúrgica, tumores primarios y sangre post-tratamiento para identificar el perfil tumoral y evaluar los efectos del tratamiento.

Las diferencias epigenéticas encontradas entre los tumores mamarios y tumores de otros orígenes deben ser analizadas en estudios que incluyan número mayores de tumores de otros orígenes como así también que incluyan tumores de otros orígenes.

La alta frecuencia de metilación de WT1 en tumores mamarios y no en otros tumores lo convierte en un potencial biomarcador para la detección no invasiva del cáncer de mama. Este aspecto debe ser estudiado en una importante cohorte de pacientes con cáncer de mama y donantes sanas pertenecientes al mismo grupo etario de las pacientes. Este es un estudio en marcha en nuestro grupo.

La presencia de metilación del gen RARB en tumores que metastatizan debe ser investigada en un grupo de pacientes seleccionadas en base al estado de metástasis de los ganglios linfáticos y que presenten características clínico-patológicas similares.

La metilación de p73 en tumores de grado 3 puede ser un marcador que contribuya a la decisión de la clasificación y del tratamiento de tumores con grado 2. Para esto es necesario

planificar un estudio que incluya tumores con grado 2 de pacientes que respondieron favorablemente a los tratamientos (similar a grado 1) y de pacientes con una mala respuesta (similares a grado 3) y de este modo relacionar la metilación de p73 con el primer grupo o el segundo. El resultado de este estudio puede revelar la utilidad de la evaluación de la metilación de p73 en tumores clasificados como grado 2.

La evaluación de la metilación de los genes RASSF1 y ESR1 puede aportar datos para la decisión del tratamiento del cáncer de mama. Esta observación requiere de la planificación de un estudio que compare pacientes respondedoras y no respondedoras a la hormonoterapia.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics**. *CA Cancer J Clin* 2011, **61**(2):69-90.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008**. *Int J Cancer* 2010, **127**(12):2893-2917.
3. Brawley OW: **Avoidable cancer deaths globally**. *CA Cancer J Clin* 2011, **61**(2):67-68.
4. Cancer. IAFRo: **IARC handbooks of cancer prevention**. In. Lyon Oxford, UK ; Carey, NC: The Agency ; Distributed by Oxford University Press; 1997: v.
5. Senra Varela A: **El Cancer: Etiologia, Epidemiologia, diagnostico y prevencion**. Madrid: Elsevier Science Health Science; 2002.
6. Breasted JH: **The Edwin Smith surgical papyrus**. Chicago, Ill.,: The University of Chicago press; 1930.
7. Ebbell B: **The Papyrus Ebers, the greatest Egyptian medical document**. Copenhagen: Levin & Munksgaard; H. Milford, Oxford university press; 1937.
8. Hippocrates, Adams F: **Hippocrates, selected works**. Ann Arbor, Mich.,: Edwards Brothers, Inc.; 1938.
9. Hippocrates: **Aforismos y sentencias**. Buenos Aires,: Editorial TOR; 2008.
10. Celsus AC: **De medicina**. Florence,: Nicolaus Laurentii, Alamanus; 1478.
11. Avicenna, Gruner OC: **A treatise on the Canon of medicine of Avicenna, incorporating a translation of the first book**. [Edited and translated] by O. Cameron Gruner. New York,: Kelley; 1970.
12. Ramen F: **Albucasis (Abu al-Qasim al-Zahrawi) : renowned Muslim surgeon of the tenth century**, 1st edn. New York: Rosen Pub. Group; 2006.
13. Ahmad Z: **SH08 AL-ZAHRAWI – THE FATHER OF SURGERY**. *ANZ Journal of Surgery* 2007, **77**:A83-A83.
14. Olson JS: **Bathsheba's breast : women, cancer & history**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2002.
15. Le Dran HF, Gataker T, Cheselden W: **The operations in surgery of Mons**, 3d edn. London,: C. Hitch and L. Hawes; 1757.
16. Morgagni G: **De sedibus et causis morborum: A cura del Comitato organizzatore delle onoranze a G.B. Morgagni**; 1761.
17. Raven RW: **The theory and practice of oncology: historical evolution and present principles**: Parthenon Pub.; 1990.
18. Weinberg RA: **The biology of cancer**. New York: Garland Science; 2007.
19. Watson JD, Crick FH: **Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid**. *Nature* 1953, **171**(4356):737-738.
20. Knudson AG, Jr.: **Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971, **68**(4):820-823.
21. Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Robbins KC, Barbacid M: **Oncogenes in human tumor cell lines: molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, **79**(9):2845-2849.
22. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM: **Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, **79**(11):3637-3640.
23. Shih C, Weinberg RA: **Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line**. *Cell* 1982, **29**(1):161-169.
24. Human Genome Sequencing C: **Finishing the euchromatic sequence of the human genome**. *Nature* 2004, **431**(7011):931-945.

25. Muela EGC: **Manual de psicooncología**: GRUPO Aula Médica; 1999.
26. Rolland JS: **Familias, enfermedad y discapacidad: una propuesta desde la terapia sistémica**: Gedisa; 2000.
27. Gabriel J: **The biology of cancer**, 2nd edn. Chichester ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2007.
28. Corner J, Bailey C: **Cancer nursing : care in context**, 2nd edn. Oxford ; Malden, MA: Blackwell Pub.; 2008.
29. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
30. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
31. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, Chamness GC, Osborne CK, Clark GM: **Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer**. *Breast Cancer Res Treat* 1998, **52**(1-3):227-237.
32. Viniegra M, Paolino M, Arrossi S: **Cáncer de mama en Argentina : organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control : Informe final julio 2010 : diagnóstico de situación del Programa Nacional y Programas Provinciales**, 1 edn. Buenos Aires Organización Panamericana de la Salud - OPS; 2010.
33. Hultborn KA, Larsson LG, Ragnhult I: **The lymph drainage from the breast to the axillary and parasternal lymph nodes, studied with the aid of colloidal Au198**. *Acta radiol* 1955, **43**(1):52-64.
34. Rosen PP: **Rosen's breast pathology**, 3rd edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
35. Junqueira LC, Carneiro J: **Histología básica**: Masson; 2000.
36. Netter FH: **Atlas of human anatomy**, 5th edn. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010.
37. Harris JR: **Diseases of the breast**, 4th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
38. Nagato T, Yoshida H, Yoshida A, Uehara Y: **A scanning electron microscope study of myoepithelial cells in exocrine glands**. *Cell Tissue Res* 1980, **209**(1):1-10.
39. Dupont WD, Page DL: **Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease**. *N Engl J Med* 1985, **312**(3):146-151.
40. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, Ghosh K, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Hillman DW *et al*: **Benign breast disease and the risk of breast cancer**. *N Engl J Med* 2005, **353**(3):229-237.
41. Simomoto MM, Nazario AC, Gebrim LH, Simoes MJ, Baracat EC, De Lima GR: **Morphometric Analysis of the Epithelium of Mammary Fibroadenomas During the Proliferative and Secretory Phases of the Menstrual Cycle**. *Breast J* 1999, **5**(4):256-261.
42. Schneider B, Laubenberger J, Kommos F, Madjar H, Grone K, Langer M: **Multiple giant fibroadenomas: clinical presentation and radiologic findings**. *Gynecol Obstet Invest* 1997, **43**(4):278-280.
43. Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS: **Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression**. *Am J Pathol* 2002, **160**(2):597-604.
44. Kelsey JL, Gammon MD: **The epidemiology of breast cancer**. *CA Cancer J Clin* 1991, **41**(3):146-165.
45. Wellings SR, Jensen HM: **On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast**. *J Natl Cancer Inst* 1973, **50**(5):1111-1118.
46. Betsill WL, Jr., Rosen PP, Lieberman PH, Robbins GF: **Intraductal carcinoma. Long-term follow-up after treatment by biopsy alone**. *JAMA* 1978, **239**(18):1863-1867.
47. Azzopardi JG, Ahmed A, Millis RR: **Problems in breast pathology**. *Major Probl Pathol* 1979, **11**:i-xvi, 1-466.
48. Kausar R, Ahmad Z: **Determination of toxic inorganic elements pollution in ground waters of Kahuta Industrial Triangle Islamabad, Pakistan using inductively coupled plasma mass spectrometry**. *Environ Monit Assess* 2009, **157**(1-4):347-354.

49. Edge SB, American Joint Committee on Cancer.: **AJCC cancer staging manual**, 7th edn. New York: Springer; 2010.
50. Ivens D, Hoe AL, Podd TJ, Hamilton CR, Taylor I, Royle GT: **Assessment of morbidity from complete axillary dissection**. *Br J Cancer* 1992, **66**(1):136-138.
51. Kissin MW, Querci della Rovere G, Easton D, Westbury G: **Risk of lymphoedema following the treatment of breast cancer**. *Br J Surg* 1986, **73**(7):580-584.
52. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ: **Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma**. *Arch Surg* 1992, **127**(4):392-399.
53. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL: **Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer**. *Ann Surg* 1994, **220**(3):391-398; discussion 398-401.
54. Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT: **Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe**. *Surg Oncol* 1993, **2**(6):335-339; discussion 340.
55. Giuliano AE: **Intradermal blue dye to identify sentinel lymph node in breast cancer**. *Lancet* 1997, **350**(9082):958.
56. Nason KS, Anderson BO, Byrd DR, Dunnwald LK, Eary JF, Mankoff DA, Livingston R, Schmidt RA, Jewell KD, Yeung RS *et al*: **Increased false negative sentinel node biopsy rates after preoperative chemotherapy for invasive breast carcinoma**. *Cancer* 2000, **89**(11):2187-2194.
57. Adair F, Berg J, Joubert L, Robbins GF: **Long-term followup of breast cancer patients: the 30-year report**. *Cancer* 1974, **33**(4):1145-1150.
58. Elston CW, Ellis IO: **Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up**. *Histopathology* 1991, **19**(5):403-410.
59. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO: **Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma**. *J Clin Oncol* 2008, **26**(19):3153-3158.
60. Fisher ER, Wang J, Bryant J, Fisher B, Mamounas E, Wolmark N: **Pathobiology of preoperative chemotherapy: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel (NSABP) protocol B-18**. *Cancer* 2002, **95**(4):681-695.
61. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF *et al*: **Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer**. *J Clin Oncol* 2002, **20**(17):3628-3636.
62. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, Nordgren H, Farmer P, Praz V, Haibe-Kains B *et al*: **Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis**. *J Natl Cancer Inst* 2006, **98**(4):262-272.
63. Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, Hinton CP, Blamey RW, Haybittle JL: **Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer**. *Br J Cancer* 1987, **56**(4):489-492.
64. Chen LL, Nolan ME, Silverstein MJ, Mihm MC, Jr., Sober AJ, Tanabe KK, Smith BL, Younger J, Michaelson JS: **The impact of primary tumor size, lymph node status, and other prognostic factors on the risk of cancer death**. *Cancer* 2009, **115**(21):5071-5083.
65. Van Belle V, Decock J, Hendrickx W, Brouckaert O, Pintens S, Moerman P, Wildiers H, Paridaens R, Christiaens MR, Van Huffel S *et al*: **Short-Term Prognostic Index for Breast Cancer: NPI or Lpi**. *Patholog Res Int* 2010, **2011**:918408.
66. Gilleard O, Goodman A, Cooper M, Davies M, Dunn J: **The significance of the Van Nuys prognostic index in the management of ductal carcinoma in situ**. *World J Surg Oncol* 2008, **6**:61.

67. Fleming ST, Rastogi A, Dmitrienko A, Johnson KD: **A comprehensive prognostic index to predict survival based on multiple comorbidities: a focus on breast cancer.** *Med Care* 1999, **37**(6):601-614.
68. Clarke RB: **Steroid receptors and proliferation in the human breast.** *Steroids* 2003, **68**(10-13):789-794.
69. Adami HO, Graffman S, Lindgren A, Sallstrom J: **Prognostic implication of estrogen receptor content in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 1985, **5**(3):293-300.
70. **Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.** *Lancet* 2005, **365**(9472):1687-1717.
71. Bardou V-J, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM: **Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases.** *Journal of Clinical Oncology* 2003, **21**(10):1973-1979.
72. Walker RA: **Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer.** *J Clin Pathol* 2008, **61**(6):689-696.
73. Zafrani B, Aubriot MH, Mouret E, De Cremoux P, De Rycke Y, Nicolas A, Boudou E, Vincent-Salomon A, Magdelenat H, Sastre-Garau X: **High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinoma: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases.** *Histopathology* 2000, **37**(6):536-545.
74. Qureshi A, Pervez S: **Allred scoring for ER reporting and its impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers.** *J Pak Med Assoc* 2010, **60**(5):350-353.
75. Qureshi A, Ahmad Z, Azam M, Idrees R: **Epidemiological data for common bone sarcomas.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2010, **11**(2):393-395.
76. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM: **Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.** *Mod Pathol* 1998, **11**(2):155-168.
77. Menard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM: **Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma.** *J Cell Physiol* 2000, **182**(2):150-162.
78. Gullick WJ, Srinivasan R: **The type 1 growth factor receptor family: new ligands and receptors and their role in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 1998, **52**(1-3):43-53.
79. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A *et al*: **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2007, **25**(1):118-145.
80. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF: **When Is a Tumor Marker Ready for Prime Time? A Case Study of c-erbB-2 as a Predictive Factor in Breast Cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2001, **19**(8):2334-2356.
81. Engel RH, Kaklamani VG: **HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies.** *Drugs* 2007, **67**(9):1329-1341.
82. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 1987, **235**(4785):177-182.
83. O'Donovan PJ, Livingston DM: **BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(6):961-967.
84. Gajria D, Chandarlapaty S: **HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2011, **11**(2):263-275.

85. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA *et al*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.
86. Aebi S, Sun Z, Braun D, Price KN, Castiglione-Gertsch M, Rabaglio M, Gelber RD, Crivellari D, Lindtner J, Snyder R *et al*: **Differential efficacy of three cycles of CMF followed by tamoxifen in patients with ER-positive and ER-negative tumors: Long-term follow up on IBCSG Trial IX.** *Ann Oncol* 2011, **22**(9):1981-1987.
87. Wo JY, Taghian AG, Nguyen PL, Raad RA, Sreedhara M, Bellon JR, Wong JS, Gadd MA, Smith BL, Harris JR: **The association between biological subtype and isolated regional nodal failure after breast-conserving therapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010, **77**(1):188-196.
88. Bild AH, Parker JS, Gustafson AM, Acharya CR, Hoadley KA, Anders C, Marcom PK, Carey LA, Potti A, Nevins JR *et al*: **An integration of complementary strategies for gene-expression analysis to reveal novel therapeutic opportunities for breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**(4):R55.
89. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ: **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Ann Oncol* 2011, **22**(8):1736-1747.
90. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J *et al*: **Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(30):10604-10609.
91. Waddington CH: **An introduction to modern genetics.** New York,: The Macmillan company; 1939.
92. Waddington CH: **The epigenetics of birds.** Cambridge Eng.: University Press; 1952.
93. Issa JP: **CpG-island methylation in aging and cancer.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2000, **249**:101-118.
94. Jones PA, Takai D: **The role of DNA methylation in mammalian epigenetics.** *Science* 2001, **293**(5532):1068-1070.
95. Jones PA, Laird PW: **Cancer epigenetics comes of age.** *Nat Genet* 1999, **21**(2):163-167.
96. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekstrom TJ, Harris TB *et al*: **Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering.** *JAMA* 2008, **299**(24):2877-2883.
97. Flanagan JM, Pependikyte V, Pozdniakovaite N, Sobolev M, Assadzadeh A, Schumacher A, Zangeneh M, Lau L, Virtanen C, Wang SC *et al*: **Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells.** *Am J Hum Genet* 2006, **79**(1):67-84.
98. Cardoso MC, Leonhardt H: **DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development.** *J Cell Biol* 1999, **147**(1):25-32.
99. Hsieh CL: **In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(12):8211-8218.
100. Klose RJ, Bird AP: **Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.** *Trends Biochem Sci* 2006, **31**(2):89-97.
101. Jaenisch R, Bird A: **Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.** *Nat Genet* 2003, **33** Suppl:245-254.
102. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermuller J, Hofacker IL *et al*: **RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription.** *Science* 2007, **316**(5830):1484-1488.
103. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Res* 2009, **19**(1):92-105.

104. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** *Nature* 2001, **411**(6836):494-498.
105. Seto AG, Kingston RE, Lau NC: **The coming of age for Piwi proteins.** *Mol Cell* 2007, **26**(5):603-609.
106. Bachellerie JP, Cavaille J, Huttenhofer A: **The expanding snoRNA world.** *Biochimie* 2002, **84**(8):775-790.
107. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA: **microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.** *Dev Biol* 2007, **302**(1):1-12.
108. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**(6648):251-260.
109. Spencer VA, Davie JR: **Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression.** *Gene* 1999, **240**(1):1-12.
110. Garcia-Ramirez M, Rocchini C, Ausio J: **Modulation of chromatin folding by histone acetylation.** *J Biol Chem* 1995, **270**(30):17923-17928.
111. Akbarian S, Huang HS: **Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation.** *Biol Psychiatry* 2009, **65**(3):198-203.
112. Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ: **Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors.** *Cell* 1991, **65**(5):775-783.
113. Gill G: **SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?** *Genes Dev* 2004, **18**(17):2046-2059.
114. Messner S, Altmeyer M, Zhao H, Pozivil A, Roschitzki B, Gehrig P, Rutishauser D, Huang D, Caflisch A, Hottiger MO: **PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(19):6350-6362.
115. Sakabe K, Wang Z, Hart GW: **Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(46):19915-19920.
116. Workman JL, Kingston RE: **Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:545-579.
117. Davie JR, Chadee DN: **Regulation and regulatory parameters of histone modifications.** *J Cell Biochem Suppl* 1998, **30-31**:203-213.
118. Cortez CC, Jones PA: **Chromatin, cancer and drug therapies.** *Mutat Res* 2008, **647**(1-2):44-51.
119. Hendrich B, Bird A: **Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(11):6538-6547.
120. Ooi SL, Henikoff S: **Germline histone dynamics and epigenetics.** *Curr Opin Cell Biol* 2007, **19**(3):257-265.
121. Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T, Miyamoto K: **Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome.** *Genome Res* 2003, **13**(5):868-874.
122. Wong CC, Caspi A, Williams B, Craig IW, Houts R, Ambler A, Moffitt TE, Mill J: **A longitudinal study of epigenetic variation in twins.** *Epigenetics* 2010, **5**(6):516-526.
123. Waterland RA, Michels KB: **Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis.** *Annu Rev Nutr* 2007, **27**:363-388.
124. Barker DJ: **In utero programming of chronic disease.** *Clin Sci (Lond)* 1998, **95**(2):115-128.
125. Dumont N, Wilson MB, Crawford YG, Reynolds PA, Sigaroudinia M, Tlsty TD: **Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(39):14867-14872.
126. Esteller M: **DNA methylation : approaches, methods, and applications.** Boca Raton: CRC Press; 2005.
127. Esteller M: **Epigenetics in cancer.** *N Engl J Med* 2008, **358**(11):1148-1159.

128. Fraga MF, Esteller M: **Towards the human cancer epigenome: a first draft of histone modifications.** *Cell Cycle* 2005, **4**(10):1377-1381.
129. Aporntheastan C, Phokaew C, Piriyaopngsa J, Ngamphiw C, Ittiwut C, Tongsimma S, Mutirangura A: **Hypomethylation of intragenic LINE-1 represses transcription in cancer cells through AGO2.** *PLoS One* 2011, **6**(3):e17934.
130. Suzuki S, Ono R, Narita T, Pask AJ, Shaw G, Wang C, Kohda T, Alsop AE, Marshall Graves JA, Kohara Y *et al*: **Retrotransposon silencing by DNA methylation can drive mammalian genomic imprinting.** *PLoS Genet* 2007, **3**(4):e55.
131. Jahner D, Stuhlmann H, Stewart CL, Harbers K, Lohler J, Simon I, Jaenisch R: **De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis.** *Nature* 1982, **298**(5875):623-628.
132. Ferguson-Smith AC, Surani MA: **Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes.** *Science* 2001, **293**(5532):1086-1089.
133. Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, Morita S, Yamada K, Ito M, Ferguson-Smith AC, Kono T: **High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos.** *Nat Biotech* 2007, **25**(9):1045-1050.
134. Riggs AD, Xiong Z: **Methylation and epigenetic fidelity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(1):4-5.
135. Escamilla-Del-Arenal M, da Rocha ST, Heard E: **Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation.** *Hum Genet* 2011, **130**(2):307-327.
136. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD: **DNA methylation in development and human disease.** *Mutat Res* 2008, **647**(1-2):30-38.
137. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC *et al*: **Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns.** *Nat Genet* 2000, **24**(2):132-138.
138. Esteller M: **Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer.** *Adv Exp Med Biol* 2003, **532**:39-49.
139. Fraga MF, Herranz M, Espada J, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Erkek E, Bozdogan O, Peinado H, Niveleau A *et al*: **A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors.** *Cancer Res* 2004, **64**(16):5527-5534.
140. Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaurs-Barriere C, Bignon YJ, Ramus S *et al*: **DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**(26):3001-3007.
141. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E: **Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene.** *Nature* 1999, **402**(6758):187-191.
142. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH: **Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.** *Trends Genet* 1997, **13**(8):335-340.
143. Biliya S, Bulla LA, Jr.: **Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2010, **235**(2):139-147.
144. Pageau GJ, Hall LL, Ganesan S, Livingston DM, Lawrence JB: **The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(8):628-633.
145. Sun W, Liu Y, Glazer CA, Shao C, Bhan S, Demokan S, Zhao M, Rudek MA, Ha PK, Califano JA: **TKTL1 Is Activated by Promoter Hypomethylation and Contributes to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Carcinogenesis through Increased Aerobic Glycolysis and HIF1 $\alpha$  Stabilization.** *Clinical Cancer Research* 2010, **16**(3):857-866.
146. Tao L, Yang S, Xie M, Kramer PM, Pereira MA: **Effect of trichloroethylene and its metabolites, dichloroacetic acid and trichloroacetic acid, on the methylation and expression of c-Jun and c-**

- Myc protooncogenes in mouse liver: prevention by methionine.** *Toxicol Sci* 2000, **54**(2):399-407.
147. Cheng L, Zhang DY: **Molecular genetic pathology:** Humana; 2008.
148. Rao-Bindal K, Kleinerman ES: **Epigenetic regulation of apoptosis and cell cycle in osteosarcoma.** *Sarcoma* 2011, **2011**:679457.
149. Schwabe M, Lubbert M: **Epigenetic lesions in malignant melanoma.** *Curr Pharm Biotechnol* 2007, **8**(6):382-387.
150. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarsdottir H, Olafsdottir G, Esteller M, Johannsson OT, Eyfjord JE: **CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer.** *Epigenetics* 2011, **6**(5):638-649.
151. Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, Battagli C, Ehya H, Klein-Szanto A, Cairns P: **Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(1 Pt 1):28-32.
152. Vasiljevic NA, Wu K, Brentnall AR, Kim DC, Thorat MA, Kudahetti SC, Mao X, Xue L, Yu Y, Shaw GL *et al*: **Absolute quantitation of DNA methylation of 28 candidate genes in prostate cancer using pyrosequencing.** *Dis Markers* 2011, **30**(4):151-161.
153. Widschwendter M, Berger J, Hermann M, Muller HM, Amberger A, Zeschnigk M, Widschwendter A, Abendstein B, Zeimet AG, Daxenbichler G *et al*: **Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2000, **92**(10):826-832.
154. Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG: **Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression.** *J Biol Chem* 2000, **275**(4):2727-2732.
155. Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR: **Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers.** *Cancer Res* 1999, **59**(4):798-802.
156. Deng D, Liu Z, Du Y: **Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers.** *Adv Genet* 2010, **71**:125-176.
157. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP: **CpG island methylator phenotype in colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(15):8681-8686.
158. Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, Henrique R, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Sidransky D: **Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(27):6569-6575.
159. Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, de Maat MF, Morton DL, Hoon DS: **CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(5):1801-1807.
160. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L *et al*: **MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.** *N Engl J Med* 2005, **352**(10):997-1003.
161. Glasspool RM, Teodoridis JM, Brown R: **Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance.** *Br J Cancer* 2006, **94**(8):1087-1092.
162. Szyf M: **Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009, **49**:243-263.
163. Oki Y, Aoki E, Issa JP: **Decitabine--bedside to bench.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2007, **61**(2):140-152.
164. Smerage JB, Hayes DF: **The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer.** *Br J Cancer* 2006, **94**(1):8-12.

165. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D *et al*: **Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques.** *Blood* 1993, **82**(9):2605-2610.
166. Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, Jackson S, Hortobagyi GN, Fritsche H, Cristofanilli M: **Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system?** *Cancer* 2008, **113**(9):2422-2430.
167. Mandel P, Metais P: **[Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme].** *C R Acad Sci Paris* 1948, **142**(3-4):241-243.
168. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG: **Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus.** *J Clin Invest* 1966, **45**(11):1732-1740.
169. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ: **Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy.** *Cancer Res* 1977, **37**(3):646-650.
170. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M: **Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients.** *Oncology* 1989, **46**(5):318-322.
171. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL: **Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994, **3**(1):67-71.
172. Davis GL, Jr., Davis JSt: **Detection of circulating DNA by counterimmunoelectrophoresis (CIE).** *Arthritis Rheum* 1973, **16**(1):52-58.
173. Roach HI, Bronner F, Oreffo ROC: **Epigenetic Aspects of Chronic Diseases:** Springer; 2011.
174. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: **Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(18):9821-9826.
175. Moore T: **Southern analysis using methyl-sensitive restriction enzymes.** *Methods Mol Biol* 2001, **181**:193-203.
176. Espada J, Ballestar E, Fraga MF, Villar-Garea A, Juarranz A, Stockert JC, Robertson KD, Fuks F, Esteller M: **Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern.** *J Biol Chem* 2004, **279**(35):37175-37184.
177. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA *et al*: **DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22.** *Nat Genet* 2006, **38**(12):1378-1385.
178. Xiong Z, Laird PW: **COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(12):2532-2534.
179. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW: **MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(8):E32.
180. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A: **Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(14):e128.
181. Kuo KC, McCune RA, Gehrke CW, Midgett R, Ehrlich M: **Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA.** *Nucleic Acids Res* 1980, **8**(20):4763-4776.
182. Fraga MF, Rodriguez R, Canal MJ: **Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 2000, **21**(14):2990-2994.
183. Vanderpool HY: **The ethics of research involving human subjects : facing the 21st century.** Frederick, Md.: University Pub. Group; 1996.

184. Marzese DM, Gago FE, Vargas-Roig LM, Roque M: **Simultaneous analysis of the methylation profile of 26 cancer related regions in invasive breast carcinomas by MS-MLPA and drMS-MLPA.** *Mol Cell Probes* 2010, **24**(5):271-280.
185. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: **Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(25):14863-14868.
186. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC *et al*: **Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(16):9212-9217.
187. Balding DJ, Bishop MJ, Cannings C: **Handbook of statistical genetics**, 3rd edn. Chichester, England ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2007.
188. Siegmund KD, Laird PW, Laird-Offringa IA: **A comparison of cluster analysis methods using DNA methylation data.** *Bioinformatics* 2004, **20**(12):1896-1904.
189. Hastie T, Tibshirani R, Eisen MB, Alizadeh A, Levy R, Staudt L, Chan WC, Botstein D, Brown P: **'Gene shaving' as a method for identifying distinct sets of genes with similar expression patterns.** *Genome Biol* 2000, **1**(2):RESEARCH0003.
190. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, Golub TR: **Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(6):2907-2912.
191. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M *et al*: **TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis.** *Biotechniques* 2003, **34**(2):374-378.
192. Marzese DM, Mampel A, Gomez LC, Echeverria MI, Vargas AL, Ferreiro V, Giliberto F, Roque M: **Detection of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene by the molecular method MLPA in the first Argentine affected families.** *Genet Mol Res* 2008, **7**(1):223-233.
193. Ferreiro V, Giliberto F, Muniz GM, Francipane L, Marzese DM, Mampel A, Roque M, Frechtel GD, Szijan I: **Asymptomatic Becker muscular dystrophy in a family with a multiexon deletion.** *Muscle Nerve* 2009, **39**(2):239-243.
194. Li J, Zhang Z, Bidder M, Funk MC, Nguyen L, Goodfellow PJ, Rader JS: **IGSF4 promoter methylation and expression silencing in human cervical cancer.** *Gynecol Oncol* 2005, **96**(1):150-158.
195. Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, van Rietschoten JG, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenbergen RD: **Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis.** *Br J Cancer* 2007, **97**(10):1457-1464.
196. Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, Allemanni G, Margallo E, Gatteschi B, Romani M: **p16(INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma.** *Int J Cancer* 2005, **114**(3):414-421.
197. Marzese D, Gago F, Orozco J, Tello O, Roque M, Vargas-Roig L: **Aberrant DNA methylation of cancer-related genes in giant breast fibroadenoma: a case report.** *Journal of Medical Case Reports* 2011, **5**(1):516.
198. Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, Prencipe M, Scintu M, Apicella A, Rossiello R, Liguoro G, Seripa D, Gravina C *et al*: **Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(16):5349-5354.
199. Yan PS, Efferth T, Chen HL, Lin J, Rodel F, Fuzesi L, Huang TH: **Use of CpG island microarrays to identify colorectal tumors with a high degree of concurrent methylation.** *Methods* 2002, **27**(2):162-169.

200. Berneman ZN, Raeymaekers P, Vanhoof G, Van Bockstaele D, Ramael M, Peetermans ME, Vandenberghe A, Van Broeckhoven C: **DNA fingerprints revealing common and divergent human DNA methylation patterns.** *FEBS Lett* 1989, **255**(2):226-230.
201. Yan PS, Shi H, Rahmatpanah F, Hsiau TH, Hsiau AH, Leu YW, Liu JC, Huang TH: **Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer.** *Cancer Res* 2003, **63**(19):6178-6186.
202. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B: **Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(6):2156-2162.
203. Ponomaryova AA, Rykova EY, Cherdynseva NV, Skvortsova TE, Dobrodeev AY, Zav'yalov AA, Tuzikov SA, Vlassov VV, Laktionov PP: **RARBeta2 gene methylation level in the circulating DNA from blood of patients with lung cancer.** *Eur J Cancer Prev* 2011, **20**(6):453-455.
204. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: **Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**(6):426-437.
205. Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, Hoon DS: **Analysis of methylated circulating DNA in cancer patients' blood.** *Methods Mol Biol* 2009, **507**:349-356.
206. Van der Auwera I, Bovie C, Svensson C, Limame R, Trinh XB, van Dam P, Van Laere SJ, Van Marck E, Vermeulen PB, Dirix LY: **Quantitative assessment of DNA hypermethylation in the inflammatory and non-inflammatory breast cancer phenotypes.** *Cancer Biol Ther* 2009, **8**(23):2252-2259.
207. Shen L, Catalano PJ, Benson AB, 3rd, O'Dwyer P, Hamilton SR, Issa JP: **Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil based chemotherapy.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(20):6093-6098.
208. Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignot P, Rat P, Bouvier AM, Laurent-Puig P, Faivre J *et al*: **Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases.** *Cancer Res* 2008, **68**(20):8541-8546.
209. Ogino S, Meyerhardt JA, Kawasaki T, Clark JW, Ryan DP, Kulke MH, Enzinger PC, Wolpin BM, Loda M, Fuchs CS: **CpG island methylation, response to combination chemotherapy, and patient survival in advanced microsatellite stable colorectal carcinoma.** *Virchows Arch* 2007, **450**(5):529-537.
210. Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B: **CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(8):2898-2903.
211. Tournier B, Chapusot C, Courcet E, Martin L, Lepage C, Faivre J, Piard F: **Why do results conflict regarding the prognostic value of the methylation status in colon cancers? the role of the preservation method.** *BMC Cancer*, **12**:12.
212. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A: **Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**(13):e65.
213. Decarlo K, Emley A, Dadzie OE, Mahalingam M: **Laser capture microdissection: methods and applications.** *Methods Mol Biol* 2011, **755**:1-15.
214. Funel N, Giovannetti E, Pollina LE, del Chiaro M, Mosca F, Boggi U, Campani D: **Critical role of laser microdissection for genetic, epigenetic and proteomic analyses in pancreatic cancer.** *Expert Rev Mol Diagn* 2011, **11**(7):695-701.
215. Ando Y, Iwase H, Ichihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Karamatsu S, Mitsuyama S *et al*: **Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast.** *Cancer Lett* 2000, **156**(2):207-214.

216. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P *et al*: **Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing.** *N Engl J Med* 2012, **366**(10):883-892.
217. Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S *et al*: **Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**(9):691-699.
218. Krop IE, Sgroi D, Porter DA, Lunetta KL, LeVangie R, Seth P, Kaelin CM, Rhei E, Bosenberg M, Schnitt S *et al*: **HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, **98**(17):9796-9801.
219. Lewis CM, Cler LR, Bu D-W, Zöchbauer-Müller S, Milchgrub S, Naftalis EZ, Leitch AM, Minna JD, Euhus DM: **Promoter Hypermethylation in Benign Breast Epithelium in Relation to Predicted Breast Cancer Risk.** *Clinical Cancer Research* 2005, **11**(1):166-172.
220. Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H, Tanaka H: **Demonstration of polyclonal origin of giant fibroadenoma of the breast.** *Virchows Arch* 1995, **427**(3):343-347.
221. Eroles P, Bosch A, Alejandro Perez-Fidalgo J, Lluch A: **Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways.** *Cancer Treat Rev* 2011.
222. Gatz ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, Datto MB, Kelley M, Mathey-Prevot B, Potti A *et al*: **A pathway-based classification of human breast cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(15):6994-6999.
223. Shivapurkar N, Wilson MJ, Hoover KL, Mikol YB, Creasia D, Poirier LA: **Hepatic DNA methylation and liver tumor formation in male C3H mice fed methionine- and choline-deficient diets.** *J Natl Cancer Inst* 1986, **77**(1):213-217.
224. Wilson MJ, Shivapurkar N, Poirier LA: **Hypomethylation of hepatic nuclear DNA in rats fed with a carcinogenic methyl-deficient diet.** *Biochem J* 1984, **218**(3):987-990.
225. Minamoto T, Mai M, Ronai Z: **Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis.** *Carcinogenesis* 1999, **20**(4):519-527.
226. McGowan PO, Meaney MJ, Szyf M: **Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior.** *Brain Res* 2008, **1237**:12-24.
227. Barrès R, Yan J, Egan B, Treebak Jonas T, Rasmussen M, Fritz T, Caidahl K, Krook A, O'Gorman Donal J, Zierath Juleen R: **Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle.** *Cell metabolism* 2012, **15**(3):405-411.
228. Eilers T, Machtens S, Tezval H, Blaue C, Lichtinghagen R, Hagemann J, Jonas U, Serth J: **Prospective diagnostic efficiency of biopsy washing DNA GSTP1 island hypermethylation for detection of adenocarcinoma of the prostate.** *Prostate* 2007, **67**(7):757-763.
229. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG: **A gene hypermethylation profile of human cancer.** *Cancer Res* 2001, **61**(8):3225-3229.
230. Yang HJ, Liu VW, Wang Y, Tsang PC, Ngan HY: **Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data.** *BMC Cancer* 2006, **6**:212.
231. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris CC, McLellan MD, Fulton RS, Fulton LL *et al*: **Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft.** *Nature* 2010, **464**(7291):999-1005.
232. Turajlic S, Furney SJ, Lambros MB, Mitsopoulos C, Kozarewa I, Geyer FC, MacKay A, Hakas J, Zvelebil M, Lord CJ *et al*: **Whole genome sequencing of matched primary and metastatic acral melanomas.** *Genome Research* 2012, **22**(2):196-207.
233. Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, Cantos B, Provencio M, Espana P, Bonilla F: **Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer.** *Genes Chromosomes Cancer* 2004, **41**(2):117-124.

234. Yan PS, Perry MR, Laux DE, Asare AL, Caldwell CW, Huang TH: **CpG island arrays: an application toward deciphering epigenetic signatures of breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(4):1432-1438.
235. Hayes DF: **Serum (circulating) tumor markers for breast cancer.** *Recent Results Cancer Res* 1996, **140**:101-113.
236. Hahn WC, Weinberg RA: **Rules for making human tumor cells.** *N Engl J Med* 2002, **347**(20):1593-1603.
237. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat Med* 2004, **10**(8):789-799.
238. Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E: **Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis.** *Science* 1965, **148**(3668):374-376.
239. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R: **Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines.** *Cancer Res* 1997, **57**(5):808-811.
240. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP: **Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype.** *Cancer Res* 1999, **59**(21):5438-5442.
241. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, DeMeester TR, Skinner KA *et al*: **Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma.** *Cancer Res* 2001, **61**(8):3410-3418.
242. Shen L, Ahuja N, Shen Y, Habib NA, Toyota M, Rashid A, Issa JP: **DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**(10):755-761.
243. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R: **Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients.** *Life Sci* 2010, **87**(3-4):83-91.
244. Van der Auwera I, Elst HJ, Van Laere SJ, Maes H, Huget P, van Dam P, Van Marck EA, Vermeulen PB, Dirix LY: **The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients.** *Br J Cancer* 0000, **100**(8):1277-1286.
245. FOX BP, KANDPAL RP: **DNA-Based Assay for EPHB6 Expression in Breast Carcinoma Cells as a Potential Diagnostic Test for Detecting Tumor Cells in Circulation.** *Cancer Genomics - Proteomics* 2010, **7**(1):9-16.
246. Rykova EY, Tsvetovskaya GA, Sergeeva GI, Vlassov VV, Laktionov PP: **Methylation-Based Analysis of Circulating DNA for Breast Tumor Screening.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, **1137**(1):232-235.
247. Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, Wood T, Jeronimo C, Rosenbaum E, Stern J *et al*: **Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(26):4262-4269.

**PUBLICACIONES QUE REFLEJAN EL TRABAJO  
DE TESIS**

- 1- Marzese DM, Gago FE, Orozco JO, Tello OM, Roque M, Vargas-Roig LM. Aberrant DNA methylation of cancer-related genes in giant breast fibroadenoma: a case report. *J Med Case Reports*. 2011 Oct 18;5(1):516. [Epub ahead of print].
- 2- Marzese DM, Gago FE, Vargas-Roig LM, Roqué M. Simultaneous analysis of the methylation profile of 26 cancer related regions in invasive breast carcinomas by MS-MLPA and drMS-MLPA. *Mol Cell Probes*. 2010 Oct;24(5):271-80. Epub 2010 Jun 16.
- 3- Marzese DM, Mampel A, Gomez LC, Echeverria MI, Vargas AL, Ferreiro V, Giliberto F, Roqué M. Detection of deletions and duplications in the Duchenne muscular dystrophy gene by the molecular method MLPA in the first Argentine affected families. *Genet Mol Res*. 2008 Mar 11;7(1):223-33.

# **ANEXOS**



*Universidad Nacional de Cuyo*



"2006 - Año de homenaje al Dr. Ramón CARRILLO"

MENDOZA, 11 de setiembre de 2006

Señora  
Dra. María **ROQUÉ MORENO**  
Área Biología Celular y Molecular  
S. \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ D.

Me dirijo a usted a fin de comunicarle que el Comité de Bioética de la Facultad, en su última reunión, ha evaluado positivamente el Proyecto de Investigación denominado "**Estudio del silenciamiento epigenético de genes tumoresupresores en cáncer de mama como posible marcador tumoral**" de las autoras Dras. María ROQUE MORENO y Laura María VARGAS ROIG.

Sin otro particular lo saludo con mi mayor consideración.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "R. Piezzi".

Dr. Ramón S. **PIEZZI**  
Profesor Emérito de la UNCuyo  
Presidente Comité Bioética FCM

**Consentimiento para participar en el proyecto de investigación sobre  
ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO DE GENES SUPRESORES TUMORALES EN  
TUMORES DE MAMA**

*Nombre*.....

*Fecha de nacimiento*..... *Documento tipo y N°*.....

*Domicilio*.....

*Teléfono*..... *e-mail*.....

*Código de identificación*.....

- Este formulario ha sido diseñado para asegurar que su consentimiento esté basado en la información.
- Por favor lea y considere cada sección cuidadosamente.

### **Objetivo**

El 90% de los tumores que se producen en el ser humano poseen una alteración **epigenética** (es decir una modificación que el medio intracelular produce en el ADN y que es reversible). El conocimiento de los procesos epigenéticos involucrados en la formación de los tumores de mama puede ser la base para mejorar el diagnóstico de esta enfermedad y desarrollar mejores tratamientos.

### **Procedimiento**

Si elige participar en este estudio:

a) autoriza (en el caso de que corresponda) al investigador responsable para que tenga acceso a las muestras de tejido que han sido examinadas previamente para poder diagnosticar su enfermedad.

b) autoriza (en el caso de que corresponda) a que se congele, en el momento de la cirugía que se le realice, parte del tejido tumoral y del tejido normal del margen de resección quirúrgica; dicho procedimiento es inocuo.

c) autoriza a que se le extraiga una muestra de sangre periférica por punción venosa (3 mL) antes de la cirugía, después de iniciado el tratamiento adyuvante correspondiente y/o durante los controles que indique su médico.

### **Consentimiento general**

- Confirmando que recibí una copia firmada del presente formulario.
- Entiendo que los investigadores conducirán este estudio en conformidad con los principios éticos y científicos de la declaración de Helsinki.
- Los objetivos y exigencias generales de este estudio me han sido explicados.
- Entiendo que no habrá costos adicionales si decido participar, ni ningún beneficio económico.
- He tenido la posibilidad de considerar participar o no.

- Entiendo que la información obtenida durante el curso de esta investigación puede ser publicada en una forma que no permitirá identificar a los participantes.
- Considero que la información obtenida acerca de mí durante el curso de este estudio forme parte de una base de datos (registro). Entiendo que la información personal que yo provea será confidencial y será sólo identificable por un código.

**Consentimiento para investigación**

- ..... (investigador, médico o profesional de la salud) me ha explicado y he comprendido las implicancias de la participación en este estudio de investigación.
- He tenido la oportunidad de hacer preguntas.
- Estoy satisfecha con la explicación y respuestas a mis preguntas.
- Consiento que la información de mi historia clínica sea suministrada por los médicos y hospitales correspondientes.

.....  
Firma y aclaración del sujeto  
que participará en el estudio

.....  
Firma y aclaración del testigo  
DNI

.....  
Firma y aclaración del investigador  
DNI

**HISTORIA CLÍNICA**  
**ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO DE GENES SUPRESORES TUMORALES**  
**EN TUMORES DE MAMA HUMANO**

Apellido:..... Nombres:..... CM:.....  
Fecha de nacimiento:..... Lugar:..... Edad:.....años  
Dirección:.....  
Teléfono:..... E-mail:.....  
Estado civil:..... Ocupación:.....  
Antecedentes familiares de tumores de mama: .....

**HISTORIA REPRODUCTIVA:**

Edad de menarca:.....años RM:...../.....  
Anticonceptivos:  
Gestas: Para: EPP:.....años EUP:.....años Lactancia:.....  
Edad menopausia:.....años FUM:  
Terapia hormonal de reemplazo:.....

**DATOS DE LA ENFERMEDAD:**

Mama: D I Focos:  
Estadío Clínico (TNM):  
Tipo de cirugía: Fecha:  
Ganglio centinela:  
Hospital: Cirujano:

**MATERIAL OBTENIDO:**

Tejido tumoral: CMT Tejido normal: CMN  
Sangre: CMS Pre-cirugía: ml  
Post-cirugía: ml Fecha:  
Otro:

**INFORME ANATOMO-PATOLÓGICO:**

Anatomo patólogo:  
Tipo tumoral:  
Taco N°: pTNM: Tamaño: Ganglios linfáticos:  
Grado diferenciación: Grado mitótico: Grado nuclear:  
Infiltrado Linfocitario: Elastosis: Microcalcificaciones:  
Invasión linfa.: Inv. hemática: Inv. perinuclear:  
Inv. muscular: Inv. Piel: Necrosis:  
Multicentricidad: Multifocalidad:  
Ganglios:...../..... Macrometástasis: Micrometástasis:

**PROTEOMA:**

ER: PR: Her2/neu: Bcl-2:  
p53: p170 PCNA: p-caderina: Otras:.....  
Neoplasma:.....

**TRATAMIENTO:**

Neoadyuvante:  
Adyuvante: RADIOTERAPIA  
QUMIOTERAPIA: Esquema  
Nº de ciclos:  
HORMONOTERAPIA