



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

FRECUENCIAS Y EXPRESIÓN DEL POLIMORFISMO FUNCIONAL *ALA677VAL*
DEL GEN *MTHFR* EN POBLACIÓN ECUATORIANA CON CÁNCER DE MAMA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesora Guía

María Eugenia Sánchez Navarro Msc

Autora

Carolina Estefanía Echeverría Andrade

Año

2015

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Eugenia Sánchez Navarro
Msc en Docencia Universitaria e Investigación Educativa
C.C. 1709576845

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Carolina Estefanía Echeverría Andrade
C.C. 1002578746

DEDICATORIA

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”

Madre Teresa De Calcuta

A mi familia y Andrés por su apoyo incondicional y amor infinito. A mi abuelita Enma, por ser mi fuente de inspiración y por haber sido una gran guerrera enfrentando esta enfermedad, te quiero mucho mi ángel guardián.

AGRADECIMIENTOS

No podría haber sido posible realizar este hermoso sueño si no fuese por el apoyo de toda mi familia

Un agradecimiento al Dr. César Paz-y-Miño por abrirme las puertas del Instituto, y por ayudarme a crecer profesionalmente durante estos tres años.

Gracias Mariu por haber aceptado ser mi tutor de tesis, y por todo tu tiempo que dedicaste en leer y corregir este trabajo.

No podía olvidarme de mis amigas de toda la vida, Katy y Michelle, gracias por brindarme su valiosa y sincera amistad

RESUMEN

El cáncer de mama es una de las enfermedades más letales para la mujer si no se llega a tratar con tiempo. Las variaciones en genes involucrados en el metabolismo de los folatos, se consideran como factores de riesgo en desarrollar enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer, en donde el cáncer de mama encaja perfectamente. El gen MTHFR codifica a la enzima metilentetrahidrofolato reductasa, principal donador del grupo metilo, que servirá para la protección y síntesis de proteínas y ADN. Al existir polimorfismos en el codón C677T del gen MTHFR, se generará cambios nucleotídicos, cambiando la estructura proteica y por ende desencadenará problemas en la reparación y metilación del ADN. Para poder determinar la asociación de este polimorfismo con del riesgo a desarrollar cáncer de mama en población ecuatoriana, se realizó una PCR-RFLP con 309 mujeres ecuatorianas, de las cuales 114 mujeres fueron diagnosticadas previamente con cáncer mamario y 195 mujeres sanas, que fueron tomadas como controles. Así mismo se estudió la expresión génica de 32 mujeres, las cuales fueron divididas en dos grupos según su patrón de receptores hormonales. Datos obtenidos de los historiales clínicos fueron asociados con la presencia del polimorfismo, mediante diferentes pruebas estadísticas. No se pudo obtener diferencias estadísticas altamente significativas entre los genotipos y los diferentes aspectos que fueron tomados en cuenta dentro del historial clínico. Si se observó una relación estadísticamente significativa entre los genotipos de casos y controles. Mujeres con el genotipo mutado T/T presentan 2,9 veces más riesgo de desarrollar cáncer de mama, a comparación de las mujeres heterocigotas C/T que presentan 1,8 veces más riesgo. Esto sugiere que si existe una relación entre este polimorfismo y el cáncer de mama dentro de la población ecuatoriana.

Palabras clave: Ácido fólico, cáncer de mama, gen MTHFR, metilación.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most lethal diseases for women if is not treat it on time. The mutations on genes which are involved into the folate pathway are considered risk factors of developing cardiovascular diseases and different types of cancer, where the breast cancer fits. The MTHFR gene encodes an enzyme called methylenetetrahydrofolate reductase, which is the main methyl donor group, who will protect proteins and DNA. If a polymorphisms is detected into the codon C677T of the MTHFR gene, this change will produce a configuration to the protein structure and therefore problems in the reparation and DNA methylation. Nevertheless, to determine the association between polymorphisms with breast cancer risk for Ecuadorian population, it was performed a PCR-RFLP with a total of 309 samples for this research, of which 114 samples were diagnosed with breast cancer and 195 samples were performed as a control. In the same study, it was studied also gene expression of 32 breast tissue samples, which were divided into two groups, according to their hormonal pattern. Clinical histories and dates were analyzed with the presence of the polymorphism through statistical analysis. It could not obtain high statistical significances between genotypes and different aspects that were taken from the clinical histories. It was observed a tight relationship between cases and controls. Women who had the T/T genotype present 2, 9 more risk to develop breast cancer compared to the heterozygous women C/T who present a risk of 1, 8. These suggest that it exist a strong link between the polymorphism and breast cancer into the Ecuadorian women population.

Key words: Breast cancer, MTHFR gene, folic acid, methylation.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	3
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER.....	5
2.2 CÁNCER DE MAMA.....	7
2.2.1. Epidemiología del Cáncer de mama.....	9
2.2.2. Etiología del Cáncer de mama.....	10
2.2.3. Estadios Tumorales	14
2.2.4. Clasificación del Cáncer de mama.....	15
2.3. GENES DE METILACIÓN	17
2.3.1. Gen Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR).....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA.....	21
3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	22
3.3 EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO	23
3.3.1. Extracción del ADN a partir de sangre periférica (PureLink™ Genomic DNA kit Invitrogen™).....	23
3.3.2. Extracción del ADN a partir de Tejido Tumoral Embebido en Parafina (PureLink™ Genomic DNA kit Invitrogen™).....	24
3.4 EXTRACCIÓN DEL ARN MENSAJERO (ARNm).....	26
3.4.1. Extracción y Purificación del ARNm a partir de Muestras de Tejido Tumoral y Tejido mamario sano Embebido en Parafina (PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit).....	27
3.5. OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)	29

3.6 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	30
3.6.1. Análisis Cualitativo.....	30
3.6.2. Análisis Cuantitativo.....	31
3.7 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO (GENOTYPING)	31
3.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
3.7.2. Digestión con Enzimas de restricción (RFLP: Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica).....	33
3.7.3 Análisis Genético Mediante Secuenciación Capilar.....	34
3.8 EXPRESIÓN GÉNICA	35
3.8.1 PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR)	36
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
4. RESULTADOS	40
4.1 HISTORIALES CLÍNICOS	40
4.1.1. Edad	40
4.1.2. Lateralidad	40
4.1.3. Estadio Tumoral.....	41
4.1.4. Clasificación Histopatológica y Molecular	41
4.1.5. Clasificación Inmunohistoquímica.....	41
4.2. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO, ARN MENSAJERO Y ADN COMPLEMENTARIO	42
4.3. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ADN, ARNm Y ADNc	42
4.4 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO	43
4.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	43
4.4.2. Digestión Enzimática	43
4.4.3. Secuenciación del ADN	44
4.5 FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS	45
4.5.1 C677T	45
4.6 EXPRESIÓN GÉNICA	45

4.6.1 Obtención de valores C_T del perfil inmunohistoquímico: RE+/RP+/HER-.....	45
4.6.2 Obtención de valores C_T del perfil inmunohistoquímico: RE-/RP-/HER-.....	46
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4.7.1. Equilibrio Hardy-Weinberg en la población de estudio.....	46
4.7.2. Prueba χ^2 entre individuos sanos y afectados.....	46
4.7.3. Prueba de Odds Ratio entre genotipos y población de estudio	47
4.7.4. Prueba de Odds Ratio entre genotipos y características histopatológicas	47
4.7.5. Prueba U-Mann Whitney entre valores C_T de sanos y afectados	48
5. DISCUSIÓN	49
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	60
6.1 Conclusiones.....	60
6.2 Recomendaciones	60
7. FIGURAS.....	63
8. TABLAS.....	77
REFERENCIAS	81
ANEXOS	98

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

El cáncer de mama consiste en la división exagerada y sin control de las células que se originan en el seno, desencadenando la formación de una protuberancia conocida comúnmente como tumor maligno en la glándula mamaria (American Cancer Society, 2014; Secretaría de Salud Pública, 2002, pp. 21-24; Almeida y Barry, 2010, pp.1-6). En términos generales, el desarrollo del cáncer de mama se debe a causas multifactoriales y epigenéticas como son: edad, ambiente contaminado, mala nutrición, falta de ejercicio, menarquía y menopausia precoz, ingesta de anticonceptivos, consumo de alcohol, periodo de lactancia y herencia genética. Estos factores desencadenan el desarrollo y acumulación de mutaciones y polimorfismos que conllevan a la formación de células neoplásicas en el tejido mamario (González et al., 2007; Stankova, Lawrance y Rozen, 2008; Secretaría de Salud Pública, 2002, pp. 21-50; Almeida y Barry, 2010, pp.169-179; Ehrlich, 2002; Clarke et al; Platek et al., 2009). Los diferentes tipos de cáncer de mama presentan un diverso rango de características histopatológicas, inmunohistoquímicas y clínicas propias de cada paciente, por lo que su tratamiento debe ser específico y personalizado. A nivel mundial, los carcinomas de mama más frecuentes son: lobular y ductal, los cuales se derivan de las regiones lobulares y ductales de la glándula mamaria, respectivamente (González et al., 2007; Daroui y Haffty, 2012; Almeida y Barry, 2010, p. 170; Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2010).

Epidemiológicamente, el cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial, representado el 23% de todos los tipos de cáncer que existen. Alrededor del 60% de los casos de cáncer de mama se encuentran presentes en países en vías de desarrollo, y esto se debe al estilo de vida, a los problemas de salud pública y la falta de educación médica preventiva (visita al especialista en estadios tardíos de la enfermedad) (Jemal

et al., 2011; Ferlay et al., 2013). Las regiones geográficas que presentan las más altas tasas de incidencia de neoplasia mamaria son: Europa del Norte, Europa del Este, Oceanía, América del Norte, seguido por el Caribe, América del Sur y África del Norte, mientras que las regiones que presentan menores tasas de incidencia son: Asia y África del Sur (Jemal et al., 2011; Siegel, Ward, Brawley y Jemal, 2011). En el Ecuador, la tasa de incidencia ha ido en aumento en las últimas décadas. En el año 1985, la población ecuatoriana presentó una incidencia de 17,4 por cada 100.000 habitantes, mientras que en el año 2005, la incidencia se duplicó a 35,8 por cada 100.000 habitantes (Cueva y Yépez, 2009, pp. 133-134).

Existen varios genes que se encuentran implicados en varios tipos de cáncer, entre ellos tenemos el gen MTHFR que se encuentra muy relacionado con el desarrollo de cáncer de próstata y mama. Este gen está compuesto por 11 exones del cual deriva una proteína conocida como metilentetrahidrofolato reductasa (Stankova et al., 2008). Esta proteína está íntimamente relacionada con el metabolismo de los folatos, los cuales se obtienen en la ingesta nutricional diaria (Weinder, 2003). Los folatos ingeridos y metabolizados por las enzimas de la cascada genética del MTHFR son utilizados para cumplir importantes funciones como son: la síntesis de purinas, síntesis de proteínas, reparación y metilación de ADN (Weisberg et al., 1998; Damali et al., 200; Shrubsole et al., 2004). Al existir una mutación en el codón 222 del gen MTHFR, se genera el cambio nucleotídico de citosina (C) por timina (T) y el cambio aminoacídico de alanina (Ala) por valina (Val) (Muhammad, Malik y Mahmood, 2012). Este cambio en la estructura proteica desencadena problemas en la síntesis, reparación y metilación del ADN y de las proteínas, y por consiguiente el desarrollo de varios tipos de cáncer como el de próstata (López-Cortés et al., 2013), colorrectal (Zhao, Li, Xing y Zhou, 2013) y mama (Muhammad et al., 2012). Actualmente, los avances científicos en las áreas de Biotecnología y Farmacogenómica, permiten entender de mejor forma el comportamiento de determinadas poblaciones, con el fin de disminuir la incidencia de esta enfermedad.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años, el cáncer de mama ha ocupado el primer lugar con respecto a los tipos de cáncer con mayor frecuencia en mujeres ecuatorianas, con una incidencia y mortalidad de 35,8 y 9,3, respectivamente (Cueva y Yépez, 2009, pp.133-134; Corral y Yépez, 2004). A pesar de esto, las bases genéticas poblacionales han sido muy poco investigadas y entendidas dentro del país, existiendo deficiencia en encontrar potenciales marcadores genéticos que puedan ser aplicados en el pronóstico de esta enfermedad dentro del Ecuador.

Como se mencionó anteriormente, los factores epigenéticos se encuentran íntimamente relacionados entre sí. La asociación entre la mala nutrición e ingesta de folatos con la presencia de mutaciones que alteran la ruta metabólica de los folatos, generan un alto riesgo en desarrollar cáncer de mama (Weiwei, Liping y Dequan, 2014). Por este motivo, la caracterización genética del MTHFR en la población femenina ecuatoriana afectas con cáncer de mama es indispensable. El desarrollo de una investigación que relacione los diferentes mecanismos moleculares que subyacen en la identificación, progresión y evolución del carcinoma mamario son de vital importancia para el diagnóstico temprano. Para poder llegar a determinar un perfil genético que asocie el desarrollo del cáncer, es necesario analizar la correlación entre las frecuencias genéticas de MTHFR, los niveles de expresión génica del transcrito que se obtendrán en la investigación y las características histopatológicas, inmunohistoquímicas e historiales clínicos de los individuos. De esta manera, se conocerá si la población ecuatoriana podrá beneficiarse con un determinado tratamiento, evitando toxicidad por medicamentos y gastos de salud innecesarios (Quiñones et al., 2014).

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Asociar las frecuencias y la expresión del polimorfismo funcional Ala677Val del gen MTHFR con el riesgo a desarrollar cáncer de mama en la población ecuatoriana.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar la presencia del polimorfismo Ala677Val en el gen MTHFR entre los individuos sanos y enfermos mediante el uso de PCR, enzimas de restricción y secuenciación genética.
- Determinar el nivel de expresión génica de la población en estudio mediante el uso de la PCR cuantitativa.
- Evaluar la asociación entre el perfil genético y los historiales clínicos para generar una posible prueba que pronostique el cáncer de mama en la población ecuatoriana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

La palabra “cáncer” fue introducida por primera vez por Hipócrates (460-370 BC), quien acuñó la palabra carcinoma del vocablo Griego karcinos, que significa cangrejo cuando él describía a los tumores. Esto se debe a que la mayoría de tumores presentan una masa central con crecimiento radial infiltrante hacia los exteriores del tejido, muy similar al cuerpo de un cangrejo (Almeida y Barry, 2010, pp.1-6).

El cáncer parte de una célula que se encuentra biológicamente descontrolada, es decir su crecimiento es de forma anormal y sin control. Las células cancerosas tienen la capacidad de formar tumores y de invadir otros tejidos u órganos del cuerpo humano. Las alteraciones que presentan las células neoplásicas se deben a los cambios que existen en el ADN, y que han sido acumuladas con el tiempo. Las mutaciones que ocasionan la proliferación y desarrollo del cáncer se encuentran ligadas a tres tipos de genes: proto-oncogenes, genes de reparación del ADN y genes supresores de tumores (Almeida y Barry, 2010, pp.5-10; Vogelstein y Kinzler, 2002). Los proto-oncogenes están presentes en células normales, en donde desarrollan funciones importantes como es el crecimiento, desarrollo y proliferación celular, estos se convertirán en oncogenes cuando exista la presencia de mutaciones. Los genes supresores de tumores o anti-oncogenes son los responsables de codificar proteínas que son necesarias para el desarrollo normal del ciclo celular, si estos genes se encuentran con alguna alteración, las proteínas dejarán de expresarse normalmente, alterando así la división celular. Con respecto a los genes reparadores de ADN, estos son responsables de corregir errores a nivel molecular, en especial cuando se trata de la replicación del ADN, así como subsanar daños que fueron ocasionados por agentes mutagénicos, químicos y radiaciones ionizantes; se sabe que alteraciones en este tipo de genes no permiten una buena reparación en los errores que fueron

mencionados (Almeida y Barry, 2010, pp.18-22; Secretaria de la Salud Pública, 2002, pp.18-22).

Se conoce que se requiere de dos mutaciones para poder transformar una célula normal en cancerosa. Con la primera mutación la célula será capaz de transformarse en precancerosa y esta se la puede adquirir de forma hereditaria por algún alelo de los padres, mientras que la segunda mutación no es heredada, esta se la conoce como mutaciones esporádicas en donde la célula presenta varios errores como modificaciones químicas del ADN, ineficiencia en la maquinaria de replicación y exceso de número de células; por estas razones cada cáncer será único en un individuo que la padezca. Esto se debe a que varias mutaciones pueden estar presentes en la misma célula y dependerá si a la enfermedad se la detecta de forma temprana o tardía, teniendo como resultado diferentes tratamientos médicos para cada persona (Almeida y Barry, 2010, pp.18-23; Vogelstain y Kinzler, 2002).

Dependiendo del tipo de tejido en donde se desarrolle una división excesiva, al cáncer se lo clasifica en:

- **Carcinomas:** surgen de células epiteliales que se encuentran en glándulas, órganos internos, piel y cavidades del cuerpo. Los carcinomas representan el 90% de todos los tipos de cáncer, en ellos se destacan el de seno, pulmón, próstata, colon y piel.
- **Sarcomas:** surgen de células conectoras como cartílagos, huesos, músculos y grasa. Llegan a desarrollarse en cualquier parte del cuerpo como piernas y brazos. Los sarcomas son menos comunes que los carcinomas.
- **Leucemias:** provienen de la médula ósea, en donde existe una sobreproducción de leucocitos inmaduros. Este tipo de cáncer no presenta un tumor sólido.
- **Linfomas:** están involucrados los nódulos linfáticos así como componentes del sistema inmune.

Ciertamente se ha visto que al cáncer no solo se lo relaciona con el patrón hereditario y acumulaciones de genes defectuosos por herencia, sino que el factor ambiental y estilo de vida de las personas influye con las probabilidades del desarrollo de esta enfermedad. Se sabe que la relación que existe entre el desarrollo del cáncer y la exposición a los diferentes carcinógenos (tabaco, químicos, UV) es un alto riesgo entre la población. Por esta razón es esencial que exista cambios en el estilo de vida de las personas, implementando precauciones y regulaciones con el ambiente y la alimentación, evitando así menor incidencia en padecer cáncer a nivel poblacional (Erikson, 2007; Almeida y Barry, 2010, p.22; NCI, 2014, CDC, 2013).

2.2 CÁNCER DE MAMA

Al cáncer de mama se lo reconoce como una enfermedad genética, producto de las acumulaciones progresivas del ADN. El cáncer de mama es el resultado de la división exagerada y sin control de las células que se originan en el seno y alteraciones en los diferentes genes como los proto-oncogenes y los supresores de tumores, desencadenando así un tumor maligno en la glándula mamaria. Mutaciones o cambios epigenéticos a nivel molecular, como la metilación del ADN y proteínas pueden contribuir a una expresión genética diferente en el individuo (Campbell et al., 2002; Widschwendter y Jones, 2002). En términos generales, el desarrollo del cáncer de mama se debe a causas multifactoriales y epigenéticas como son: edad, ambiente contaminado, mala nutrición, falta de ejercicio, menarquia precoz, menopausia, ingesta de anticonceptivos, consumo de alcohol, periodo de lactancia y herencia genética. Estos factores desencadenan el desarrollo y acumulación de mutaciones y polimorfismos que conllevan a la formación de células neoplásicas en el tejido mamario (González et al., 2007; Stankova, Lawrance y Rozen, 2008; Ehrlich, 2002; Clarke et al., 2003; Platek et al., 2009).

La mama es una glándula exocrina especializada en la producción de leche después del embarazo lo cual es importante en la protección inmunológica para

los descendientes. La glándula mamaria se encuentra estructurada en su mayoría por tejido epitelial especializado y estroma que se unen para formar entre 6 a 10 conductos principales (Fernandes et al., 2012). Las diferentes ramificaciones de los conductos principales acaban formando varias unidades conocidos como lobulillares en los conductos terminales del seno. Tanto los conductos como los lobulillos están formados por dos tipos de células. Las mioepiteliales contráctiles se distribuyen como una malla sobre la membrana basal, estas células se encargan en el proceso de la eyección de la leche durante la lactancia, mientras que las células epiteliales lumbinales son capaces de producir leche (Kumar et al., p.1066, 2010).

Por otro lado, el tejido estroma mamario se encuentra dividido en dos tipos. El estroma interlobulillar corresponde al tejido denso el cual se encuentra mezclado con tejido adiposo (grasa), mientras que el tejido estroma intralobulillar cumple el rol de rodear a los lobulillos, el cual está constituido por células similares a los fibroblastos con respuesta hormonal. La comunicación entre el tejido estroma y tejido epitelial del seno favorece a la función normal de la glándula mamaria (Figura 2) (Kumar et al., p.1066, 2010).

Los diferentes tejidos epiteliales que se encuentran en la glándula presentan varias proteínas de adhesión celular las cuales contribuyen a la integridad del seno. Proteínas como las integrinas y caderinas representan un papel importante y específico, que consiste en mantener el contacto íntimo célula-célula formando heterodímeros los cuales permiten uniones transmembranales entre proteínas específicas de la matriz celular y el citoesqueleto, evitando así la invasión a otros órganos del cuerpo humano (Fernandes et al., 2012; Chidgey y Dawson, 2007; Calaf et al., 2013; Dong-Mei y Yu-Mei, 2011). Una degradación enzimática que esté afectando la matriz celular permitirá que las diferentes células puedan atravesar la membrana en la zona basal, lo cual implica una invasión agresiva y mayores posibilidades de padecer una metástasis en el seno (Dong-Mei y Yu-Mei, 2011).

2.2.1. Epidemiología del Cáncer de mama.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la neoplasia mamaria representa el cáncer más común en mujeres, tanto en países de primer mundo así como países subdesarrollados. Se estima que a nivel mundial en el año 2011 alrededor del 23% (1.37 millones) de la población femenina fue diagnosticada con cáncer de seno y que el 14% (458.000) de mujeres murieron a causa de esta enfermedad, ocupando así el primer lugar tanto en incidencia como en mortalidad después del cáncer de pulmón (Anexo 1) (OMS, 2013; Jemal et al., 2011). Esta enfermedad se presenta alrededor de la edad avanzada, siendo un promedio de 50 años, edad en la que la menopausia empieza, aunque esto también puede variar dependiendo si el individuo afecto presenta o no antecedentes familiares que hayan padecido algún tipo de cáncer (Lacey et al., 2009).

Las tasas de incidencia de cáncer de mama varían sustancialmente de un país a otro y más aún con los diferentes grupos étnicos específicos de cada región. Es así como los caucásicos ocupan el primer lugar en incidencia de esta enfermedad en regiones como América del Norte (76,7), Oeste de Europa (89,9) y Australia (85,5) (por cada 100.000 individuos), mientras que las tasas más bajas son de grupos mestizos, Asiáticos y Africanos como lo es América del Sur (44,3), Sur-Centro de Asia (24,0) y África del Este (19,3) respectivamente (Anexo 2) (Jemal et al., 2011). La sociedad Americana de cáncer estima que para el 2013, más de 230.000 mujeres americanas serán diagnosticadas con cáncer de mama, y que más de 40.000 morirán por esta misma causa (Siegel, 2013).

En el Ecuador, según el Registro Nacional de tumores (SOLCA), la tasa de incidencia para el año 2005 fue de 35,8, comparada con el año 1985 donde la incidencia era de 17,4, es decir que la tasa de incidencia dentro del Ecuador se ha duplicado en un rango de 20 años (Cueva y Yépez, pp. 133, 2009). La tasa de mortalidad para el año 2005 fue de 9,1 por cada 100.000 habitantes, en

comparación del año 2000, que fue de 9,2; existiendo así una disminución muy ligera de la mortalidad. Dentro de nuestro país las tasas de incidencia varían en las diferentes provincias (Anexo 3). Estas tasas de incidencia se han reportado en la provincia de Manabí (14,0), El Oro (18,6), Guayas (22,3), Azuay (21,3), Loja (34,1) y Pichincha (35,6), que es la provincia más alta en incidencia con un promedio de 732 casos por año, de los cuales 200 terminan en defunciones (Cueva y Yépez, pp. 133-134, 2009).

El cáncer de mama al ser una de causas de mayor incidencia y mortalidad tanto a nivel de Ecuador como mundial, requiere de varias investigaciones oncológicas a gran escala. Se ha podido determinar que alrededor del 10% de las mujeres que presentan cáncer de mama podrán ser curadas, llegando a sobrevivir más de 5 años después de haber sido diagnosticada; por otro lado, se sabe que si el diagnóstico se lo realiza en una etapa avanzada del cáncer (metástasis), las probabilidades de sobrevivir serán bajas, dando un aproximado de 25 a 72 meses de vida (Coleman y Rubens, 1987; Koenders et al., 1992; Pultz et al., 2014).

2.2.2. Etiología del Cáncer de mama

La etiología del cáncer de mama tiene en cuenta varios aspectos como: cambios ambientales, genes y sobre todo el estilo de vida, los cuales se asocian íntimamente al momento de incrementar o disminuir las probabilidades de padecer cáncer de mama (Hartge, 2003; Ziv et al., 2006; Morse et al., 2014). La etiología resulta difícil de explicar, ya que mucho dependerá de los grupos de individuos en estudio, debido a que algunas mujeres presentarán mayores riesgos que otras, como por ejemplo: mujeres que presentan familiares con cáncer de mama, uso prolongado de anticonceptivos, y mujeres que presenten sobrepeso después de la menopausia (Lancet, 2001; Albrektsen et al., 2005; Beral, 2003; Brandt et al., 2000).

2.2.2.1. Edad

Las probabilidades de padecer cáncer de mama aumentarán conforme al envejecimiento de la mujer. Mujeres mayores de 50 años presentan un riesgo mayor. Esta enfermedad es muy poco común en individuos antes de la menopausia. Según el National Cancer Institute las probabilidades de que una mujer pueda ser diagnosticada con cáncer de mama, incrementan en un lapso de diez años.

- Mujeres de 30-39 años presentan una probabilidad de 0,44% (es decir 1 de cada 227 mujeres puede ser diagnosticada con cáncer de seno).
- Mujeres de 40-49 años presentan una probabilidad de 1,47% (es decir 1 de cada 68 mujeres puede ser diagnosticada).
- Mujeres de 50-59 años presentan una probabilidad de 2,38% (es decir 1 de cada 42 mujeres puede ser diagnosticada).
- Mujeres de 60-69 años presentan una probabilidad de 3,56% (es decir 1 de cada 28 mujeres puede ser diagnosticada).
- Mujeres de 70 años en adelante presentan una probabilidad de 3,82% (es decir 1 de cada 26 mujeres puede ser diagnosticada).

Cabe recalcar que estos porcentajes han sido calculados para toda la población mundial, sin embargo el riesgo de padecer esta enfermedad puede ser mayor o menor dependiendo de muchos otros factores, los cuales van a variar dependiendo el tipo de población y del individuo (NCI, 2014).

2.2.2.2. Caracteres Reproductivos y Hormonales

Los estrógenos presentan un papel muy importante en el carácter reproductivo de la mujer. Por ende, los diferentes niveles de estrógeno en la mujer determinarán la edad en la que presente su menarquia, al igual que la menopausia. Mujeres que presenten su primera menstruación antes de los 12 años y mujeres que desarrollen la menopausia después de los 55 años,

presentarán mayores probabilidades de padecer cáncer de mama, ya que los ciclos estrogénicos iniciaran a edad temprana y, cuanto más tarde desaparezcan, estos ejerzan una acción negativa sobre el tejido mamario (NCI, 2014; Almeida y Barry, pp.169-170, 2010). De igual manera, el número de veces que una mujer haya estado embarazada y en el cual el periodo de lactancia haya sido largo, presentan un riesgo de padecer cáncer de seno. Una mujer que haya estado embarazada por primera vez antes de los 20 años de edad, presentará la mitad del riesgo de padecer cáncer a comparación de una mujer que nunca ha estado embarazada (Clarke et al., 2003; Sun-Lee y Oh, 2014).

Mujeres que hayan tomado anticonceptivos por largos periodos que contengan estrógeno y progestinas tienen un 24% más de probabilidad de padecer cáncer de mama. Luego de suspender el tratamiento, las probabilidades decaerán cada 10 años de vida (Farhat et al., 2011).

2.2.2.3. Receptores Hormonales

Los receptores tanto de estrógenos como de progesteronas cumple un papel importante en la proliferación del cáncer de mama (Forrest, 1974).

El receptor de estrógeno (RE), regula la expresión de varios genes que se encuentran involucrados en la diferenciación celular. Puesto que el RE es un factor importante en esta enfermedad, se han podido desarrollar varias terapias endócrinas, así como el uso de anti-estrógenos, los cuales intervienen en la actividad del RE en las células epiteliales del seno, evitando así que los genes promuevan una división celular descontrolada (Clarke, 2003). Se ha visto que mujeres que presentan el RE positivo y se someten a un tratamiento hormonal, estas presentan del 43% al 60% de resultados favorables al tratamiento endócrino. Mientras que tumores que no presenten RE existirá solamente el 8% de efectividad del tratamiento hormonal (British Medical Journal, 1976).

El receptor de progesterona (RP), es considerado como un excelente factor predictivo de respuesta de tumores mamarios en relación a la terapia hormonal. La presencia elevada de RP en las membranas celulares están correlacionadas significativamente con respuestas favorables a los diferentes tratamientos endócrinos (Sun-Lee y Oh, 2014).

Tanto el RE como el RP pueden presentar varios cambios genéticos, etiológicos o epigenéticos, como lo es la metilación de los genes promotores que codificarán para estos dos genes, siendo factores importantes para una homeostasis dentro de las células epiteliales de la glándula mamaria (Widschwenter y Jones, 2002; Ehlich, 2002).

2.2.2.4. Otros Factores

Existen otros factores de riesgo para desarrollar cáncer de seno, como son: el consumo de alcohol y tabaco, la nutrición del individuo, obesidad, y factores genéticos.

El consumo de alcohol se ha establecido como un factor de riesgo para padecer cáncer de mama. Individuos que beban moderadamente hasta niveles altos de alcohol (aproximadamente 3 bebidas por día) presentaran 22% más probabilidad de padecer cáncer, en comparación con las personas que no consumen alcohol en toda su vida (Platek et al., 2009; Longnecker, 1994; Corrao et al., 1999). El consumo de tabaco, al igual que el alcohol es considerado un factor de riesgo, ya que se ha visto que las células mamarias epiteliales son capaces de captar y metabolizar los diferentes químicos que se encuentran en el tabaco como los aromáticos policíclicos y N-nitrosaminas, interfiriendo con el proceso biológico normal del ADN y con la formación de los diferentes ductos/lobulillos de la glándula mamaria (Hecht, 2002; MacNicoll et al., 1980; Li et al., 2002; Catsburg et al., 2014).

Se ha logrado demostrar que el incremento de peso (masa corporal), el tipo de dieta (grasas) y el padecer obesidad, conlleva al desarrollo del cáncer de seno. Individuos que consuman vitamina D, soya o sus derivados, podrían obtener grandes beneficios y de esta forma disminuyendo en un 25% de probabilidad, ya que presentan pocas calorías, reduciendo así niveles altos de insulina, grasa corporal, y sobre todo manteniendo una homeostasis en el cuerpo (Narváez et al., 2014; Vitolins et al., 2014). Un incremento de peso corporal después de la menopausia duplica la probabilidad de desarrollar cáncer, ya que existirán altos niveles de estrógenos debido a la grasa corporal presente en la persona (NCI, 2014; Sundaram et al., 2014).

Con respecto a los factores genéticos, se estima que el 5%-10% de todos los tipos de cáncer de mama, se los desarrolla por factores hereditarios (NCI, 2014). Los genes supresores de tumores BRCA1, BRCA2 y p53 son los responsables de una transmisión autosómica dominante, ya que presentan una alta penetrancia; BRCA1 mantiene la integridad estructural de los cromosomas (Anjum et al., 2014), mientras que BRCA2 al igual que el p53 están relacionados con alteraciones/reparaciones a nivel de ADN, ciclo celular y apoptosis (Ramalho et al., 2014; Venkitaramn, 2009; Kumar et al., p.1078, 2010). Al ser portador de estos genes en alguno de sus alelos, existirá hasta un 80% de riesgo de desarrollar cáncer de mama; un riesgo mucho más alto en comparación de la población en general, la cual presenta 12,5% de riesgo (Almeida y Barry, p 173, 2010).

2.2.3. Estadios Tumorales

La etapa en donde las células aparecen de forma anormal, cuando son observadas durante un examen patológico microscópico se lo conoce como grado tumoral (Almeida y Barry, p132, 2010). Este diagnóstico es uno de los factores más importantes al momento del pronóstico y el tipo de tratamiento que se llevará a cabo para la paciente (American Cancer Society, 2014).

El estadio de la enfermedad se basa en una serie de aspectos clínicos (examen físico, exploración ósea, estudios radiológicos y de laboratorio) y factores patológicos (biopsia de ganglio centinela, biopsia de tejido mamario) (Almeida y Barry, pp.130-1, 2010).

A nivel mundial, los diferentes especialistas en tratamiento del cáncer, se basan en un sistema internacional de estadificación, para resumir toda la información obtenida sobre el tumor. El sistema comúnmente utilizado para describir los diferentes estadios (Figuras 3,4,5 y 6) del cáncer de mama es el sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástasis) (Anexo 4) del American Joint Committee on Cancer o conocido también como AJCC por sus siglas en inglés (NCI, 2014; AJCC, 2014).

2.2.4. Clasificación del Cáncer de mama

La clasificación del cáncer de mama se toma en relación a la histopatología del tejido mamario, el cual se lo determina mediante ensayos inmunohistoquímicos e hibridaciones in situ (FISH), tomando en cuenta los diferentes receptores hormonales de la glándula mamaria y el oncogén HER2/neu (Hurtado-Estrada et al., 2004). Tanto los receptores hormonales como el oncogén se han visto íntimamente relacionados con el desarrollo y proliferación de esta enfermedad, este tipo de pruebas permite obtener información adecuada para decisiones terapéuticas a ser aplicadas en cada caso (González et al., 2011).

Por otro lado, existen ciertos grupos de mujeres que a pesar de haber establecido tratamientos clínico-patológicos básicos, su organismo no ha logrado responder de una buena manera para que pueda ser frenada la enfermedad (Goldhirsch et al., 2005). Debido a este importante antecedente, se ha logrado implementar en la mayoría de hospitales de países desarrollados una nueva clasificación en el cáncer de mama, conocida como clasificación molecular (Cleator y Ashworth, 2004). La clasificación molecular tiene el objetivo de estudiar la expresión génica del individuo afecto, y de esta manera

determinar un tratamiento de forma más precisa, disminuyendo así el riesgo de intoxicación por medicamentos (Quiñones et al., 2014).

2.2.4.1. Clasificación Histopatológica

La clasificación histopatológica de la glándula mamaria se la realiza por tejido invasivo y no invasivo. El tejido invasivo es aquel que se dispersa desde los conductos de leche o lobulillos hacia otros tejidos de la mama, mientras que los no invasivos son aquellos que no han logrado invadir otros tejidos mamaros (NCI, 2014).

El tejido no invasivo en el cáncer de mama es conocido como in situ y como se mencionó anteriormente, este tejido presenta una proliferación neoplásica limitada entre los conductos de leche y los lobulillos por la membrana basal; y se clasifican en dos principales grupos que son: ductal carcinoma in situ (DCIS) o carcinoma intraductal y carcinoma lobulillar in situ (CLIS) (Figuras 7 y 8) (Kumar et al., pp.1080-1082, 2010; Kumar et al., 2012).

El carcinoma invasivo, también llamado infiltrante, se lo reconoce una vez que las células malignas hayan penetrado el estroma a través de la membrana basal, y se sub-clasifica en: lobulillar, mucinoso, tubular, medular, papilar y metaplásico (Anexo 5) (Kumar et al., pp.1085-1088, 2010; Secretaria de la Salud Pública, pp.48-64, 2002).

2.2.4.2. Clasificación Molecular

Las bases moleculares del cáncer de mama han sido definidas hace una década. Los avances tecnológicos que compromete el uso de tecnologías avanzadas como es la tecnología del microarray, ha permitido obtener una masiva información sobre la expresión de genes que presentan una alta penetrancia como: p53, BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, LKB1, NBS1, RAD51,

los cuales se encuentran íntimamente relacionados con el desarrollo de la neoplasia mamaria (Dumitrescu y Cotarla, 2005; Honrado et al., 2006).

Estudios iniciales han demostrado grandes avances con respecto a tratamientos personalizados para combatir el cáncer de mama, y de esta manera disminuir gastos innecesarios con respecto a medicamentos (Kumar et al., 2012), sin embargo toda esta nueva tecnología aún no se la ha podido aplicar en el Ecuador (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2010).

Se han logrado identificar cuatro grupos principales en la clasificación molecular del cáncer de mama, que son: Luminal A, Luminal B, Triple negativo y HER2/neu, los cuales se han predeterminado con la identificación de varios genes mencionados anteriormente y perfiles inmunohistoquímicos (Anexo 6) (Imigo et al., 201; Kumar et al., 2012)

2.3. Genes de Metilación

La metilación del ADN juega un rol importante al momento de la replicación y expresión génica. Alteraciones en la metilación del ADN se han asociado con varias enfermedades, especialmente las relacionadas con procesos de transformación celular (Marrero, 2012; Ehrlich, 2002).

Los genes de metilación producen enzimas llamadas ADN metiltransferasas, las cuales están involucradas en la transferencia del grupo metilo, principal componente para la metilación del ADN en el carbono 5 de la base nitrogenada citosina (Doerfler, 1983; Widschwendter y Jones, 2002). Existen tres enzimas que llevan a cabo este tipo de reacción química y se clasifican en dos grupos: las metilasas de novo y las metiltransferasas de mantenimiento (Bestor, 2000; Okano et al., 1999).

El papel que desarrollan las ADN metiltransferasas de mantenimiento es metilar el ADN al inicio de la replicación. Solamente la cadena nueva de ADN

será metilada, por ende los patrones serán heredados de una forma semiconservativa. Estas enzimas interactúan con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteína que se encarga de anclar la ADN polimerasa en la horquilla de replicación (Araujo et al., 1998, Rodríguez-Dorantes et al., 2004).

2.3.1. Gen Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR)

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), junto con otras tres enzimas (MTR, MTRR y TS) juegan un rol importante en el metabolismo de los folatos, el cual es una fuente de suma relevancia para la metilación y síntesis del ADN y ARN (López-Cortés et al., 2013; Stankova et al., 2008).

El gen MTHFR está localizado en el cromosoma 1p36.3, compuesto por once exones y 21.198 pares de bases (pb), los cuales codifican una proteína de 656 aminoácidos denominada metilentetrahidrofolato reductasa de una masa molecular de 74597 Da (Figuras 9 y 10). Esta proteína cataliza la reacción irreversible del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato, en el cual se utiliza un grupo metilo, en donde se obtiene a partir de una remetilación de la homocisteína hacia metionina (Martin et al., 2006), siendo así un precursor de S-adenosilmetionina (SAM), factor indispensable para la metilación del ADN, proteínas, ARN y fosfolípidos (Zhang et al., 2005). La remetilación de homocisteína a metionina es catalizada por MTR en una reacción dependiente de vitamina B₁₂, como el portador del grupo metil (Weiner et al., 2012). La enzima MTR se vuelve inactiva cuando el cofactor de la remetilación (vitamina B₁₂) es oxidada por la enzima MTRR (Weiwei et al., 2014). Por otra parte, el 5-10, metilentetrahidrofolato es utilizado por la enzima TS durante la metilación de desoxiuridilato (dUMP) a desoxitimidilato, el cual es la fuente de timidinas, requeridas para la reparación y síntesis del ADN (Figura 11) (Heijmans et al., 2003; López-Cortés).

Existen dos polimorfismos mayormente estudiados en el gen MTHFR, que son C677T (Ala/Val) y A1298C (Glu/Ala); afectando ambos su función. Los homocigotos de las dos variantes 677 y 1298, resultan en la pérdida de actividad enzimática, aproximadamente 70% para la variante 677, y 32% para la variante 1298 (Cicek et al., 2004; Platek et al., 2009). Mientras que personas que sean heterocigotos en ambos loci, es decir C677T y A1298C, presentaran inmediatamente una pérdida del 50% en actividad enzimática (Martin et al., 2006). Las variaciones genéticas en el MTHFR, se han visto influenciadas por la susceptibilidad y desarrollo de enfermedades cardio-vasculares, como la homocistinuria que afecta a las arterias coronarias del corazón (Bennouar et al., 2007), fibrilación arterial (Giusti et al., 2007), defectos en el tubo neural (Zhu et al., 2003) entre otros.

2.3.1.1. Polimorfismo C677T del GEN MTHFR

Aproximadamente el 10% de la población caucásica es homocigota en el cambio de C/T en el nucleótido 677 en el gen MTHFR (Campbell et al., 2002). Esta mutación convierte de alanina a valina en el codón 222, la cual está asociada con la reducción de actividad enzimática, la disminución en la concentración de folatos en el plasma y la metilación del ADN en pacientes con cáncer (Weisberg et al., 1998; Martin et al., 2006), incremento de la termolabilidad de la enzima y aumento en los niveles de homocisteína en el cuerpo humano (Bagley y Sellhub, 1998).

2.3.1.2. Implicación del GEN MTHFR en el Cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente, el gen MTHFR es la enzima principal en el metabolismo de los folatos y la regulación intracelular de la síntesis y metilación del ADN (Maruti et al., 2009). Consecuentemente se han realizado varias investigaciones relacionadas con diferentes tipos de cáncer a nivel mundial, en donde se demuestra que personas que presenten la mutación del alelo MTHFR (valina) presentan dos veces menos riesgo desarrollar cáncer de colon que una

persona normal en y cuatro veces menos en desarrollar leucemia linfocítica (Skibola et al., 1999).

Por otro lado, el gen MTHFR también ha sido asociado con el incremento de la probabilidad de desarrollar diferentes tipos de cáncer. Personas que presenten la mutación (valina) tienen 2,8 veces más riesgo de padecer cáncer endometrial, y 2,9 veces más riesgo de desarrollar cáncer cervical (Esteller et al., 1997). Todo esto se debe a que la metilación del ADN juega un papel importante en la regulación de genes (expresión génica), la estabilidad genómica, y aberraciones cromosómicas que han sido asociadas con cáncer (Kundu y Rao, 1999).

Epidemiológicamente el cáncer de mama, se ve relacionado con la ingesta de folatos y de la vitamina B₁₂, ya que existe una relación inversamente con el cáncer de mama; es decir bajo consumo de folatos incrementaría el riesgo de desarrollar neoplasia mamaria y más aún cuando la persona es homocigoto mutante (T/T) en el gen MTHFR, ya que indicaría que la síntesis de metionina es mucho más limitada, dado que la enzima SAM es la encargada de donar el grupo metilo para la protección del ADN y proteínas; y al existir el alelo T/T en el polimorfismo C766T del gen MTHFR, la enzima SAM registraría una baja actividad enzimática (Hosseini et al., 2010; Paz et al., 2002).

Al ser importantes los folatos en la fisiología humana, esta investigación tiene como objetivo evaluar el polimorfismo MTHFR C677T, y asociarlos con las características histopatológicas y expresión génica de las mujeres afectas con cáncer de mama en la población ecuatoriana.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

Para el desarrollo de esta investigación, se analizó un total de 309 individuos ecuatorianos de sexo femenino. Con respecto a las mujeres afectas con cáncer de mama, se analizaron 114 biopsias de tejido tumoral embebido en parafina y de los 114 individuos se escogieron 26 muestras de tejido sano embebido en parafina para el análisis de expresión génica. A cada una de estas muestras se las estratificó de acuerdo a los datos de los historiales clínicos provenientes del Departamento de Patología del Hospital Oncológico Solón Espinosa Ayala (SOLCA-Quito), las cuales fueron diagnosticadas durante los años 2010-2011. Con respecto al grupo control, se analizaron 195 muestras de sangre periférica proveniente de mujeres sanas sin antecedentes personales ni familiares de cáncer de mama. Las muestras de sangre periférica provinieron del Departamento de Análisis Clínico del Hospital Cantonal de Machachi y del Banco de ADN's del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas.

Para determinar el genotipo de los individuos tanto casos como controles, se obtuvo el ADN de cada muestra, verificando la calidad y cantidad del mismo. Una vez obtenido el ADN de todas las muestras, se realizó una PCR con la finalidad de amplificar el fragmento de interés y de esta forma poder determinar la presencia del polimorfismo C677T en el gen MTHFR. El tamaño del fragmento amplificado del exón 4 es de 86 pares de bases, los cuales podrán ser identificados mediante la visualización de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2%. Posteriormente se procedió a realizar la técnica PCR-RFLP (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica), la cual consiste en la digestión de los amplicones con enzimas de restricción con el propósito de identificar la presencia de la variante Ala/Val (cambio de alanina por valina) utilizando la enzima HinfI, la observación y determinación del genotipo de los individuos en estudio fueron testados en geles de agarosa al 5%. Para

corroborar que los resultados obtenidos por la técnica de PCR-RFLP fueron correctos, se realizó posteriormente una secuenciación capilar a todas las muestras analizadas. Se procedió a la recopilación de información tanto del grupo afecto como del grupo control para determinar la asociación con los historiales clínicos de cada individuo y genotipo. Por otro lado, para la expresión génica se extrajo el ARN mensajero (ARNm), tanto de tejido sano como maligno de 26 individuos, posteriormente las muestras fueron transformadas a ADN complementario (ADNc) para que puedan ser analizadas en PCR en tiempo real, aplicando el método Livak para el análisis de los niveles de expresión génica.

3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

La población que fue analizada estuvo conformada por 309 individuos ecuatorianos de sexo femenino. De toda esta población, 114 mujeres fueron diagnosticadas previamente con cáncer de mama, los cuales fueron conversados en parafina. Todas estas muestras fueron estratificadas con los siguientes parámetros: perfil inmunohistoquímico, diagnóstico histopatológico, diagnóstico molecular, porcentaje de estrógenos, progesterona y HER2/neu.

Con respecto a las 195 muestras controles, se obtuvieron muestras de sangre periférica las cuales fueron recolectadas en tubos de EDTA, lo cual sirvió como anticoagulante. Todas estas muestras obtenidas fueron consideradas como controles en base a una encuesta biomédica previa, en donde se incluyeron varios parámetros como: edad, etnia, antecedentes familiares, ocupación, edad de menarquia y/o menopausia, consumo de café, alcohol, entre otros (Ver anexo 7). Cabe recalcar que la toma de muestras controles contó con el consentimiento informado previo a la recolección de sangre periférica, donde los participantes aceptaron esta investigación al momento de firmar el documento (Anexo 8).

3.3 EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

Una vez obtenidas tanto las muestras de tejido tumoral embebido en parafina del grupo afecto, así como la sangre periférica de individuos sanos, se procedió a extraer el ADN genómico.

3.3.1. Extracción del ADN a partir de sangre periférica (PureLink™ Genomic DNA kit Invitrogen™)

- En un tubo eppendorf estéril se colocó 200 µl de sangre periférica, la cual fue previamente recolectada en el tubo con EDTA. En este primer paso se precalentó el bloque térmico Accublock™ Digital dry bath (Labnet) y se ajustó a 55°C, el cual servirá para la desnaturalización de proteínas y lípidos.
- Luego se procedió a colocar 20 µl de Proteinasa K dentro del tubo eppendorf mezclándolo con la sangre periférica mediante VortexGene2 (Scientific Industries) durante 1 minuto.
- Se añadió 20 µl de ARNasa a la mezcla que se encontró en el tubo eppendorf, se mezcló brevemente con vórtex y se dejó incubar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió 200 µl de Genomic Lysis Binding Buffer y se mezcló brevemente con el vortex, hasta obtener una muestra homogénea.
- Posteriormente se dejó incubando dentro del bloque térmico durante 10 minutos a una temperatura de 55°C, esto ayudó a acelerar el proceso de digestión con las diferentes enzimas que fueron colocadas anteriormente.
- Se añadió 200 µl de etanol 96-100% al lisado. Se mezcló bien mediante vortex, hasta obtener una solución homogénea.
- Se colocó la columna de purificación PureLink™, sobre el tubo de colección. Esta columna viene dentro del kit de extracción de ADN.
- Se añadió la muestra (aproximadamente 640 µl) en la columna de purificación.

- Se centrifugó a 10000 rpm (revolución por minuto) durante 1 minuto, a temperatura ambiente.
- Se procedió a desechar el tubo de colección y se colocó la columna de purificación en otro tubo de colección nuevo y estéril.
- Se colocó 500 µl de Wash Buffer 1 en la columna de purificación.
- Se centrifugó la columna a 10000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Después se desechó el tubo de colección y se colocó la columna de purificación en un nuevo tubo de colección.
- Posteriormente se colocó 500 µl de Wash Buffer 2 en la columna de purificación.
- Se centrifugó la columna a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Se desechó el tubo de colección, y la columna de purificación se la colocó en un nuevo tubo eppendorf estéril de 1,5 ml.
- Se añadió 50 µl de buffer de elusión PureLink™ en la columna y se dejó reposar durante 1 minuto aproximadamente a temperatura ambiente.
- Se centrifugó la columna a máxima potencia durante 3 minutos y a temperatura ambiente.
- Finalmente se desechó la columna, y el tubo eppendorf ya contenía ADN genómico purificado, el cual debe ser guardado inmediatamente en -20°C para evitar una degradación molecular.

3.3.2. Extracción del ADN a partir de Tejido Tumoral Embebido en Parafina (PureLink™ Genomic DNA kit Invitrogen™)

- De cada bloque de parafina en donde se encontraba tejido de glándula mamaria preservada, se tomó la porción tisular la cual indicaba su ubicación tumoral. Con la ayuda de un bisturí estéril N° 11, se realizó entre 3 y 5 micro-cortes de tejido tumoral con la ayuda

de un micrótopo SLEE C120010 y se lo colocó en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml.

- Se añadió 1 ml de Xilol a cada una de las muestras y se agitó mediante vortex durante 30 segundos, para poder remover la parafina.
- Cada muestra fue centrifugada a máxima velocidad durante 5 minutos, a temperatura ambiente y se removi6 la fase acuosa de cada tubo con la ayuda de una pipeta Pasteur.
- Se realizaron dos lavados, cada uno con 1 ml de alcohol etanol al 100% a cada muestra, permitiendo así remover los restos de Xilol y parafina. Las muestras fueron enviadas nuevamente a la centrifugadora por 5 minutos a máxima velocidad y a una temperatura de 4°C.
- Con una pipeta Pasteur se absorbi6 y desech6 el sobrenadante.
- Se abri6 la tapa de todos los tubos eppendorf y se dej6 evaporar el etanol dentro de una estufa a 37°C, durante 2 horas.
- Se a~nadi6 20 µl de Proteinasa K y 20 µl de ARNasa, se mezcl6 mediante vortex. Posteriormente se a~nadi6 200 µl de Genomic Lysis Binding Buffer.
- Todas las muestras fueron incubadas a 55°C, hasta quedar completamente lisadas dentro del bloque térmico.
- Se centrifug6 la muestra durante 1 minuto para remover todos los residuos que se hayan quedado en la tapa del tubo eppendorf.
- Posteriormente se a~nadi6 200 µl de alcohol etanol al 100% a todas las muestras y se agito por vortex, hasta obtener una soluci6n homogénea.
- Se coloc6 una columna de purificaci6n en cada uno de los tubos eppendorf. Se a~nadi6 toda la muestra (tejido tumoral lisado) dentro de la columna de purificaci6n.
- Se centrifug6 a 10000 rpm durante 1 minuto y a temperatura ambiente. Se desech6 el tubo de coleccion y se coloc6 una nueva columna de purificaci6n.

- Se añadió a cada una de las muestras 500 µl de Wash Buffer 1 dentro de la columna de purificación.
- Se centrifugó la columna a 10000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se desechó el tubo de colección y se colocó una nueva columna de purificación.
- Se colocó 500 µl de Wash Buffer 2 en la columna de purificación. Se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Se desechó el tubo de colección, y a la columna de purificación se la colocó en un nuevo tubo estéril eppendorf de 1,5 ml.
- Para la purificación del ADN se añadió 50 µl de buffer de elusión PureLink™ en la columna, se dejó reposar 1 minuto.
- Se centrifugó todas las columnas a máxima velocidad durante 3 minutos y a temperatura ambiente.
- Como último paso, se procedió a desechar la columna purificadora, mientras que en el tubo eppendorf ya se puede observar una sustancia cristalina que contiene el ADN genómico, para evitar una degradación molecular se recomienda guardar las muestras a -20°C.

3.4 EXTRACCIÓN DEL ARN MENSAJERO (ARNm)

Como parte de esta investigación, es necesario realizar la extracción del ARNm, ya que se va a estudiar los niveles de expresión génica del polimorfismo C677T del gen MTHFR de 26 mujeres ecuatorianas que padecen cáncer de mama. Se escogieron solamente 26 mujeres ya que presentaban biopsias con tejido tumoral y tejido sano, a comparación del resto de muestras que presentaban solamente tejido tumoral, lo cual no sirvió para poder realizar la expresión génica.

3.4.1. Extracción y Purificación del ARNM a partir de Muestras de Tejido Tumoral y Tejido mamario sano Embebido en Parafina (PureLink™ FFPE RNA Isolation Kit)

- Con la ayuda de un micrótopo SLEE C120010 se extrajo 5 láminas de tejido tumoral y de tejido sano embebido con parafina (10 µm de grosor como máximo), los cuales fueron colocados en tubos estériles de 1,5 ml libre de ARNasa etiquetados según la paciente.
- Se añadió 300 µl de Melting Buffer en el tubo estéril.
- Se centrifugó a máxima velocidad durante 30 segundos, esto para que el buffer se pueda sumergir con los pequeños pedazos de tejido mamario.
- Posteriormente a la centrifugación, se lo dejó incubar por un lapso de 10 minutos a 72°C, con mezclas intercaladas cada 2 minutos con la ayuda de los dedos pegando suavemente al tubo. Debe asegurarse que el tejido quede completamente sumergido dentro del buffer, para que este pueda destruir la parafina.
- Luego de la incubación se agregó 20 µl de Proteinasa K, dentro del tubo que contiene el tejido, se mezcló bien mediante pipeteo y de esta manera asegurarse que el tejido se encuentra bien suspendido.
- Se procedió a incubar cada uno de los tubos a 60°C durante 3 horas. Ocasionalmente se utilizó el vortex para mezclar las diferentes soluciones con los tejidos para que estos puedan ser completamente degradados.
- Una vez que hayan pasado las 3 horas y que no exista tejido que sea visible al ojo humano, se procedió inmediatamente a centrifugar todos los tubos a máxima velocidad por 1 minuto. Esta centrifugación sirvió para poder separar el tejido lisado de la parafina, ya que se formó una capa delgada encima de la solución.
- Se usó una punta de pipeta (1 ml) libre de ARNasa, para que pueda penetrar la capa fina de parafina y de esta manera poder aspirar toda la solución que contiene el tejido lisado. Una vez hecho esto, se

procedió a poner la solución de tejido dentro de un tubo estéril libre de RNasa.

- Se añadió 400 μ l de Binding Buffer (L3) y 800 μ l de etanol al 100% al tubo estéril que contiene el tejido lisado. Se mezcló bien con la ayuda del vortex.
- Se transfirió aproximadamente 700 μ l del volumen que se obtuvo en el paso anterior y se lo colocó dentro de una columna de purificación con su tubo de recolección respectivamente para cada una de las muestras.
- Una vez transferido el volumen indicado se procedió a centrifugar a 800 rpm por el lapso de 1 minuto. Se descartó el fluido que se obtuvo como desecho en la parte inferior del tubo de recolección. Repetir los dos pasos anteriores con el resto del volumen que sobró del primer tubo.
- Cuando se haya logrado cambiar el tubo de recolección usado por uno nuevo, se procede a agregar 500 μ l de Wash Buffer (W5) dentro de la columna.
- Se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto, descartar el desecho que se generó en este proceso.
- Se repitió dos veces el paso del lavado (W5), dando un total de 3 lavados para cada una de las muestras de tejido mamario.
- Se reemplazó el tubo de recolección usado por un tubo nuevo estéril de 1,5 ml.
- Se añadió 50 μ l de RNase-free water, la cual debe estar a una temperatura de 65°C. los 50 μ l deben caer justo en el centro de la columna de purificación. Dejar incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Se removió y descartó la columna purificadora.
- Colocar inmediatamente a -80°C el tubo de 1,5 ml estéril, el cual ya contiene ARN.

- Para la purificación del ARNm, se trabajó con una gradilla congelada, ya que en este paso es muy importante trabajar en frío para evitar la degradación rápida de esta molécula tan sensible e inestable.
- En un tubo estéril de 1,5 ml se colocó 6 μ l de ARN recién extraído, 1 μ l de DNase I, 1 μ l de 10XDNase I buffer y 2 μ l de DEPC-treated water, dando un volumen total de 10 μ l.
- Se mezcló suavemente todo el volumen mediante pipeteo. No se recomienda utilizar en este paso el vortex. Se dejó incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente a la incubación se realizó una centrifugación por 20 segundos a 10000 rpm, se agregó 1 μ l de 25mM EDTA a cada uno de los tubos dentro de la placa de hielo. Se mezcló lentamente con pipeta.
- Se dejó incubar los tubos a 65°C por un lapso de 10 minutos. Se prosiguió a centrifugar los tubos durante 20 segundos a 10000 rpm y se colocó inmediatamente a -80°C.

3.5. OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Para la obtención del ADNc es importante tener en cuenta que se debe trabajar lo más rápido posible, ya que el ARN es una molécula muy inestable. También cabe recalcar que este procedimiento se llevó a cabo en placas frías para evitar degradación de la molécula de ARN. El kit que se utilizó en esta investigación fue: Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit de la casa comercial ROCHE.

- Se procedió a descongelar las muestras de ARN seguido de una rápida centrifugación de 10 segundos a 10000 rpm. Todas las reacciones que se llevaron a cabo a partir de este punto, se las realizó en placas frías.
- En tubos pequeños de PCR, estériles y libres de nucleasas se colocó 4 μ l de ARN que se extrajo previamente, 1 μ l de anchored-

oligo (dT) primer, 2µl de random hexamer primer y 6µl de agua grado PCR, dando así un volumen total de 13 µl. Se procedió a mezclar mediante vortex, durante 5 segundos.

- Inmediatamente se colocaron todos los tubos en un MultiGene TC9600-G® (Labnet, NJ, USA) para una denaturación de 65°C durante 10 minutos. Luego de haber cumplido los 10 minutos dentro del termociclador se colocó los tubos de PCR inmediatamente en una placa fría.
- Una vez que fueron colocados los tubos de PCR correctamente en la placa fría se añadió 4 µl de transcriptor reverse transcriptase reaction buffer, 0,5 µl de protector RNase inhibitor, 2 µl de deoxynucleotide mix y 0,5 µl de transcriptor reverse transcriptase, dando así un volumen final de 20 µl.
- Se procedió a mezclar cada tubo con la mano, con mucho cuidado (no vortex), para no dañar todas las moléculas que se encuentran trabajando.
- Luego se colocó las muestras en el termociclador mencionado anteriormente con el siguiente programa (solamente un ciclo): 10 minutos a 25°C seguido de 30 minutos a 55°C y de 5 minutos a 85°C para poder inactivar la enzima reversa transcriptasa.
- Una vez terminado el ciclo, se almacenó inmediatamente en las placas frías, las cuales se utilizaron anteriormente. En este punto del protocolo ya se ha obtenido ADNc y se recomienda guardarlo a -20°C para evitar degradación de la molécula.

3.6 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.6.1. Análisis Cualitativo

Para determinar la calidad de ADN, ARN y ADNc, producto de los diferentes procesos de extracciones, cada una de las muestras fueron objeto de una prueba de electroforesis horizontal, en un gel de agarosa al 1%, realizado con

TBE 1X (EDTA, TRIS y ácido bórico). Esta concentración permitirá visualizar las diferentes moléculas extraídas, con una resolución aproximadamente de 0,7 Kb. Todas las muestras extraídas fueron sometidas a una carga continua de 70 voltios durante 45 minutos.

Con el uso del bromuro de etidio se pudo observar los diferentes pesos de las moléculas, ya que esta sustancia se intercala fácilmente tanto en ADN, ARN y ADNc permitiendo así una visualización bajo un transiluminador que utiliza luz ultravioleta. Además se utilizó el marcador “Low DNA Mass Ladder Invitrogen™” y el “Low RNA Mass Ladder Invitrogen™” el cual permite obtener el tamaño molecular específico de todas las muestras estudiadas en esta investigación. Estos marcadores está conformados por una mezcla equimolar de seis fragmentos que son: 2000, 1200, 800, 400, 200 y 100 pares de bases (Sambrook, et al., pp.6.5-6.6, 1987).

3.6.2. Análisis Cuantitativo

Las diferentes concentraciones y pureza del ADN, ARN y ADNc fueron determinadas con la ayuda de espectrofotómetro Nanodrop 2000 de la casa comercial Thermo Scientific. Las unidades utilizadas para medir las concentraciones fueron ng/μl.

3.7 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO (GENOTYPING)

Mediante los métodos de PCR-RFLP y secuenciación capilar se determinó el genotipo de los individuos en esta investigación, tanto en el grupo afecto como el grupo control, para poder establecer diferencias entre estos dos grupos.

3.7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, la cual se la conoce comúnmente como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), es una de las

técnicas moleculares más utilizadas hoy en día en los laboratorios de investigación, debido a la alta fiabilidad y discriminación que presenta al momento de amplificar y evaluar fragmentos con algún polimorfismo de nucleótido simple (SNP's), utilizando una enzima específica conocida como ADN polimerasa, la cual se encarga de replicar hebras separadas de ADN en múltiples copias (Watson et al., 2008; Bartlett y Sirling, 2003).

El ADN genómico que se obtuvo a partir de las muestras de sangre periférica para el grupo control y a partir de tejido tumoral embebido en parafina para el grupo afecto con cáncer de mama, sirvió como templado para poder realizar la amplificación del exón 4 del gen MTHFR y de esta manera poder determinar el genotipo y la presencia/ausencia del polimorfismo C677T en la población en estudio.

3.7.1.1. Amplificación del Gen MTHFR

Se procedió a realizar la reacción de PCR del exón 4 del gen MTHFR dentro de un cuarto aislado y con una campana de flujo con el fin de minimizar el factor contaminación y de esta manera poder obtener mejores resultados. Para la amplificación del fragmento de 86 pares de bases (pb) del exón 4 del gen MTHFR se obtuvo un volumen final de 50 µl por cada muestra, la cual estuvo conformada por: 4µl de ADN genómico, 34 µl de H₂O Milli-Q, 1,5 mM de MgCl₂, 5µl de 10X buffer (200 mM de Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 0,2 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP's), 0,4 µM del cebador FW 5'-TGA CCT GAA GCA CTT GAA GGA GAA-3', 0,4 µM del cebador RV 5'-GGA AGA ATG TGT CAG CCT CAA AGA-3' (Ulvik y Ueland, 2001), y 2,5 unidades (U) de Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA).

El termociclador utilizado para esta investigación fue el MultiGene TC9600-G® (Labnet, NJ, USA), y las condiciones para llevar a cabo la reacción de PCR fueron: denaturación inicial fue de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C para permitir que se anillen los

cebadores, 45 segundos a 70°C para la extensión del fragmento, y una elongación final por 3 minutos a 72°C.

La comprobación de la amplificación del fragmento de 86 pb del exón 4 del gen MTHFR se realizó a través de una electroforesis a 90 V, haciendo migrar los amplicones en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, y las bandas amplificadas se observaron con la ayuda de un transiluminador ImageQuant 300 (General Electric, Fairfield, USA) (Figura 12).

3.7.2. Digestión con Enzimas de restricción (RFLP: Análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica)

Como se sabe, la primera generación de los marcadores moleculares de ADN fueron los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's). Esta técnica es un marcador genético bi-alélico y se basa en la ausencia o presencia de una secuencia específica, en la mayoría de los casos estos marcadores moleculares son utilizados a partir de una amplificación previa por PCR. Los productos de PCR se los incubaba con la enzima de restricción específica para la secuencia que se está investigando y luego es testada para observar si el fragmento de ADN ha sido cortado (Castaño y Bilbao, 1997).

Dentro de la semejanza entre los individuos de una misma especie, se sabe que existen variaciones individuales de secuencias con lo que se refiere a la información genética (Krebs et al., 2011). En el polimorfismo C677T ocurre el cambio de una base citosina por una base timina, haciendo que el proceso de traducción sintetice un residuo de valina en lugar de sintetizar el residuo valina (Hosseini et al., 2010).

3.7.2.1 Análisis de la variante Ala677Val con la enzima de restricción HinfI

Para el análisis de la variante C677T del exón 4 del gen MTHFR, se procedió a realizar la técnica PCR-RFLP a partir de los productos de PCR obtenidos

previamente. El volumen final de la reacción de digestión fue de 50 µl la cual estuvo conformada por: 12,5 µl de H₂O Milli-Q, 5 µl de buffer de digestión, 30 µl de producto de PCR y 1,5 µl de la enzima de restricción HinfI (Promega, Madison, WI). A todas las muestras se las incubó en el termociclador MultiGene TC9600-G (Labnet, NJ, USA) a 37°C por el lapso de 4 horas, y como paso final, a la enzima HinfI se la inactivó a 80°C durante 15 minutos.

Luego de realizar la digestión con la enzima HinfI, se procedió a testar los productos digeridos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 5% (Sambrook et al., p.6.5, 1987), con el propósito de determinar la ausencia o presencia del SNP C677T del gen MTHFR y así determinar el genotipo respectivo de cada uno de los individuos en estudio con la ayuda de un transiluminador ImageQuant 300 (General Electric, Fairfield, USA). Cuando la enzima de restricción no reconoce el sitio de corte se pudo observar en el gel una banda de 86 pares de bases, demostrando que se trata de un individuo homocigoto normal (Ala/Ala); cuando la enzima HinfI reconoce el sitio de corte y se logra observar tres bandas de 86, 50 y 36 pares de bases, estamos hablando de un individuo heterocigoto (Ala/Val); y si la enzima reconoce el sitio de corte y se observan dos bandas de 50 y 36 pares de bases, estamos hablando de un individuo homocigoto (Val/Val) (Figura 13). Siendo el sitio de reconocimiento de la enzima HinfI:

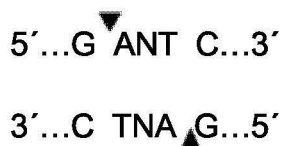


Figura 1. Enzima HinfI

3.7.3 ANÁLISIS GENÉTICO MEDIANTE SECUENCIACIÓN CAPILAR

A la secuenciación capilar también se la conoce como el método de Sanger. Este método tiene como finalidad leer cada base nitrogenada, la cual estará

marcada defectivamente, con lo cual la reacción que se está llevando a cabo se detendrá al momento de encontrar una base defectiva, de tal forma que irán apareciendo varias bandas progresivamente (Wellcome Trust Sanger Institute, 2014). Cada uno de los nucleótidos serán marcados con un colorante fluorescente diferente (4 colores); las bandas de ADN serán detectadas por su fluorescencia emitida dentro del equipo según vayan pasando delante de un lector láser, al cual si se lo mueve de forma horizontal se podrá leer varias secuencias al mismo tiempo. Todos los datos que se están generando en ese instante pasarán a un sistema computarizado, haciéndolo más fácil la lectura de cada muestra que fue secuenciada (Paz-y-Miño & López-Cortés, 2014, p.129).

3.7.3.1. Análisis de la variante Ala677Val del gen MTHFR

Una vez analizados los genotipos de los grupos casos y controles mediante la técnica de PCR-RFLP, se procedió a confirmar dichos resultados a través del análisis de secuencias con la ayuda del equipo Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Austin, TX). Para la reacción de secuenciación, el volumen final fue de 12 μ l la cual estuvo conformada por: 2,8 μ l de H₂O Milli-Q, 2 μ l de 5X buffer, 1 μ l de primer FW, 1 μ l de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y 3 μ l de producto de PCR. El programa de amplificación estuvo conformado por 3 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 4 minutos a 60°C (López-Cortés et al., 2013). Por último, el análisis de secuencias se llevó a cabo a través del Sequencing Analysis Software 5.3.1 (Applied Biosystems, Austin, TX), mientras que el alineamiento de las secuencias se lo llevo a cabo en el GeneBank (MTHFR NG_013351), a través del Seq-Scape Software v2.6 (Applied Biosystems, Austin, TX) (Figura 14).

3.8 EXPRESIÓN GÉNICA

De los 23.000 genes presentes en el genoma humano, únicamente se expresará una fracción de ellos en un momento dado. Por eso la regulación de

la expresión génica dentro del cuerpo humano constituye un aspecto importante en lo que refiere a la regulación global del metabolismo de la célula, mantenimiento de las diferentes estructuras y funciones puntuales en el desarrollo de la célula. Toda esta regulación se da a nivel de transcripción o de traducción (Krebs et al., 2011, pp.737-739; Paz-y-Miño & López-Cortés, 2014, pp.116-120).

En esta investigación se estudió la expresión génica de 26 tejidos, tanto sanos como enfermos del polimorfismo C677T del gen MTHFR, y de esta forma poder evaluar y ver si en la población de estudio existe una sobre-expresión o sub-expresión de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).

3.8.1 PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR)

La q-PCR o real-time PCR en inglés, es una de las técnicas moleculares más utilizadas hoy en día ya que es el principal método para cuantificar niveles de expresión génica (De Kok et al., 2000). La q-PCR tiene la habilidad de detectar una cantidad específica del producto de PCR mediante fluorescencia. El tipo de fluorescencia utilizada en esta investigación fue el SYBR-Green I (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), el cual se une fácilmente con los productos amplificados de la q-PCR, además de ser potencialmente rápida, sensible, y barata en comparación de las sondas TaqMan (Ponchel et al., 2003).

La q-PCR se la puede dividir en cuatro fases importantes: la fase lineal, fase exponencial temprana, fase exponencial y fase final (Tichopad et al., 2003). Durante la fase lineal, que por lo general son los 15 primeros ciclos, la PCR ha iniciado y los diferentes niveles de fluorescencia en cada ciclo todavía no son lo suficientemente fuertes para que puedan ser leídos por el equipo. En la fase exponencial temprana la cantidad de fluorescencia alcanza el umbral (C_T), este valor es muy utilizado para resultados experimentales (Heid et al., 1996; Wong & Medrano, 2005). Durante la fase exponencial la PCR ha alcanzado la amplificación óptima para el gen de interés (MTHFR), la fase final es cuando la

fluorescencia ha disminuido su intensidad y el equipo no es capaz de generar datos (Bustin, 2000).

Una vez sintetizadas las muestras de ADNc de tejido sano y tumoral de mujeres afectas con cáncer de mama, se procedió a cuantificar el gen target MTHFR y el gen constitutivo GAPDH el cual sirvió como calibrador. Se realizó una cuantificación relativa (Maltseva et al., 2013), usando el LightCycler 480 SYBR Green I Master kit y el LightCycler 480 II Real-Time Quantitative PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Para el análisis de q-PCR se utilizó un volumen final de 20 μ l conformados por: 1 μ l de cebadores FW y RV del gen MTHFR (1 μ M), 1 μ l de cebadores FW y RV del gen GAPDH, 5 μ l de ADNc (21 ng), 4 μ l de agua Milli-Q y 7 μ l de master mix (FastStart Taq DNA polymerase, buffer de reacción, dNTP's, SYBR Green I dye y $MgCl_2$). El LightCycler 480 software release 1.5.0 SP3 ejecutó el programa de real-time q-PCR, el cual estuvo conformado por: 10 minutos a 95°C, seguido de 55 ciclos de cuantificación a 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 62°C y 9 segundos a 72°C. Para el análisis de la curva de melting el programa estuvo configurado para 5 segundos a 95°C, y 1 minuto de 65°C a 97°C (Figura 15).

3.8.1.1. Obtención de valores C_T

La q-PCR es una de las técnicas en donde se puede combinar la amplificación y detección del amplicón al mismo tiempo (Wong & Medrano, 2005). Todo este proceso se lleva a cabo gracias a utilización de moléculas fluorescentes (TaqMan, SYBR Green, Beacon), las cuales interactúan con el producto de PCR. Gracias a las moléculas fluorescentes que se encuentran en las diferentes muestras, el equipo será capaz de detectar la primera señal que se emita; es decir el primer ciclo de amplificación del gen de interés (MTHFR). A esta señal se la conoce como C_T (Cycle Threshold), que vendría a ser la intersección entre la curva de amplificación y la línea del umbral (Applied Biosystems, 2008; Wong & Medrano, 2005). Consecuentemente, mientras la

muestra de ADNc o ADN sea de buena calidad existirá altos niveles de fluorescencia y el valor de C_T será bajo, es decir existirá una relación inversamente proporcional entre la calidad de ADN y el valor de C_T (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996).

Todas las 26 muestras que fueron seleccionadas para el análisis de expresión génica fueron repetidas 3 veces, tanto casos como controles para así poder sacar un promedio total del valor de C_T y de esta forma evitar sesgos en la investigación (Schmittgen & Livak, 2008). Los valores de C_T fueron recopilados en una base de datos, y fueron sometidos a análisis comparativo con el método Livak, conjuntamente con los historiales clínicos de los individuos en estudio (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008).

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información de los historiales clínicos de los pacientes se recopiló en una base de datos. Después de determinar cada uno de los genotipos del grupo afecto con cáncer de mama y el grupo control, se realizaron varios análisis estadísticos. Se calcularon frecuencias alélicas y genotípicas del gen MTHFR; como se sabe el cálculo de las frecuencias alélicas se las realiza dividiendo el número de alelos que se encuentran alterados para el número total de alelos que fueron estudiados, cada individuo posee dos alelos; con respecto a las frecuencias genotípicas para cada grupo (caso-control) se dividió el número de individuos de cada genotipo (homocigoto normal, heterocigoto, homocigoto mutante) para el número total de los individuos; la suma total de todas las frecuencias deben sumar 1.00. Las frecuencias genotípicas esperadas, se calcularon a partir de las frecuencias alélicas con la ayuda de la ecuación de Hardy-Weinberg: $(p+q)^2 = (p^2+2pq+q^2)$, en donde la frecuencia de los homocigotos corresponden a: p^2 y q^2 y para los heterocigotos es $2pq$ (Hamilton, 2011, p.17).

Mediante el programa estadístico PASW 18 (SPSS, Chicago, IL), se aplicaron dos pruebas estadísticas a esta investigación; Chi-cuadrado (χ^2), el cual determina si existen diferencias significativas entre el grupo afecto y el grupo control con el polimorfismo C677T del gen MTHFR y Odds ratio (OR) conocido también como riesgo relativo, en donde determinará la probabilidad de un individuo de desarrollar la enfermedad en presencia del polimorfismo, entre los grupos afectados y controles (Ponce et al., 2001). También se tomó en cuenta la prueba de Odds ratio para establecer si los factores de riesgo del cáncer de mama y las características histopatológicas e inmunohistoquímicas presentan alguna correlación con el polimorfismo Ala677Val y con la enfermedad. Los cálculos de Odds ratio (OR) se los efectuó mediante tablas de contingencia de 2 x 2 y con un intervalo de confianza al 95%.

Para la expresión génica, los valores de C_T fueron analizados mediante el método Livak $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Anexo 9) y los valores de delta (Δ) de casos y controles fueron analizados con la ecuación U Mann-Whitney. Todos los valores que fueron menores a $p < 0,05$ se los tomó como valores significativos.

4. RESULTADOS

4.1 HISTORIALES CLÍNICOS

Todos los historiales clínicos del grupo afecto con cáncer de mama fueron analizados en una base de datos perteneciente al Hospital Oncológico Solon Espinosa Ayala (SOLCA). Para esta investigación se tomó en cuenta la edad de los pacientes, lateralidad (seno afectado) y las diferentes clasificaciones tanto patológicas como inmunohistoquímicas. La clasificación molecular se la realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas.

4.1.1. Edad

La edad media de los individuos con cáncer de mama al momento que fueron diagnosticadas fue de 50 años, cuyo rango varió entre 29 a 84 años. El 41,2% de los individuos afectados tenía una edad entre 35 y 49 años, mientras que el 55,3% de los individuos tenían una edad superior a la edad media (Tabla 1).

Por otro lado, la edad media del grupo control fue de 42 años. El 47,17% de los individuos control tenía una edad inferior a 50 años, mientras que el 52,82% de los individuos control tenía una edad superior a la edad media.

4.1.2. Lateralidad

La lateralidad también se tomó en cuenta al momento de analizar los diferentes historiales clínicos. Se observó que el seno derecho tuvo una mayor incidencia con un 57,9%, mientras que el seno izquierdo tuvo una menor incidencia con un 42,1% del total de la población en estudio (Tabla 1).

4.1.3. Estadio Tumoral

Las 114 muestras de tejido mamario embebido en parafina fueron estadificadas respectivamente mediante la clasificación TNM, y se obtuvo como resultado que el 72,8% de las mujeres presentó tumores en estadio 1 y 2 (T2N1M0), el 15,8% presentó tumores en estadio 3 y 4 (T2N3bM1), y el 11,4% de las mujeres fueron estadio 0 (T0N0M0) (Tabla 1). La clasificación y descripción del TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis) de los diferentes estadios en cáncer de mama se puede observar en el anexo 4.

4.1.4. Clasificación Histopatológica y Molecular

De los 114 individuos afectados con cáncer de mama, 15 de ellos (13,15%) fueron diagnosticados con carcinoma ductal in situ. El 86,85% restante está comprendido entre diferentes diagnósticos, como: carcinoma ductal infiltrante, 81 individuos (71,05%); carcinoma lobulillar in situ 1 individuo (0,9%); carcinoma lobulillar infiltrante 10 individuos (8,8%); carcinoma papilar invasor 2 individuos (1,75%); carcinoma mucinoso 4 individuos (3,50%) y 1 individuo (0,9%) con carcinoma medular (Tabla 2). Con relación al polimorfismo estudiado del gen MTHFR, el carcinoma ductal infiltrante fue el perfil histopatológico con mayor porcentaje en C677T (CC, CT y TT).

Con respecto a la clasificación molecular (anexo 6), se encontró que 55 mujeres (48,2%) presentaban un perfil luminal A, 26 mujeres (22,8%) presentaron un perfil luminal B, 14 mujeres (12,3%) presentaron un perfil HER2/neu y 19 mujeres (16,7%) presentaron un perfil triple negativo, dando así un total de 114 mujeres estudiadas (Tabla 1).

4.1.5. Clasificación Inmunohistoquímica

De las 114 muestras de cáncer de mama se encontró que, 72 mujeres (63,2%) eran positivas para receptores de estrógeno y 42 mujeres (36,8%) eran

negativas para el receptor de estrógeno. Para el receptor de progesterona se encontró que 67 mujeres (58,8%) eran positivas y 47 mujeres (41,2%) eran negativas. Con respecto al factor de crecimiento epidérmico (HER) se observó que 33 mujeres (28,9%) daban como positivas y 81 mujeres (71,1%) daban como negativas (Tabla 1).

4.2. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO, ARN MENSAJERO Y ADN COMPLEMENTARIO

Mediante la aplicación de protocolos para la extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica, se obtuvo un total de 195 muestras de ADN de individuos no afectados con carcinoma mamario. De la misma manera, se extrajo ADN de 114 individuos afectados con cáncer de mama a partir de tejido embebido en parafina.

Para la parte de expresión génica fue necesario extraer el ARNm de 26 muestras, tanto tejido sano como tejido neoplásico mamario. Una vez obtenido el ARNm de las 26 muestras inmediatamente se transformó a ADNc con la ayuda del kit: Transcriptor First Strand cDNA Synthesis de la casa comercial ROCHE. Todas las muestras de ADN, ARNm y ADNc fueron purificadas.

4.3. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ADN, ARNm Y ADNc

Se evaluó la concentración de todas las muestras de ADN, ARN y ADNc, tanto de individuos afectados como los individuos control mediante el uso del NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Para las muestras de ADN del grupo afecto, se obtuvo una concentración promedio de 84,35 ng/ μ l, siendo la concentración más baja 9,3 ng/ μ l y la más alta 271,2 ng/ μ l. Para el grupo control se obtuvo una concentración promedio de 35,15 ng/ μ l, siendo la concentración más baja 8,8 ng/ μ l y la más alta 161,4 ng/ μ l.

En cuanto a las muestras de ARN del grupo afecto se obtuvo una concentración promedio de 1083,5 ng/ μ l, siendo la concentración más baja 552,1 ng/ μ l y la más alta 1673,3 ng/ μ l. Para el grupo control se obtuvo una concentración promedio de 671,16 ng/ μ l, siendo la concentración más baja 196 ng/ μ l y la más alta 1395,8 ng/ μ l.

De la misma manera las muestras de ADNc fueron evaluadas, dando una concentración final de 2808,66 ng/ μ l para el grupo afecto con cáncer de mama, siendo la concentración más baja 2399,5 ng/ μ l y la más alta 3357,3 ng/ μ l. Para el grupo control, la concentración promedio fue de 2650,55 ng/ μ l, siendo la concentración más baja 2533,7 ng/ μ l, y la más alta 2907,8 ng/ μ l.

4.4 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

4.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la técnica molecular de la PCR se amplificó el exón 4 del gen MTHFR, a partir de las muestras de ADN de los individuos controles y afectados.

4.4.1.1. Amplificación del exón 4 del gen MTHFR

Para la amplificación del exón 4 del gen MTHFR, se utilizaron 309 individuos. Todas las muestras tanto del grupo control como afecto presentaron un peso molecular de 86 pares de bases (Figura 12).

4.4.2. Digestión Enzimática

4.4.2.1. Análisis de la variante Ala677val con la enzima de restricción HinfI

Para analizar la presencia o ausencia de la variante C677T del exón 4 del gen MTHFR, se procedió a realizar la digestión enzimática con la enzima HinfI.

- Los individuos homocigotos normales (Ala/Ala) presentaron un fragmento de 86 pares de bases, ya que la enzima no reconoce el sitio de restricción (Figura 13).
- Los individuos heterocigotos (Ala/Val) presentaron 3 fragmentos de 86, 50 y 36 pares de bases, esto se debe a que la enzima HinfI reconoce el sitio de corte que se encuentra en la secuencia de ADN (Figura 13).
- Los individuos homocigotos mutantes (Val/Val) presentaron fragmentos de 50 y 36 pares de bases, ya que la enzima reconoce el sitio de corte, que consiste en una transversión de citosina por timina en el codón 222 del exón 4 (Figura 13).

4.4.3. SECUENCIACIÓN DEL ADN

4.4.3.1. Análisis Genético de la variante Ala677Val

Se procedió a secuenciar todas las 309 muestras, verificando de esta forma todos los genotipos que fueron encontrados después de la digestión enzimática por la enzima HinfI.

- Los individuos homocigotos normales (CC), presentaron una curva azul en la posición del nucleótido 677, la cual fue interpretada por el software del equipo de secuenciación (Figura 14).
- Los individuos heterocigotos (CT), presentaron una curva azul y roja sobrepuestas en la posición del nucleótido 677, la cual fue interpretada por el software del equipo de secuenciación (Figura 14).
- Los individuos homocigotos mutantes (TT), presentaron una curva roja en la posición del nucleótido 677, la cual fue interpretada por el software del equipo de secuenciación (Figura 14).

4.5 FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS

4.5.1 C677T

En la tabla 3 se puede observar las diferentes distribuciones de frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas, las cuales fueron encontradas en el polimorfismo C677T. Dentro de los individuos afectos se encontró que las personas con un perfil homocigoto normal (CC) presentaron una frecuencia genotípica de 0,22, los heterocigotos (CT) una frecuencia genotípica de 0,66 y los homocigotos mutantes (TT) 0,12. Con respecto a las frecuencias alélicas del grupo afecto, se observó que individuos homocigotos normales (C/C) presentaron una frecuencia de 0,55, en comparación de los homocigotos mutantes (T/T) que presentaron una frecuencia de 0,45.

4.6 EXPRESIÓN GÉNICA

4.6.1. Obtención de valores C_T del perfil Inmunohistoquímico: RE+/RP+/HER-

Se evaluó la expresión génica del perfil inmunohistoquímico RE+/RP+/HER-, esto se debe a que la población ecuatoriana en estudio presentó un patrón similar por este perfil inmunohistoquímico, y puede llegar ser un patrón único para las personas que padecen cáncer de mama en la población ecuatoriana. Como se mencionó anteriormente, cada muestra de las 26 que fueron escogidas para realizar expresión génica fue replicada 3 veces para poder sacar un promedio y de esta manera evitar sesgos en la investigación. En la tabla 6 podemos observar el valor promedio tanto de la muestra caso y control con su respectivo gen constitutivo (GAPDH), y los valores de C_T fueron aplicados en la ecuación de Livak (anexo 9) para poder ver la expresión génica de la enzima Metilentetrahidrofolatoreductasa de los individuos estudiados.

4.6.2 Obtención de valores C_T del perfil Inmunohistoquímico: RE-/RP-/HER-

Se analizó los valores de C_T del perfil inmunohistoquímico triple negativo (RE-/RP-/HER-), ya que este patrón es el más agresivo y difícil de tratar con lo que respecta al cáncer de mama (Kumar et al., 2012), y solamente un porcentaje bajo de la población lo posee. En la tabla 6 se puede observar el promedio de cada una de las muestras estudiadas, tanto del grupo afecto como el grupo control con su respectivo gen constitutivo, así como también la expresión génica que presenta cada individuo con respecto a la enzima MTHFR.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.7.1. Equilibrio Hardy-Weinberg en la población de estudio

Se determinó que la población de estudio se encuentra en equilibrio, tanto en afectados como controles ya que el valor que se obtuvo para la ecuación de Hardy-Weinberg fue de 0,78 (Tabla 3). Valores no significativos demuestran que una población en equilibrio ($p > 0,05$).

4.7.2. Prueba χ^2 entre individuos sanos y afectados

La prueba de Chi-cuadrado se realizó para determinar un nivel de significancia del polimorfismo C677T entre el grupo afecto y grupo control. Al momento de correlacionar los datos del total de las 114 mujeres afectas con cáncer de mama: 25 (21,9%) mujeres presentaron el genotipo C/C, 75 (65,8%) con el genotipo C/T y 14 (12,3%) con genotipo T/T (Tabla 1); Del total de 195 individuos controles: 69 (35,38%) presentaron genotipo C/C, 113 (57,95%) con genotipo C/T y 13 (6,67%) con genotipo T/T (Tabla 4).

4.7.3. Prueba de Odds Ratio entre genotipos y población de estudio

Del total de 114 individuos afectados, 25 de ellos presentaron alelo normal (C/C), y 89 presentaron alelo mutante ya sea C/T o T/T; en cuanto a los individuos control del total de 195 individuos, 69 de ellos presentaron alelo normal (C/C) y 126 individuos presentaron un alelo mutante C/T o T/T (Tabla 4).

En la tabla 4 se detalla la asociación que existe entre la presencia del polimorfismo y el riesgo a desarrollar cáncer de mama. Con respecto a los individuos homocigotos mutantes (C/T) presentaron un OR de 1,8 (95%IC= 1,1-3,2; P= 0,039), los individuos homocigotos mutantes (T/T) presentaron un OR de 2,9 (95% IC= 1,2-7,2; P= 0,025), mientras que la combinación de los genotipos C/T y T/T generaron un OR de 1,9 (95% IC=1,1-3,3; P= 0,019).

4.7.4. Prueba de Odds Ratio entre genotipos y características histopatológicas

Dentro de la tabla 5, se puede observar que la variable seno afectado no presenta ninguna asociación entre la histología de la mujer con respecto al genotipo que posee, ya que el valor de P (0,990) demostró ser no significativo. Dentro de la variable de estadio tumoral, cabe recalcar que solamente se tomó en cuenta del estadio 1 hasta el estadio 4, excluyendo el estadio 0, quedando así solamente 101 individuos en esta variable, ya que el estadio 0 se lo está tomando como referencia, es decir un estadio sano. De igual manera, no se observó asociación entre el estadio tumoral con el genotipo del gen MTHFR, ya que su valor de significancia fue de 1,00. Con respecto a las características inmunohistoquímicas, tanto los receptores de estrógenos, progesterona y HER2, tampoco no se logró observar una asociación cercana con los genotipos de las pacientes de esta investigación. El valor de P fue: 0,203, 0,711 y 1 respectivamente.

4.7.5. Prueba U-Mann Whitney entre valores C_T de sanos y afectos

En la tabla 6, se agruparon 26 muestras tanto de tejido tumoral como tejido sano, con sus respectivos genotipos y receptores hormonales. Dentro de la tabla se tomaron los promedios de todos los valores de C_T tanto para el gen de referencia (GAPDH) como el gen de estudio (MTHFR), aplicando la ecuación de Livak (Anexo 9) para ver la expresión génica de cada individuo. Cabe recalcar que cada muestra se la repitió 3 veces, y de esta forma se obtuvo el promedio general.

Por otro lado, en la parte derecha de la tabla se encuentran los valores estadísticos de P. La prueba estadística aplicada para esta tabla fue la prueba de U-Mann Whitney, ya que se debe evaluar tres diferentes variables que son: genotipos, clasificación molecular y el valor final de delta (Δ). Dicha prueba arrojó un valor significativo de 0,034 para el grupo que posee un perfil molecular triple negativo, comparándolo con los respectivos alelos. En cambio, para el grupo molecular Luminal A, su valor de P fue de 0,827, arrojando un valor no significativo para esta clasificación molecular con sus respectivas variables evaluadas en esta tabla.

5. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que presenta una alta incidencia y mortalidad a nivel mundial después del cáncer de pulmón (Anexo 1 y 2). En los últimos años se ha incrementado significativamente el número de individuos afectados con cáncer de mama en el Ecuador y por ello se estima que para los próximos cinco años esta enfermedad siga ocupando el primer lugar en enfermedades femeninas dentro del país. Entre los años 2003-2005 la incidencia fue de 35,8 con una tasa de mortalidad de 9,1; Para esos mismos años se registró en la provincia de Pichincha una alta incidencia de 35,6, dando un promedio aproximado de 732 mujeres afectas con cáncer de mama, de las cuales 200 terminaron en defunciones (Anexo 3) (Jemal et al., 2011; Cueva y Yépez, pp.133-134, 2009). Es por ello que resulta interesante realizar una investigación de esta enfermedad dentro de la población femenina debido a su alta incidencia que presenta y además de aportar información científica la cual permitirá conocer el comportamiento epigenético de las mujeres ecuatorianas.

Los diferentes factores que están relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer de mama son varios, como: historial familiar, actividad hormonal, ambiente, edad de la menarquía y menopausia, constituyendo un rol importante el cual se encuentra demostrado en la literatura y en los datos que fueron presentados en esta investigación (Maruti et al., 2009; Clarke et al., 2003; Ergul et al., 2003; Ramalho et al., 2014). En los datos presentados se encontró que la población de estudio presentó una media de 50 años, dentro de un rango de 29 y 84 años. Anderson y su grupo de trabajo, afirman que existen dos edades importantes al momento de desarrollar y diagnosticar el cáncer de mama. El primer cáncer de mama tiende a surgir en una etapa temprana de la vida con una edad aproximada de los 50 años, generalmente este cáncer presenta un comportamiento muy agresivo. El segundo cáncer de mama ocurre en una etapa avanzada de la vida, muy cerca a los 70 años y usualmente se presenta de una forma más indolente a comparación del primer cáncer (Anderson et al.,

2014). Este dato debería ser tomando muy en cuenta por los doctores al momento de pronosticar e iniciar el tratamiento oncológico para la paciente.

Solamente el simple cambio de un nucleótido en el gen MTHFR, reduce la termoestabilidad de esta enzima, debido a que la actividad se ve afectada a una temperatura de 37°C. Individuos homocigotos (T/T) presentan una actividad baja de la enzima entre 50% y 60% a 37°C, un 65% de baja actividad cuando se llega a temperaturas altas como 46°C, si se lo compara con personas normales no mutadas (Kang et al., 1988). En esta investigación se analizaron 114 muestras de biopsias mamarias y se encontró: 22 individuos homocigotos normales (C/C), 78 individuos heterocigotos (C/T), y 14 individuos homocigotos mutantes (T/T). El hecho que la enzima MTHFR no sea capaz de catalizar una reacción normal dentro del metabolismo, permite que existan altos niveles de homocisteína en el plasma en individuos homocigotos mutantes, mientras que los sujetos heterocigotos presentaran niveles medios de homocisteína comparados con las personas normales (Rozen., 1997). Todos estos cambios en el plasma y la deficiencia de folatos en el organismo, se convierten en factores de riesgo para el desarrollo de diferentes enfermedades como las cardiovasculares, malformaciones congénitas, glaucoma, defectos del tubo neural y varios tipos de cáncer como: gástrico, esófago, colorrectal, ovario y leucemia (Michael et al., 2008; Hejimens et al., 2003; Wilson et al., 1999; Sharp & Little, 2004; Robien et al., 2003; Shen et al., 2001; Song et al., 2001; Miao et al., 2002; Gershonia-Baruch et al., 2000).

Dentro de las malformaciones congénitas, varios estudios han asociado el riesgo a desarrollar Síndrome de Down en el feto, cuando la madre presenta el polimorfismo C677T (Rai et al., 2014); así mismo existen varios estudios en donde este polimorfismo está asociado con el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson dentro de las poblaciones asiáticas y caucásicas (Wu et al., 2013). Con referencia al cáncer, se ha visto que la deficiencia de folatos puede incrementar la incidencia a desarrollar esta enfermedad, esto se debe a la falta de grupos metilo dentro de

la ruta metabólica de los folatos. El grupo metil cumple con la función de proteger tanto a proteínas como ADN, y el hecho que exista una destabilización en el ADN por falta de protección incrementa la posibilidad que exista aberraciones cromosómicas (McKinnon y Caldecott, 2007).

Profundizando en la enfermedad del cáncer, el polimorfismo C677T del gen MTHFR, se ve comprometido no solo en el cáncer de mama, sino que también en diferentes cánceres como de estómago, próstata y otros más. El cáncer de estómago es el séptimo cáncer más común a nivel mundial (Jemal et al., 2011). El bajo consumo de folatos dentro de frutas y vegetales se ha visto que incrementa la incidencia en este cáncer (La Vecchia et al., 1994), al igual que el polimorfismo, que contribuye a la incrementación de las probabilidades del cáncer gástrico, dentro de las poblaciones Asiáticas y Caucásicas (Dong et al., 2010; Lin et al., 2014). En el cáncer de próstata sin embargo existen diferentes conclusiones con el riesgo a desarrollar esta enfermedad; por ejemplo para la población Asiática el tener el polimorfismo representa una reducción significativa en contraer esta enfermedad (Wu et al., 2010), pero para la población masculina ecuatoriana representa un alto riesgo presentar este polimorfismo ya que existirá altas probabilidades de desarrollar cáncer de próstata (López-Cortés et al., 2013), a comparación de estas dos diferentes poblaciones, se encontró que la población Iraní masculina no presenta ninguna asociación con la enfermedad y el polimorfismo (Fard-Esfahani et al., 2012).

Con respecto al cáncer de mama y el polimorfismo C677T se ha logrado estudiar profundamente, generando varios conflictos de resultados en las diferentes poblaciones de estudios. En la población de mujeres de China, el polimorfismo llego a ser significativo con la asociación a desarrollar cáncer de seno (Liang et al., 2013; Wang et al., 2014). Por el contrario, la población de Siria, Australia y Escocia fueron reportadas como poblaciones que no presentan ninguna asociación con el polimorfismo C677T y el riesgo a padecer cáncer de mama (Lajin et al., 2012; Beilby et al., 2004; Sharp et al., 2002). Por esta razón, existe un continuo debate en los efectos que presenta este

polimorfismo en el cáncer de mama. Esta investigación es el primer estudio realizado en la población mestiza femenina del Ecuador y el quinto en Latinoamérica (Carvalho et al., 2012 [a]; Batschauer et al., 2011; Ma et al., 2009; Carvalho et al., 2012 [b]). La importancia de este estudio radica en determinar el comportamiento genético relacionando los diferentes perfiles inmunohistoquímicos de las pacientes con el polimorfismo MTHFR C766T en ecuatorianos, y de esta manera comparar sus datos con diferentes etnias mundiales.

Dentro del polimorfismo C677T del gen MTHFR se observó que el grupo afecto, presentó una mayor frecuencia genotípica de C/T (0,64), mientras que en el grupo control se observó una menor frecuencia genotípica en C/T (0,58). Con respecto a la frecuencia alélica se observó que el alelo C dentro del grupo afecto se encuentra presente en mayor proporción (0,55) que el alelo T (0,45); mientras que en el grupo control se observa que el alelo C sigue predominando con 0,64 a comparación del alelo T (0,36). Es por ello que el análisis de Hardy-Weinberg arroja una cifra no significativa de 0,78, demostrando una población en equilibrio genético (Tabla 3). Según Ergul et al., encontraron que dentro de la población Turca afecta con cáncer de mama, presenta una mayor frecuencia genotípica de C/C (0,51), y su grupo control de C/C con 0,49. Por otro lado la frecuencia alélica turca del alelo T se encuentra presente con un 0,31 en el grupo afecto y con un 0,29 en el grupo control; estos datos fueron estadísticamente significativos ($\chi^2= 7,234$; $p= 0,027$) (Ergul et al., 2003). Si comparamos estas dos poblaciones, podemos asumir que la población Ecuatoriana presenta un porcentaje mayor de mestizaje por la combinación de alelos que existen, a comparación del país Turco; ya que se observa que el genotipo C/T tanto en casos como en controles (0,64; 0,58) predomina dentro de nuestra población, por ende la variedad genética que se encuentra en el Ecuador es mucho más diversa que en Turquía. Esto se debe a que la población ecuatoriana es heterogénea como resultado de la mezcla entre nativos americanos, europeos y africanos (Paz-y-Miño & López-Cortes, pp 45-53, 2014).

Se sabe que las mujeres caucásicas tienen la tasa más alta de cáncer de mama. El riesgo en desarrollar cáncer de mama dentro de 20 años siguientes a la edad de los 50 años es 1 en 15 (6,6%) en este grupo, 1 en 20 (5,0%) en mujeres afroamericanas, 1 en 26 (3,9%) en asiáticas y 1 en 27 en hispanas (3,7%) (Morris et al., 2001). Sin embargo, las mujeres de origen hispano o africano se presentan en una etapa más avanzada y con una tasa de mortalidad aumentada. Esto se debe a los factores sociales, como el fácil acceso a hospitales, creencias religiosas y el uso menor de la mamografía así como también el genoma de las diferentes etnias, pueden contribuir a esas diferencias (Morse et al., 2014; Ziv et al., 2006; Fejerman et al., 2014). Tanto las mujeres hispanas como las afroamericanas tienen a desarrollar cáncer a una edad más joven, mucho antes que la menopausia, por ende sus neoplasias tendrán mayor probabilidad de que sean poco diferenciadas y presenten un receptor de estrógeno negativo (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer., y Beral, V, 2002).

Por otro lado, la asociación entre las características clínico-patológicas de las pacientes con cáncer de seno y el perfil molecular, no demostró asociación estadísticamente significativa entre las variables: edad de diagnóstico (0,212 y 0,120), seno afecto (0,350), presencia o ausencia de nódulos linfáticos (0,625), presencia o ausencia de márgenes quirúrgicos (0,983) y los genotipos C/T (0,416) y T/T (0,256). Mientras que las variables que presentaron asociación significativa fueron: ER (0,000), RP (0,000) y HER2 (0,000). Por ende, se observa que las características inmunohistoquímicas tienen una alta asociación con relación a la clasificación molecular del cáncer de mama (Tabla 1). Además dentro de esta tabla se encontró varios porcentajes con respecto al perfil molecular de las pacientes. El 48,3 % de las mujeres presentaban un perfil Luminal A, el 22,8% un Luminal B, el 12,3 % un perfil HER y un 16,6% un perfil triple negativo, porcentajes muy parecidos a la de la población caucásica en Estados Unidos (Anderson et al., 2014). La mayoría de los carcinomas mamarios resultan ser positivos para receptores de estrógenos (RE), lo cual se caracteriza por presentar una firma genética que se encuentra manipulada por

docenas de genes que son los encargados de controlar a los estrógenos. Los carcinomas RE + y RE – muestran diferencias notables con respecto a las características de las pacientes así como la patología, su respuesta al tratamiento y evolución. Hace 3 décadas, la mayoría de los estudios incluían todos los tipos de cáncer de mama, pero hoy en día se reconoce que existe una amplia gama en el diagnóstico de esta enfermedad, incluyendo los subtipos de la clasificación molecular (Kumar et al., pp.1074-1075, 2010)

Refiriéndonos a la clasificación histopatológica, se demostró que los tipos de cáncer mamario con mayor frecuencia en el Ecuador son: ductal infiltrante (71,05%), ductal in situ (13,15%), lobulillar infiltrante (8,77%), mucinoso (3,50%), papilar invasor (1,75%), lobulillar in situ (0,87%) y medular (0,87%), lo cual se corroboró en literatura internacional (Kumar et al., pp.1079-1089, 2010). Además, es importante resaltar que los genotipos presentes con mayor frecuencia dentro de esta investigación son: el carcinoma ductal infiltrante con C/T (53,50%), el carcinoma ductal in situ con C/T (7,89%) y lobulillar infiltrante con C/T (5,26%) (Tabla 2).

La asociación de los genotipos con características histopatológicas e inmunohistoquímicas (tabla 5), no presentaron una significancia estadística. Tanto el estadio tumoral como el receptor del factor de crecimiento epidermal arrojaron valores no significativos de 1,0. Igualmente los márgenes quirúrgicos, así como los nódulos linfáticos y las demás características patológicas no presentaron una íntima relación con los diferentes genotipos que fueron estudiados referente al gen MTHFR, estos resultados concuerdan con investigaciones por parte de Langsenlehner y Batschauer. Lo que sí podemos claramente observar es que la mayoría de los porcentajes de las diferentes variables como seno afectado, estadio tumoral, nódulos linfáticos y receptores hormonales, están relacionadas con el genotipo C/T + T/T. A pesar de presentar los alelos mutados y tener un gran porcentaje de mujeres en dichas variables, su asociación no tiene nada que ver con la población ecuatoriana y esta enfermedad, debido a que no presenta significancia estadística para esta

muestra. Por el contrario, en la población marroquí se encontró que el receptor de progesterona si presenta asociación significativa entre el polimorfismo C677T y este perfil inmunohistoquímico, arrojando valores de 10,28 para la prueba de Chi-cuadrado y un valor de P de 0,04 (Diakite et al., 2012).

Con relación a los estadios tumorales, el proceso de estadificación de las mujeres afectas estudiadas presentaron un estadio relativamente temprano. El 72,8% de individuos con cáncer de mama presentó tumores en estadio 1 y 2 (T1, pN0, M0; T2, pN2, M0), lo cual indica que el tumor primario corresponde a un tumor entre 2 y 5 cm en su mayor dimensión (T1-T2), existe metástasis en 4 a 9 ganglios linfáticos (pN2), no existe metástasis conocidas (M0); el 15,8% presentó estadios entre 3 y 4 (T3, pN3, M1) indicando que el tumor presenta un tamaño mayor a los 5 cm (T3), existe metástasis en 10 o más ganglios axilares (pN3) y presenta una metástasis a distancia (M1); y el 11,4% de mujeres presento un estadio 0 (Tis, pN0, M0), indicando que el tumor primario es un carcinoma in situ (Tis), no existe metástasis hacia los diferentes ganglios linfáticos (N0) y no existe metástasis distante en las pacientes (M0) (ver anexo 4 y tabla 1). Mientras más temprano sea detectado el tumor maligno, existirá mayor probabilidad de supervivencia, debido a que las células cancerígenas se mantienen en una zona limitada dentro de la glándula mamaria y no se ha podido diseminar hacia el sistema linfático o hacia otros órganos, pero si se llegan a detectar tumores en estadios avanzados (3-4) existirá una mala prognosis y pocas probabilidades de supervivencia (Houssami et al., 2009; Coleman y Rubens, 1987). Varios estudios a nivel mundial resaltan que si el diagnóstico es tardío, la enfermedad de las mujeres será más compleja con lo que respecta a su tratamiento y con menos prognosis, por eso es esencial realizar chequeos médicos frecuentes como una mamografía, o ensayos moleculares específicos como CEA (Antígeno carcinoembrionario), MUC1 (Mucina 1), AKAP4 (proteína de anclaje) entre otros (Taplin et al., 2008; Harris et al., 2007; Saini et al., 2013).

Con la ayuda de la PCR en tiempo real se puede llegar a detectar y medir pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, en donde se la utilizada para

diferentes finalidades como diagnóstico molecular, agricultura e investigación (Bustin, 2000; Kubista et al., 2006). Para este estudio, la utilización del equipo estuvo enfocada a determinar la sub o sobre-expresión del gen MTHFR utilizando el ADNc de cada una de las 26 personas. El papel que juega la expresión génica es crucial, ya que de esto dependerá el tratamiento que debe seguir la paciente, este tipo de tratamientos por lo general se lo encuentra en países de primer mundo, en donde la terapia génica y los micro-ARN's de interferencia juegan un papel importante al momento de suprimir una expresión no deseada o desarrollar una expresión deseada. Todo esto llega a ser la causa principal de diferentes cánceres; en especial el cáncer de mama con la ruta metabólica de los folatos, en donde el gen MTHFR se encuentra inmerso (Stankova et al., 2008).

Dentro del análisis de expresión génica, se encontró asociación significativa por parte del genotipo de las personas analizadas con el perfil molecular triple negativo y su expresión génica. En la tabla 6, dentro del grupo triple negativo se puede observar que existe un patrón regular por parte de las personas que poseen un genotipo normal (C/C), y con relación a su expresión génica se puede observar que estas personas presentan una sobre-expresión por parte del gen MTHFR. Con respecto a las personas que poseen el alelo mutado, en este caso son las personas heterocigotas (C/T) y homocigotas mutantes (T/T), se observa claramente que existe un patrón de sub-expresión por parte del gen en investigación. Todo este grupo triple negativo resulto ser significativo, obteniendo un valor de P de 0,034 (Tabla 6). El grupo Luminal A en cambio presenta un patrón desigual al momento de hablar sobre la expresión génica, ya que se observa varias sub-expresiones tanto en personas con genotipo normal, así como personas que poseen genotipos con la mutación presente. Este grupo presentó un valor de P no significativo (0,827), debido a que su patrón no guarda relación con la clasificación molecular, genotipo y expresión génica.

Comparando los resultados obtenidos en la parte de expresión génica en esta investigación y otras investigaciones a nivel mundial, concordamos que las

personas que poseen el alelo mutado van a presentar una sub-expresión, lo cual tiene sentido si se pone a analizar con detalle la ruta metabólica de los folatos (Liew y Gupta, 2014). Personas que presenten el alelo mutado no van a ser capaces de metabolizar en su totalidad el precursor 5-10 metilentetrahidrofolato, por ende no podrán obtener la cantidad necesaria del grupo metilo para que este pueda cumplir sus funciones de protección y síntesis de ácidos nucleicos, existiendo una sub-expresión por parte del gen MTHFR (Stankova et al., 2008).

La prueba OR expresa el riesgo que representa una población para el desarrollo de una enfermedad específica, bajo la presencia de mutaciones o cambios en el material genético (Aeo et al., 2010). En este estudio se observó que la presencia del polimorfismo MTHFR C677T se encuentra relacionado con el riesgo a desarrollar cáncer de mama. La presencia del genotipo C/T y T/T determinan que existe 1,8 y 2,9 veces más riesgo de presentar cáncer mamario respectivamente. Para realizar la asociación entre el polimorfismo MTHFR C677T y el riesgo a desarrollar cáncer de mama se tomó como referencia el genotipo homocigoto normal C/C ya que este presenta un OR de 1,0, entendiéndose que ese debería ser el OR de una persona sin riesgo de padecer cáncer mamario (Tabla 4). Dentro de las diferentes poblaciones a nivel mundial se encontró que la asociación entre el genotipo C/T + T/T vs CC generó varios OR's muy parecidos a la población ecuatoriana. Investigaciones internacionales revelan que la población Australiana presenta un OR de 1,43 (1,02-2,00), la población Coreana un OR de 1,14 (0,72-1,80) y la población Turca un OR de 1,25 (0,85-1,85), valores muy cercanos al OR de la población ecuatoriana que fue de 1,9 (1,1-3,3) (Campbell et al., 2002; Lee et al., 2004; Deligezer et al., 2005). Mientras que poblaciones como el Reino Unido, Grecia, China y Alemana no presentaron un OR mayor a 1,0 (Sharp et al., 2002; Kalemi et al., 2005; Chou et al., 2006; Justenhoven et al., 2005). En otras palabras, estas poblaciones presentarían una posibilidad de no desarrollar cáncer de mama sin que un alelo del gen MTHFR se encuentre mutado.

A nivel de Latinoamérica existen solamente 5 investigaciones publicadas relacionadas con el gen MTHFR y su riesgo a padecer esta neoplasia. Todas estas investigaciones fueron llevadas a cabo en población Brasileña, por ende es el único país a nivel de Sur América a ser comparado con la población Ecuatoriana. En uno de los estudios llevados a cabo en Brasil, se encontró que el tipo de estudio caso-control no presenta ninguna asociación estadísticamente significativa comparando estos dos grupos en relación al polimorfismo C677T MTHFR, en esta investigación también se llegó a asociar los perfiles histológicos de los pacientes y encontraron que no existe una asociación entre estos dos patrones; al ver resultados no significativos, obtuvieron como conclusión que el polimorfismo C677T del gen MTHFR no es útil como un biomarcador dentro de la población brasileña (Batschauer et al., 2011; Langsenlehner et al., 2003). Lo mismo ocurrió con la investigación llevada a cargo de Ma et al., en donde se estudió el consumo de vitaminas B y su relación con el polimorfismo C677T, y se encontró que no existe una asociación con el riesgo de padecer cáncer de mama igualmente dentro de la población Brasileña. Lo que llama mucho la atención es la investigación de Carvalho et al., [b] en donde mujeres con genotipo heterocigoto (C/T) y su asociación con el polimorfismo C677T MTHFR, presentan un riesgo de 2,77 (IC= 95%: 1,19-6,52) veces más de padecer cáncer de mama comparados con los homocigotos normales (C/C). Todas las investigaciones mencionadas en la población Brasileña son contradictorias, ya que ciertas regiones de Brasil llegan a ser significativas con este polimorfismo, en comparación de otras regiones de este país. Para la población Ecuatoriana, no llega a ser similar a la brasileña, pese a encontrarse en el mismo continente, debido a los resultados encontrados y explicados anteriormente. Dentro de la investigación de Carvalho et al., [b] podemos observar que el genotipo que predomina y que mayor riesgo presenta a desarrollar cáncer de mama, es el genotipo heterocigoto (C/T) con un OR de 2,77, mientras que la población ecuatoriana presenta un OR de 1,8 para el mismo genotipo (Tabla 4). Por otro lado, también hace la falta de mucha más investigación dentro y fuera del Ecuador,

para poder asegurar que nuestro patrón genético no es igual a la del país Brasil.

Pocos estudios han investigado la influencia directa que tiene el polimorfismo C677T del gen MTHFR con relación a desarrollar cáncer de mama. La dieta que lleva una persona también dependerá de la región en la que se encuentre. En población asiática se sabe que existen diferentes hábitos con respecto al consumo de té verde, bebidas alcohólicas y el fumar, mientras que en África y varios países de Latinoamérica la desnutrición puede ser la causa principal de un desbalance en el metabolismo del folato.

Es importante afirmar que en este estudio retrospectivo existieron algunas limitaciones. La más importante fue la falta de información en la dieta con respecto al consumo de folatos y vitamina B, así como la medición total de niveles de plasma en la sangre. Es por eso que no se puede asociar el rol que cumple los folatos en relación a desarrollar cáncer de mama y el gen MTHFR. Por esta razón todos los resultados presentados en esta investigación deben ser interpretados con cuidado y no pueden ser generalizados para todas las poblaciones a nivel mundial. Se necesita un estudio con mayor número de muestras, datos clínicos, alimenticios y más variables a tomar en cuenta, para que las conclusiones en esta investigación puedan ser totalmente confirmadas.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

La identificación de genes que se encuentran involucrados en el desarrollo del cáncer es muy importante para que se pueda entender la biología de esta enfermedad. El poder entender el comportamiento del cáncer ayuda a que nuevas técnicas y dianas terapéuticas sean creadas, tanto para tratamientos como para prevenciones, es por eso que el uso de polimorfismos en investigaciones es de suma importancia, ya que estos prometen identificar genes específicos, para que puedan ser analizados y entendidos. El polimorfismo C677T del gen MTHFR es asociado con varios tipos de enfermedades. La interpretación de los resultados sugiere que la muestra del estudio se incremente, para poder implementar este potencial biomarcador en los diferentes hospitales del país. Adicionalmente, las diferentes variaciones de enfermedades, en especial la del cáncer de mama dependerá de las poblaciones y etnias, lo cual es un factor muy importante a tomar en cuenta al momento de realizar asociaciones con este polimorfismo. Dentro de esta investigación como conclusión se encontró que el genotipo Val/Val (T/T) del polimorfismo C677T del gen MTHFR si presenta relación con el riesgo de desarrollar cáncer de mama dentro de la población Ecuatoriana. Mujeres con este genotipo presentan 2,9 veces más riesgo que una persona homocigota normal (C/C), lo cual se puede observar claramente en la tabla 4. No obstante en esta investigación, se encontró una asociación significativa en la expresión génica del grupo triple negativo en relación al genotipo de las mujeres estudiadas.

6.2 RECOMENDACIONES

- Antes de empezar la parte experimental de la investigación se recomienda que el número de muestras ya se encuentre definido, además de contar con todos los reactivos necesarios como enzimas de

restricción, cebadores y los diferentes buffer y kits necesarios para la extracción; ya que muchas veces este tipo de reactivos se demoran alrededor de 3 meses en llegar al laboratorio ya que son importados de varios países.

- Se recomienda mantener las muestras de sangre a 4°C y en el caso de trasladar las muestras de un lugar a otro es preferible mantener una cadena de frío para evitar degradación celular y molecular por parte de las muestras.
- Para las biopsias mamarias embebidas en parafina es recomendable guardarlas en una caja hermética alejado de la luz y evitar la manipulación innecesaria.
- Con los bloques de parafina se recomienda descartar las tres primeras láminas de tejido, de esta forma se evitará contaminación en las muestras, ya que de forma directa o indirectamente existirá manipulación sobre el bloque de parafina.
- Con respecto a la extracción de ADN a partir de tejido tumoral embebido en parafina se recomienda dejar toda la noche a las muestras dentro del bloque térmico con el buffer de lisis y la Proteinasa K, para así asegurar una lisis completa del tejido mamario.
- De igual forma, para la extracción de ARNm se recomienda que el tejido mamario se encuentre completamente lisado ya que de esta manera se obtendrá grandes concentraciones de este ácido nucleico.
- Se recomienda que el mismo día de la extracción del ARNm se realice también la transformación a ADNc, de esta manera se evitará la degradación por parte del ARNm ya que esta molécula se encuentra muy inestable repercutiendo en la obtención de buenas concentraciones de ADNc para la realización de la expresión génica.
- Tanto las extracciones de ADN, ARNm así como el ADNc se las debe alicuotar en pequeñas cantidades, de esta forma se evitará la contaminación total de la muestra madre.
- Al momento de estandarizar el programa para la PCR se recomienda realizar un gradiente de temperaturas (anillamiento), ya que muchas

veces esto puede variar con respecto a lo que se encuentra en la bibliografía y con el termociclador que se esté utilizando para la investigación.

- Cuando se realice la electroforesis para ver el genotipo después de haber realizado la PCR-RFLP se recomienda que todas las muestras hayan migrado más de la mitad del gel, ya que como estamos tratando con fragmentos muy pequeños de pares de bases es necesario que estos se separen lo más que se pueda dentro del gel y de esta forma evitar errores en la lectura de los genotipos.
- En la secuenciación se recomienda respetar y cumplir los tiempos que pide el kit en el paso de la purificación de la PCR, de esta forma estaremos asegurando una buena reacción dentro del secuenciador.
- Antes de comenzar con la parte de expresión génica y el manejo del equipo de PCR en tiempo real es necesario buscar bibliografía relacionada con este tema, y de esa forma se podrá entender si en verdad es necesario o no analizar la expresión génica de los individuos en estudio.
- Para la PCR en tiempo real es necesario trabajar con concentraciones de ADNc conocidas ya que este equipo llega a ser muy sensible y puede llegar a ser un gran problema al momento de la estandarización.
- Se recomienda realizar 3 repeticiones por muestra en la parte de expresión génica, ya que de esta forma se obtendrá un valor de C_T más real.
- Con respecto a la ruta metabólica de los folatos se recomienda estudiarla a profundidad y relacionarlo con otros tipos de cáncer y a su vez tomar en cuenta factores importantes como los niveles de ingesta de la vitamina B.

7. FIGURAS

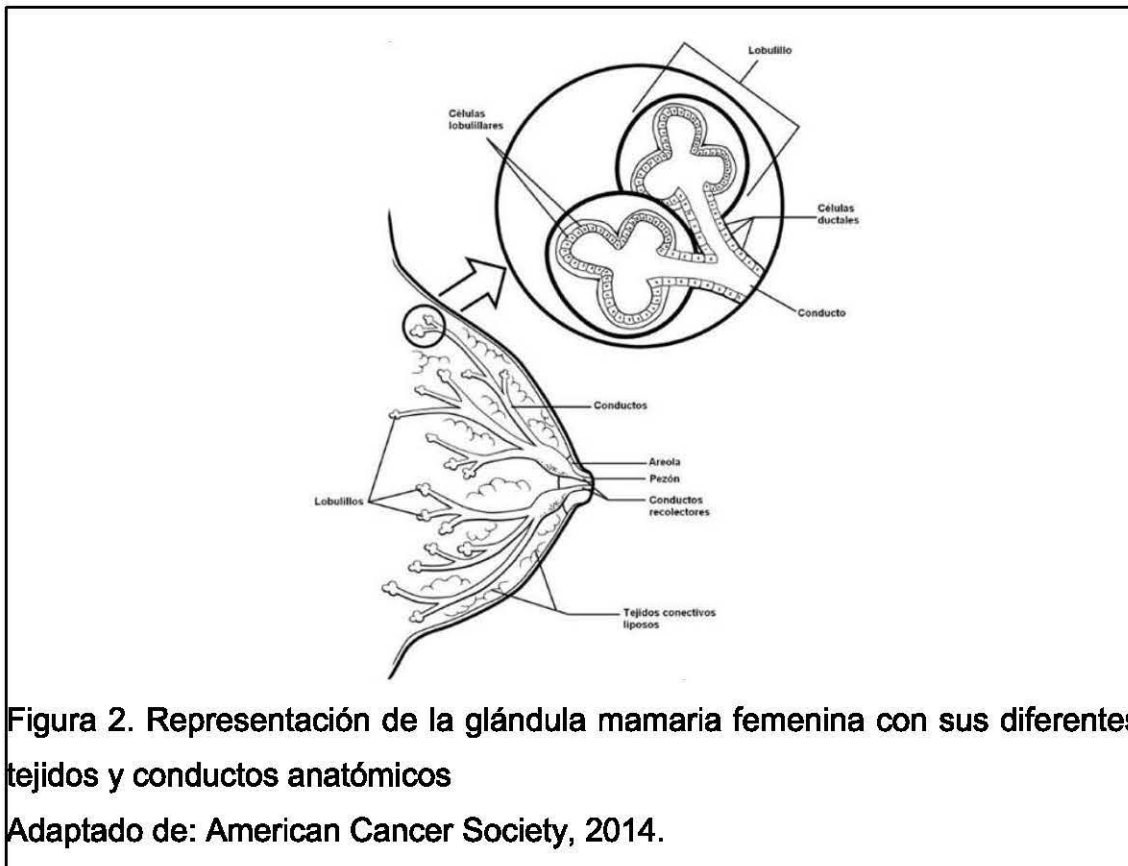


Figura 2. Representación de la glándula mamaria femenina con sus diferentes tejidos y conductos anatómicos

Adaptado de: American Cancer Society, 2014.

El tamaño del seno se encuentra determinado por la cantidad de grasa y tejido conectivo que presente la mujer. Estas glándulas mamarias se desarrollan en la edad de la pubertad y su función principal es producir leche como fuente de alimentación a los recién nacidos. La glándula mamaria está compuesta alrededor de 15 a 20 lóbulos por mama, los cuales se encuentran de forma radiada y dispersos por toda la glándula (Almeida & Barry, p.167, 2010). Cada lóbulo está compuesto por un conducto excretor de 2 a 4 mm de diámetro por donde pasará la leche desde los lóbulos hasta llegar al pezón. Con el comienzo de la gestación, la mama llega a ser completamente madura y funcional, los diferentes lobulillos aumentarán tanto en tamaño como en forma. Luego de terminar la etapa de lactancia las células epiteliales sufrirán apoptosis, disminuyendo así el tamaño del seno. Mutaciones en este tipo de células incrementa la probabilidad de desarrollar cáncer de mama (Kumar et al., p.1067, 2010).

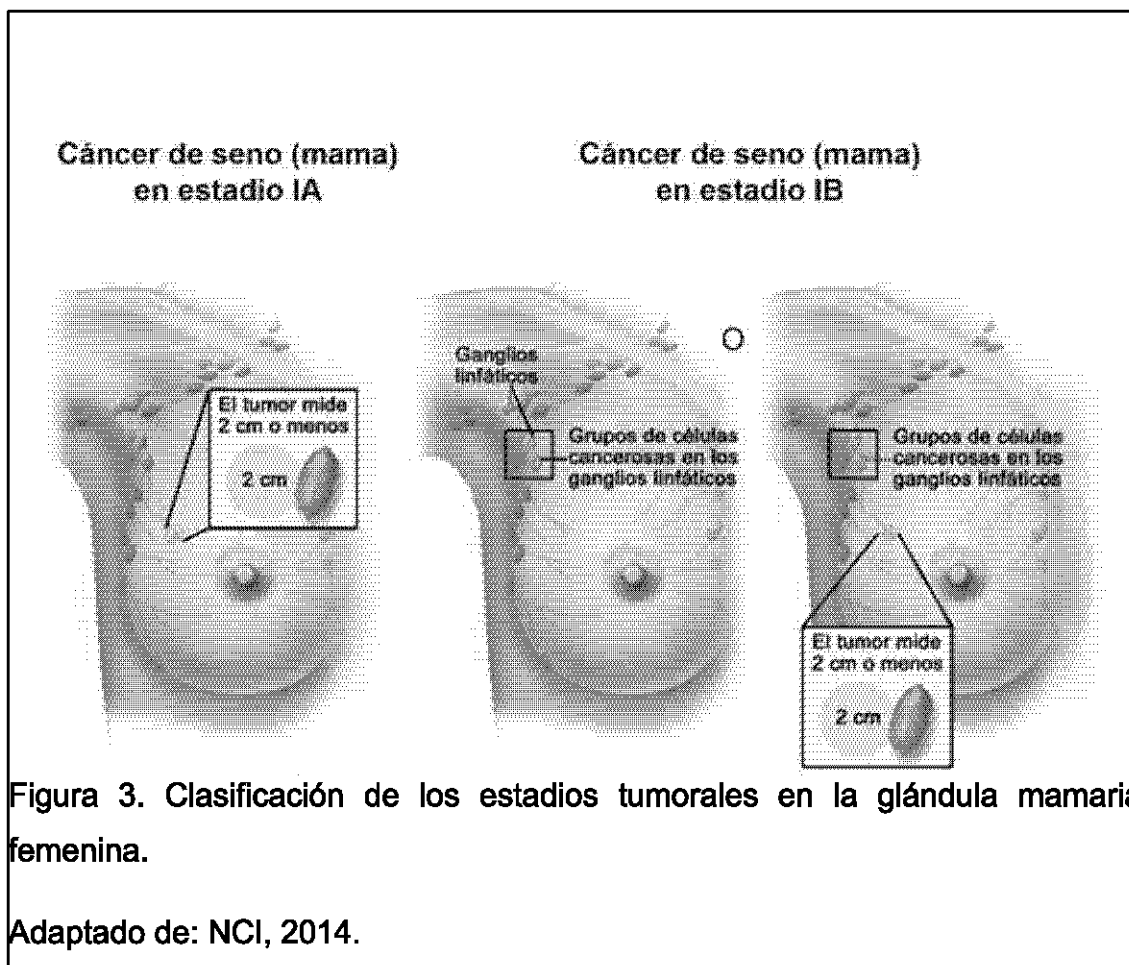
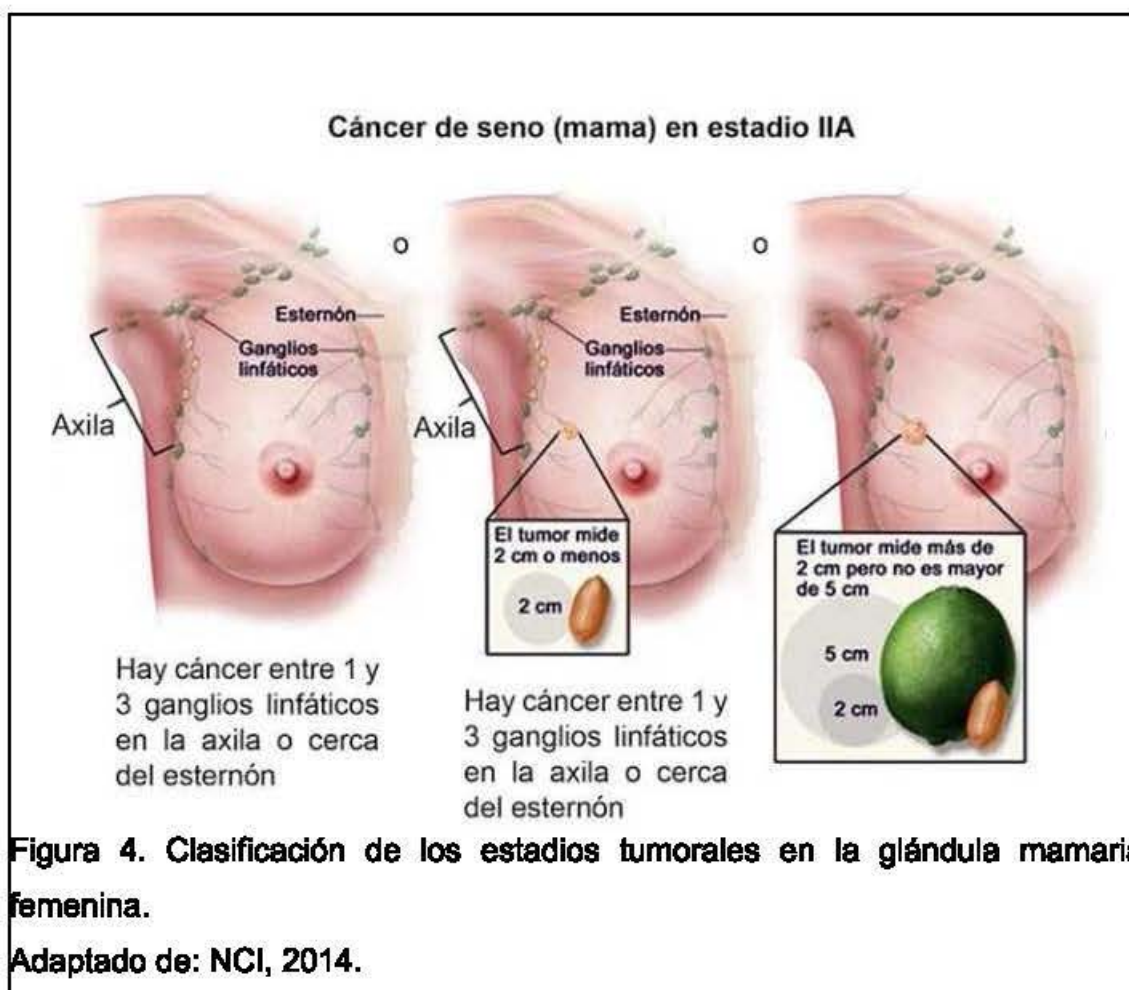


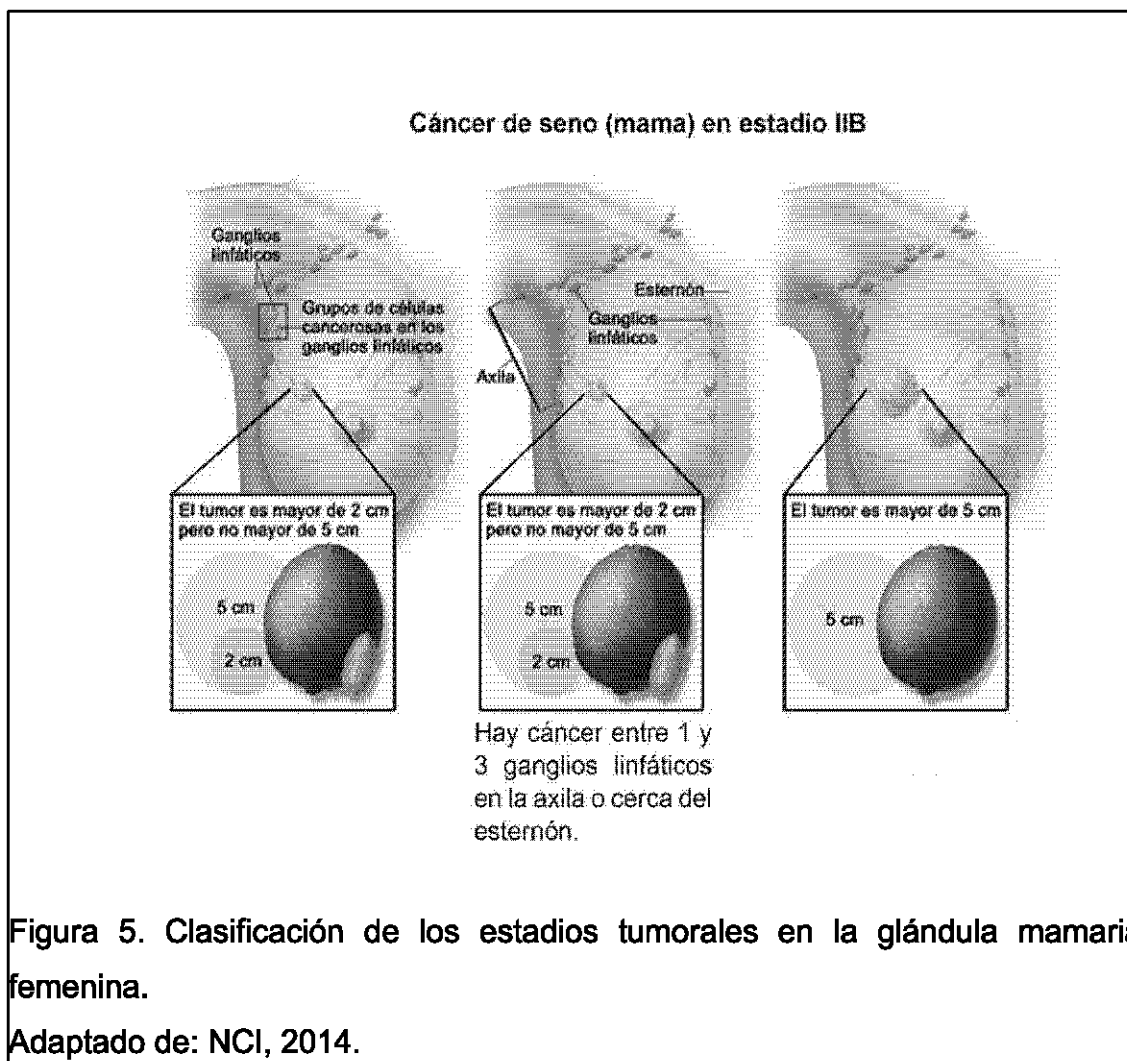
Figura 3. Clasificación de los estadios tumorales en la glándula mamaria femenina.

Adaptado de: NCI, 2014.

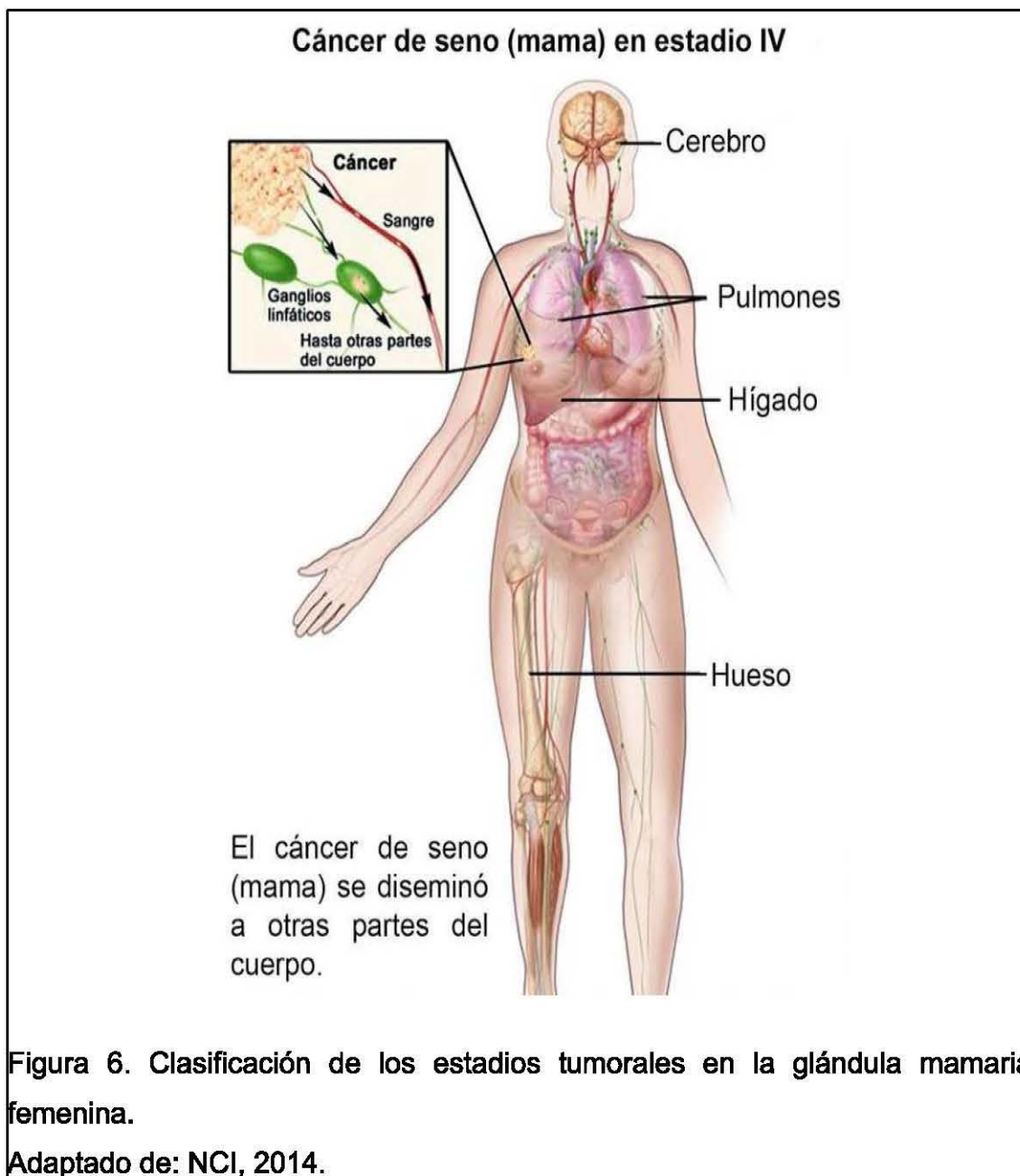
Personas que sean diagnosticadas en etapa I presentan altas probabilidades de curarse, ya que es la etapa más temprana del cáncer de mama que existe (Breast Cancer, 2012). En el estadio IA, el tumor mide 2 cm o menos y este no se ha expandido fuera del seno, su tamaño se lo compara como la de una semilla. En el estadio IB el pequeño tumor se encuentra dentro de los ganglios linfáticos de un tamaño mayor a 0,2 mm pero menor a 2 mm (NCI, 2014).



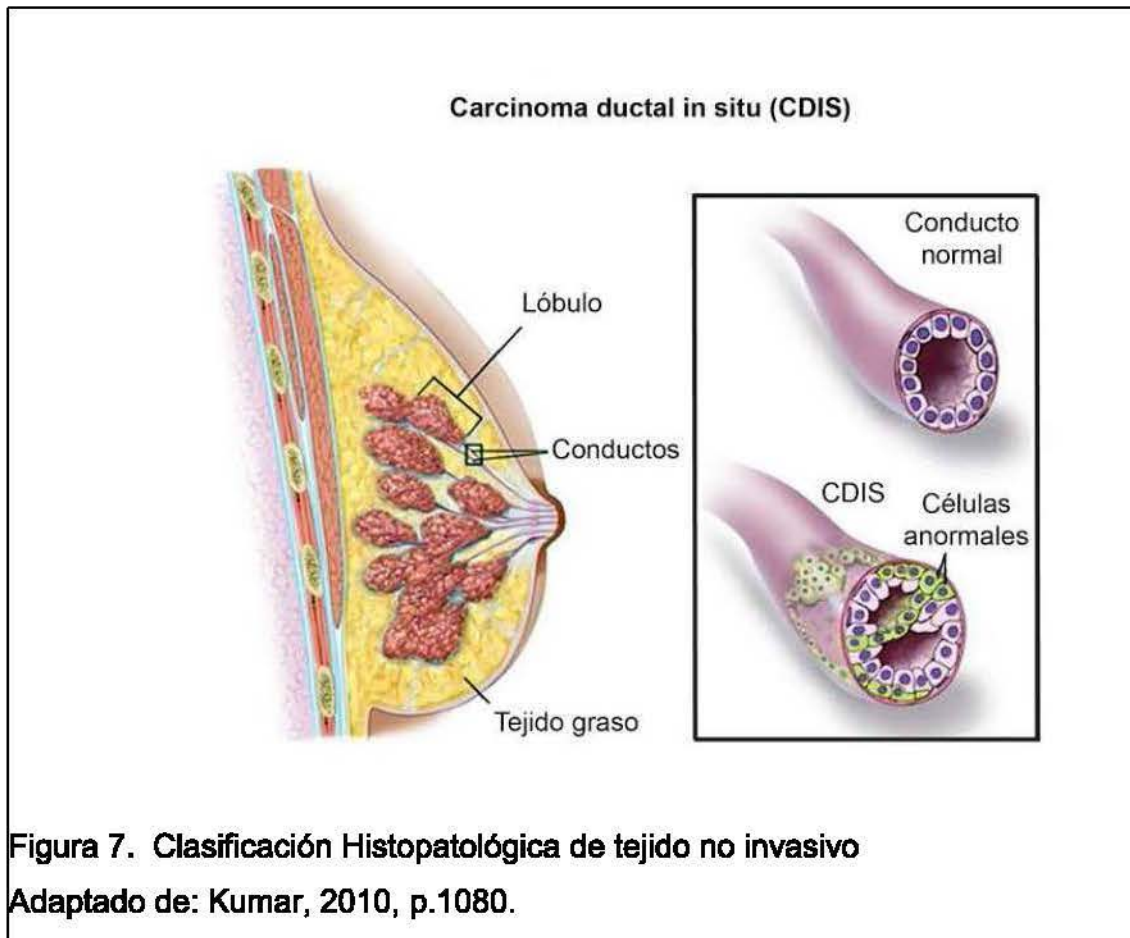
En el estadio IIA el tumor se encuentra fuera de la mama, el tumor puede estar ubicado en los ganglios linfáticos axilares o los ganglios linfáticos que se encuentran cerca del esternón. Hasta este punto el tamaño del cáncer mide más de 2 centímetros pero no mayor que 5 centímetros. El cáncer todavía no ha logrado expandirse a otros órganos del cuerpo humano (NCI, 2014).



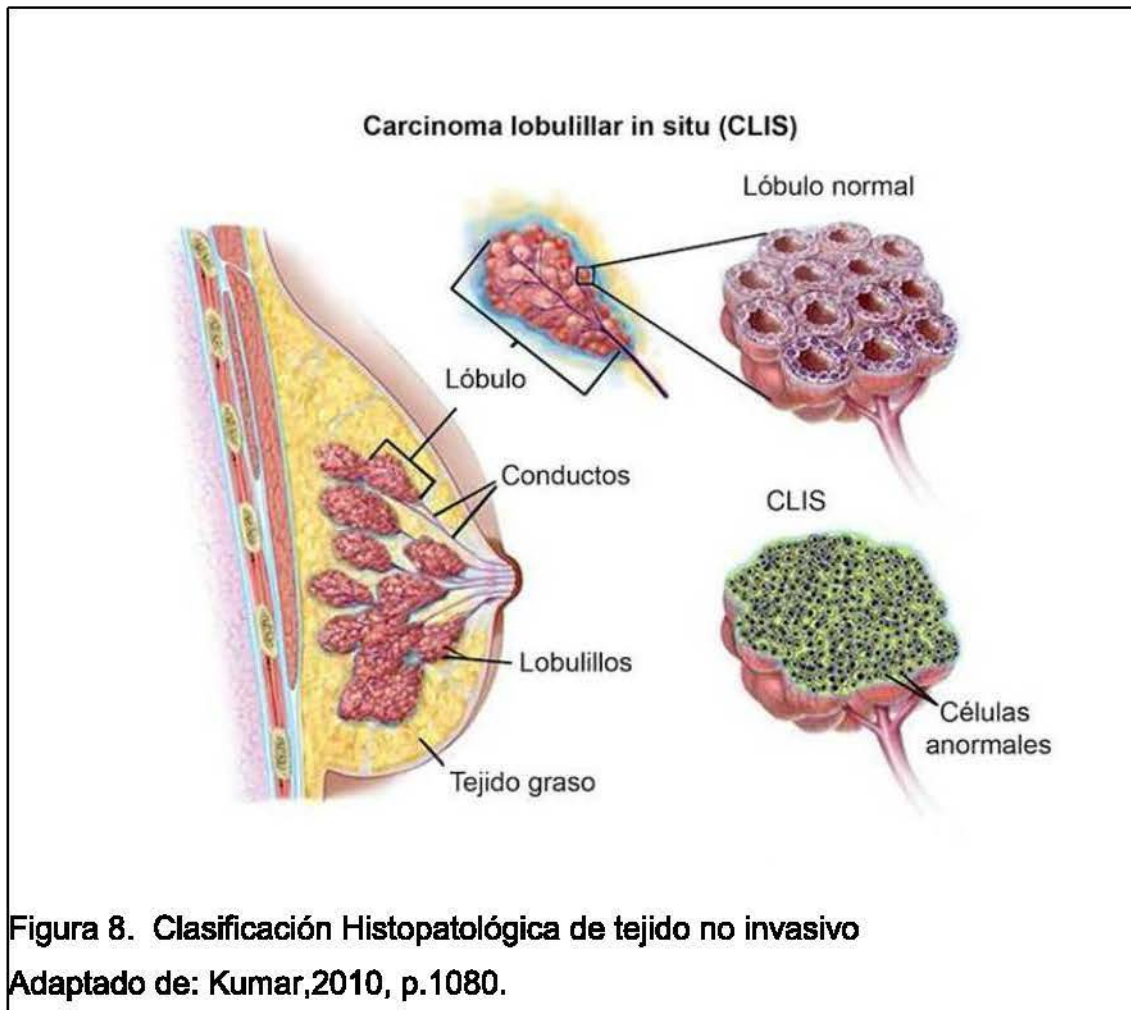
En el estadio IIB el tumor presenta pequeños racimos de células dentro de los ganglios linfáticos los cuales estarán de un tamaño de 0,2 mm pero no mayores de 2 mm. Aquí el cáncer se ha diseminado a uno de los tres ganglios presentes en la axila y/o esternón, es esencial para los oncólogos realizar el examen linfático centinela para dar el diagnóstico correcto (NCI, 2014).



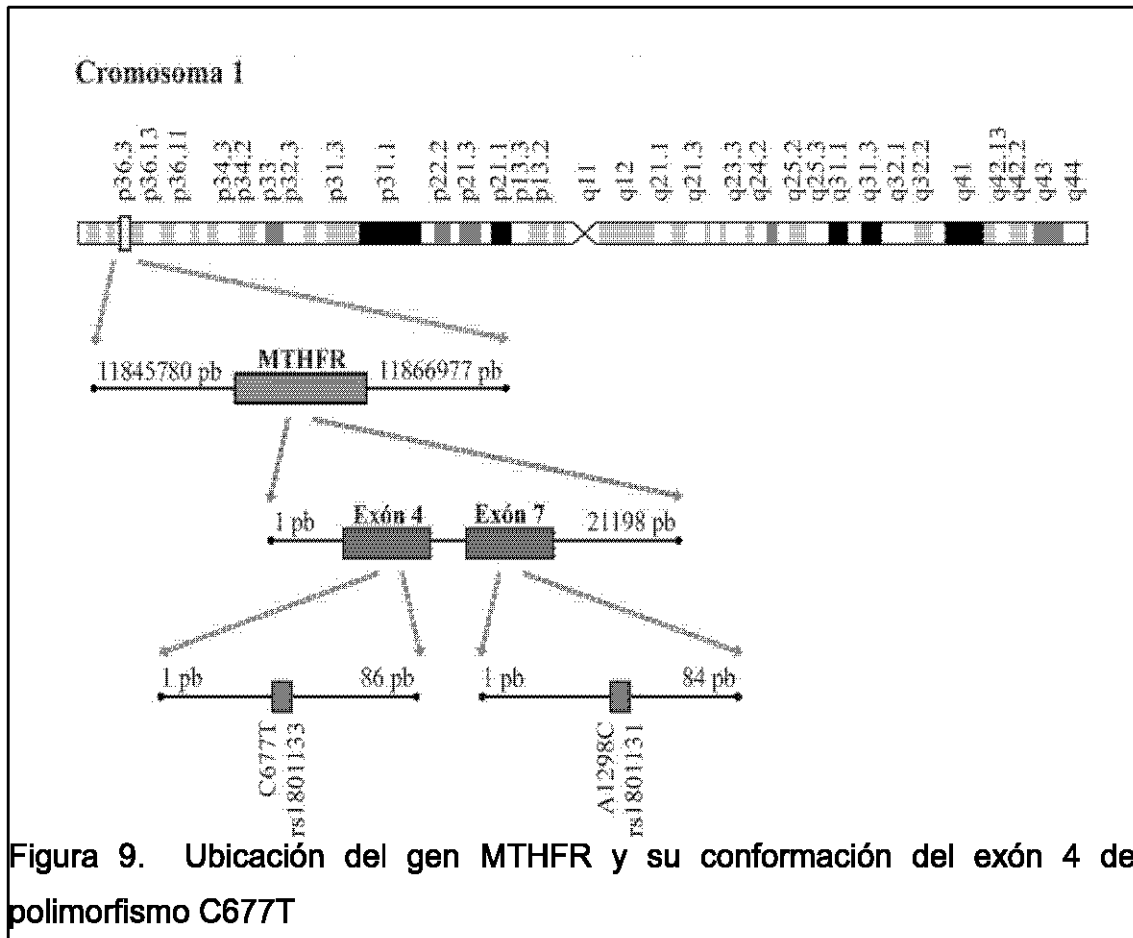
En la etapa IV el cáncer se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo humano, los órganos más frecuentes son los huesos (caderas), pulmones, estómago e hígado (NCI, 2014). Para esta etapa avanzada es muy difícil que el paciente se pueda recuperar ya que no existe ningún tratamiento que pueda eliminar el cáncer. Se estima hasta 6 meses más de vida para la paciente (Breast Cancer, 2012).



El término médico carcinoma se lo utiliza para describir una etapa temprana del cáncer de seno. El cáncer de mama in situ revela que las diferentes células cancerosas están presentes en los conductos mamarios, en esta etapa por lo general las células del tejido mamario no han logrado invadir otras zonas, como tejidos más profundos de la glándula mamaria así como a otros órganos del cuerpo (Secretaría de la Salud Pública, p. 49, 2002). El CDIS es mayormente detectado mediante la mamografía, debido a que este pequeño tumor es muy difícil de detectarlo por exploración personal de la mujer. Por ser un tipo de cáncer en etapa temprana existen altas probabilidades que la persona se pueda curar (Breast Cancer, 2012). Al CDIS se lo conoce también como carcinoma intraductal (American Cancer Society, 2014).



Al CLIS se lo conoce como un crecimiento celular anormal en una o varias áreas de los lobulillos de la mama. Las células lobulillares anormales crecen en los lobulillos, las cuales son las responsables de producir leche materna y se encuentran ubicadas en los extremos de los diferentes conductos mamarios. Se sabe que las personas que son diagnosticadas con CLIS poseen más de un lobulillo afectado (Breast Cancer, 2012).



El gen MTHFR se encuentra presente en el cromosoma 1 humano (1p36.3) (Martin et al., 2006), presenta una masa molecular relativa de 74597 Da y se encuentra conformado por 11 exones que ocupan un segmento de 21.198 pares de bases y en el exón 4 se encuentra el polimorfismo C677T de la investigación.

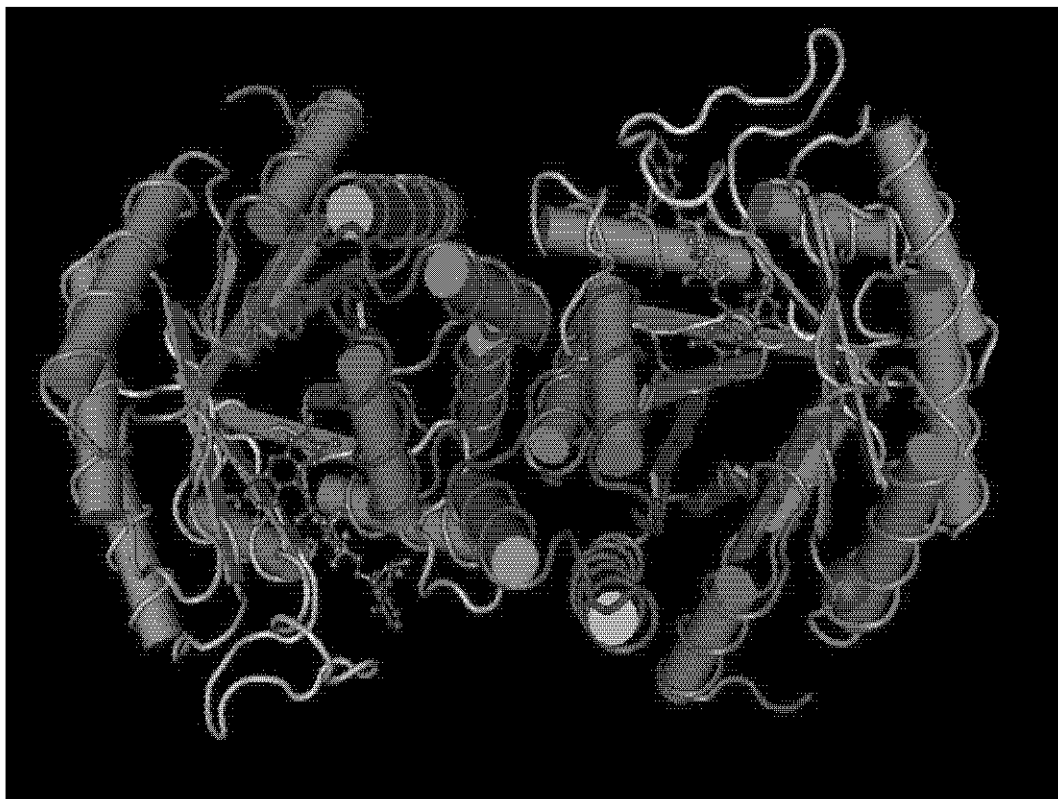
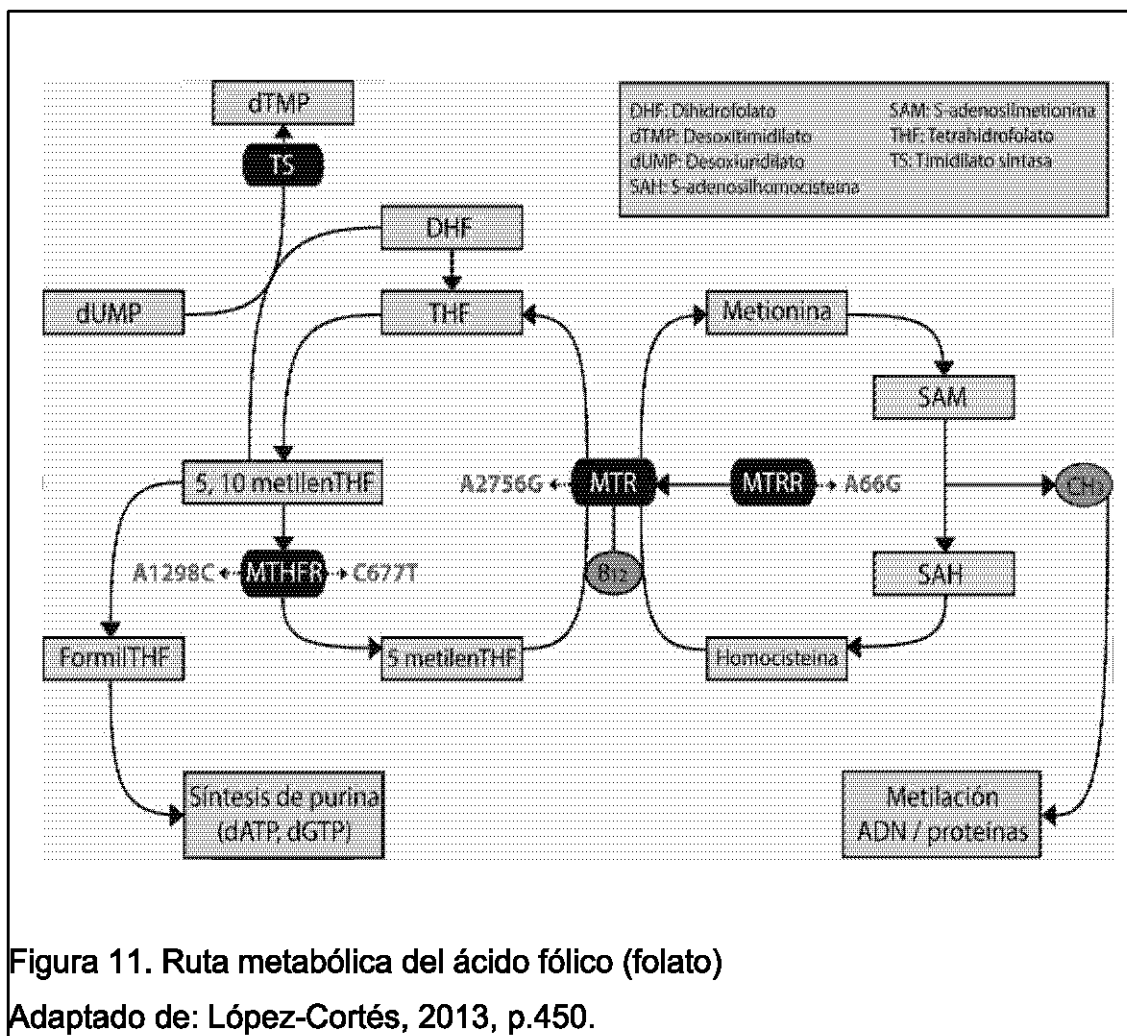


Figura 10. Estructura de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)
Tomado de: NCBI, s.f.

En esta figura se puede observar la estructura de la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa que se encuentra codificado por el gen MTHFR, la cual se encuentra conformada por 656 aminoácidos (Martin et al., 2006).



La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), metionina sintasa (MTR), metionina sintasa reductasa (MTRR) y timidilato sintasa (TS) (Bai et al., 2009) son enzimas que actúan en la ruta metabólica del folato, la cual es esencial para la metilación y síntesis de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Muslumanoglu et al., 2009). Presencia de polimorfismos en estas enzimas pueden alterar los niveles de homocisteína y reducción de la actividad enzimática, la cual genera deficiencia en la asimilación de los folatos (vitamina B) con daños del ADN (Cicek et al., 2004). Es importante estudiar estos polimorfismos en especial el gen MTHFR, por ser el principal transformador de la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato a 5 metilentetrahidrofolato, la cual será utilizada como el grupo metil principal de toda la ruta metabólica (Singal et al., 2004; Michael et al., 2008).

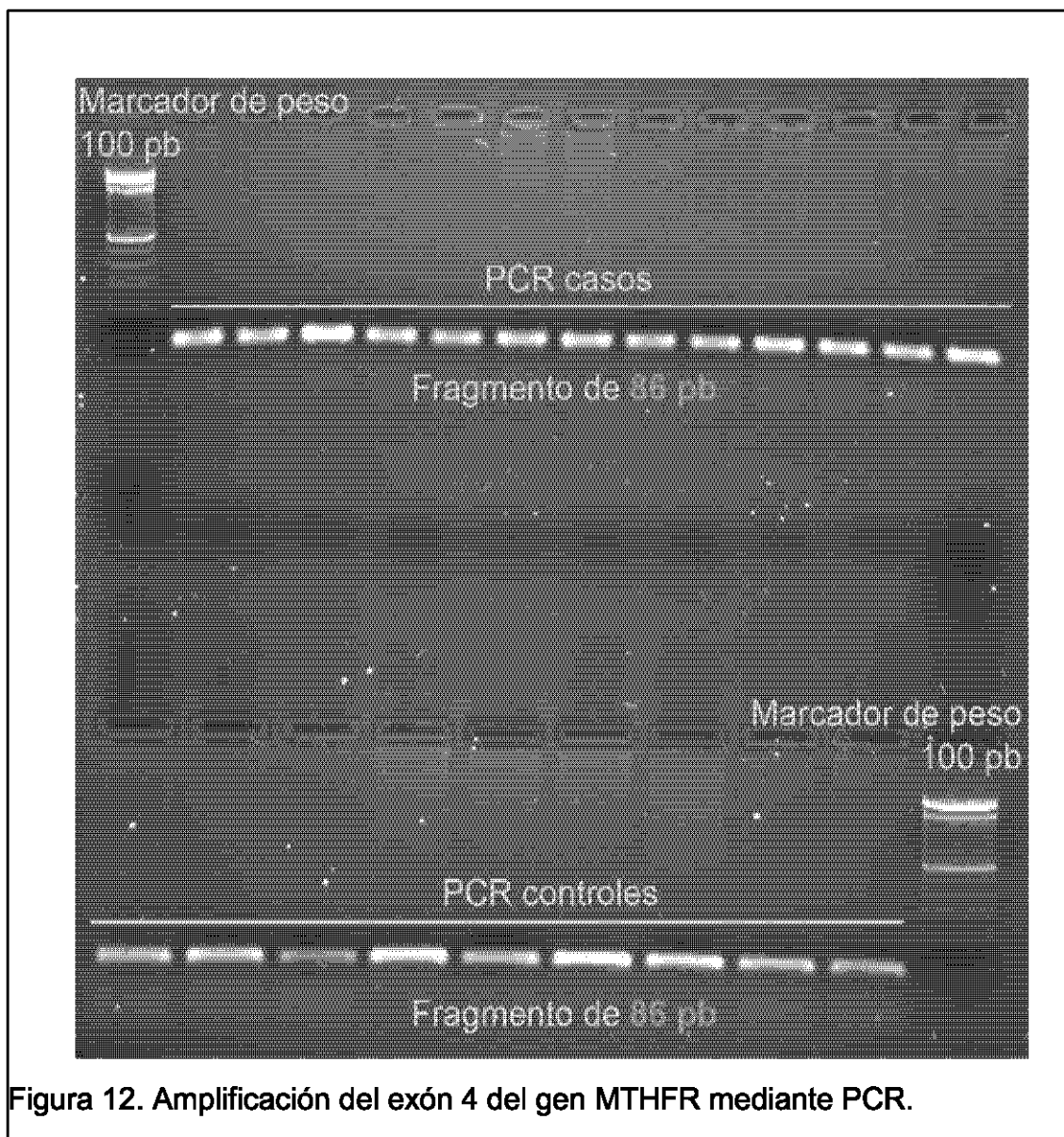
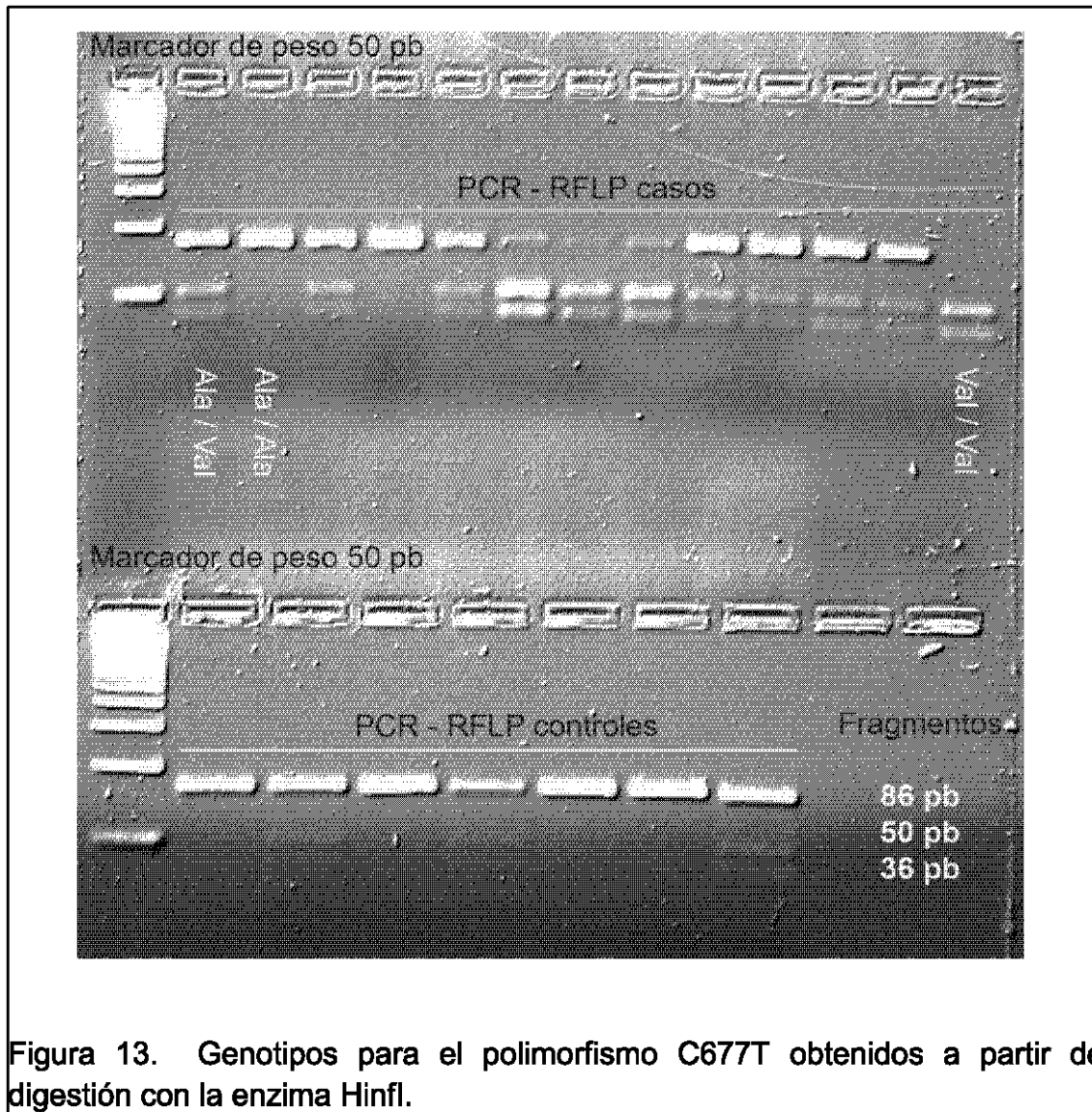


Figura 12. Amplificación del exón 4 del gen MTHFR mediante PCR.

Gel de agarosa al 2% teñido previamente con bromuro de etidio. En el primer y último carril se observa los marcadores moleculares con un peso de 100 pares de bases, los carriles del 2 al 14 de izquierda a derecha se observan fragmentos amplificados de ADN de 86 pb de individuos afectados con cáncer de mama, mientras que los carriles del 15 al 23 se observan fragmentos amplificados de 86 pb del exón 4 del gen MTHFR de individuos controles.



En el primer carril (izq) tanto de la sección de arriba como la de abajo se observa el marcador molecular de 50 pares de bases. En la parte de los casos podemos observar que los carriles 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 son individuos heterocigotos (Ala/Val), en el carril 3 se observa un individuo homocigoto normal (Ala/Ala) y en el carril 14 un homocigoto mutante (Val/Val). En la parte de los controles podemos observar que los carriles 2, 4, 6 y 7 son individuos homocigotos normales (Ala/Ala), y los carriles 3, 5 y 8 son heterocigotos (Ala/Val).

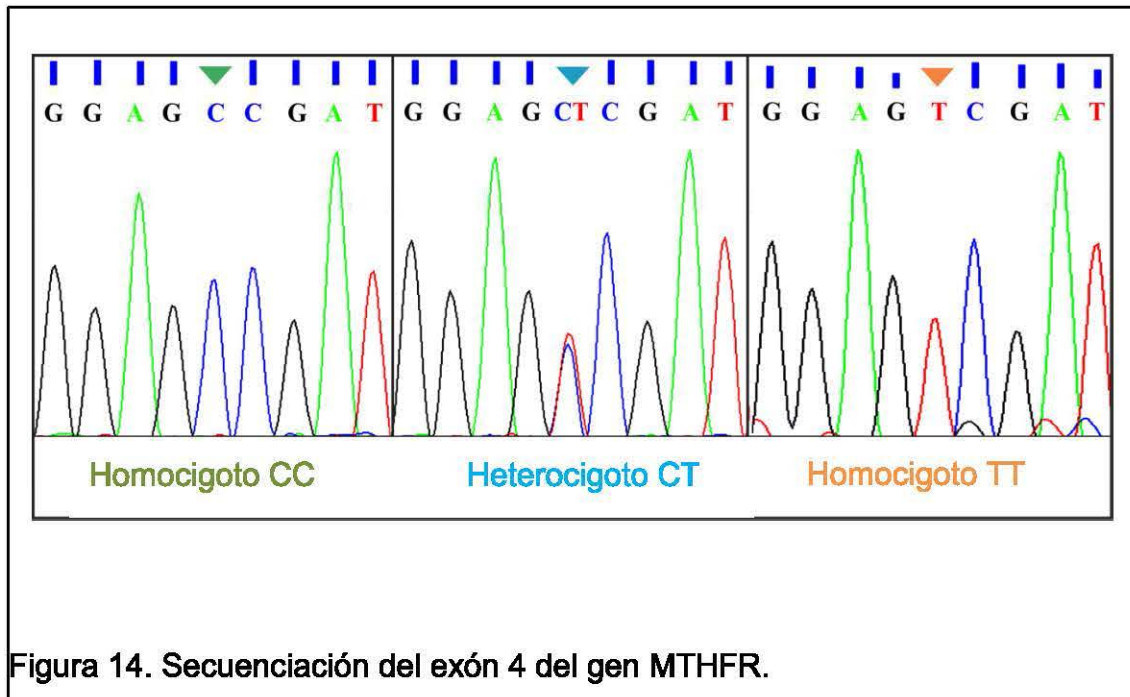


Figura 14. Secuenciación del exón 4 del gen MTHFR.

La secuenciación se llevó a cabo luego de realizar todos los casos y controles mediante PCR-RFLP. En la ilustración se observa tres secuencias diferentes, las cuales son fáciles de reconocer el genotipo de cada una de ellas. En el primer cuadrante podemos observar que se trata de un individuo homocigoto normal (C/C), la cual se encuentra representada por una curva perfecta de color azul. El segundo cuadrante presenta dos curvas sobrepuestas de color azul y rojo y dándonos una lectura de CT, sobreentendiendo que se trata de una mujer heterocigota (C/T). En el último cuadrante se encuentra un individuo homocigoto mutante (T/T), el cual se encuentra representado por una curva perfecta de color rojo.

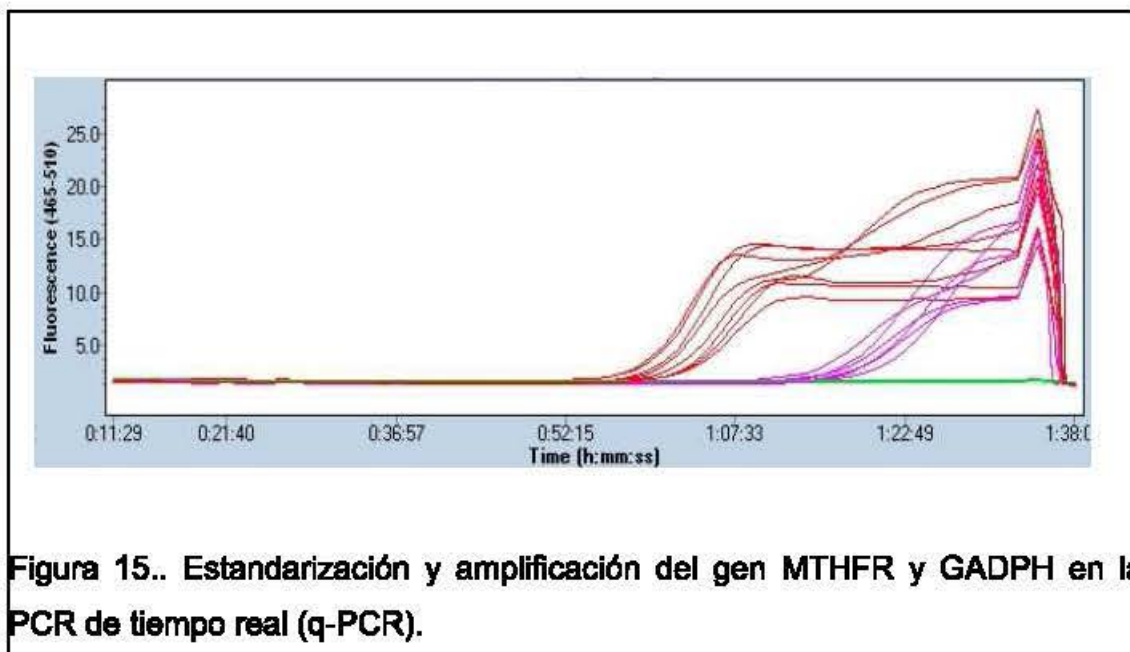


Figura 15.. Estandarización y amplificación del gen MTHFR y GAPDH en la PCR de tiempo real (q-PCR).

Para la estandarización y amplificación del ADNc de las diferentes muestras en los dos genes (MTHFR y GAPDH) se utilizó una concentración de ADNc de 21 ng/ μ l tanto de casos como de controles. En el eje Y del gráfico se puede observar las diferentes escalas de fluorescencia, siendo la más baja 0 y la más alta 25,0; en el eje X del gráfico se observa el tiempo parcial y total que el equipo ha empleado para la amplificación del gen MTHFR y GAPDH. Todas las curvas que están representadas de color rojo representan al gen GAPDH, las cuales siguen un patrón similar a todas las muestras que presentan los cebadores de dicho gen, llegando a su nivel exponencial alrededor de 1 hora con 7 minutos y con una fluorescencia aproximadamente de 15,0 captada por el equipo LightCycler 480 II de Roche. Las curvas de color lila representan al gen MTHFR, las cuales siguen un patrón similar a todas las muestras que presentan cebadores de dicho gen, llegando a su nivel exponencial dentro de 1 hora con 35 minutos y con fluorescencia de 18,0 captada por el equipo.

8. TABLAS

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de seno.

	Luminal A		Luminal B		HER		Triple Negativo		Total		Chi cuadrado	Valor P
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Edad diagnóstico												
<35	0	0	1	3,85	1	7,143	2	10,53	4	3,5	Referencia	
35-49	21	38,2	11	42,3	8	57,143	7	36,84	47	41,2	4,5	0,212
≥50	34	61,8	14	53,85	5	35,714	10	52,63	63	55,3	5,8	0,120
Seno afecto												
Derecho	30	54,5	19	73,1	7	50	10	52,6	66	57,9	3,3	0,350
Izquierdo	25	45,5	7	26,9	7	50	9	47,4	48	42,1		
Estadio tumoral												
T1-2	44	80	14	53,8	10	71,43	15	78,9	83	72,8	Referencia	
T3-4	6	10,9	8	30,8	3	21,43	1	5,3	18	15,8	8,0	0,045
T0, X	5	9,1	4	15,4	1	7,14	3	15,8	13	11,4	2,0	0,581
Nódulo linfático												
+	27	49,1	12	46,2	9	64,3	8	42,1	56	49,1	1,8	0,625
-	28	50,9	14	53,8	5	35,7	11	57,9	58	50,9		
Estado RE												
+	48	87,3	24	92,3	0	0	0	0	72	63,2	80	0,000
-	7	12,7	2	7,7	14	100	19	100	42	36,8		
Estado RP												
+	55	100	11	42,3	1	7,1	0	0	67	58,8	84	0,000
-	0	0	15	57,7	13	92,9	19	100	47	41,2		
Estado HER2												
+	4	7,3	15	57,7	14	100	0	0	33	28,9	65	0,000
-	51	92,7	11	42,3	0	0	19	100	81	71,1		
Márgenes quirúrgicos												
+	38	69,1	18	69,2	10	71,4	14	73,7	80	70,2	0,2	0,983
-	17	30,9	8	30,8	4	28,6	5	26,3	34	29,8		
MTHFR C677T												
C/C	11	20	8	30,8	1	7,14	5	26,3	25	21,9	Referencia	
C/T	37	67,3	15	57,7	10	71,43	13	68,4	75	65,8	2,8	0,416
T/T	7	12,7	3	11,5	3	21,43	1	5,3	14	12,3	4,0	0,256

Tomado de: Receptor de estrógeno. RP: Receptor de progesterona. HER: Receptor del factor de crecimiento epidermal.

Tabla 2. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.

MTHFR C677T	Ductal in situ	Ductal infiltrante	Lobulillar in situ	Lobulillar infiltrante	Papilar invasor	Mucinoso	Medular	Total
CC	6	10	0	3	1	2	0	22
CT	9	61	0	6	0	1	1	78
TT	0	10	1	1	1	1	0	14
Total	15	81	1	10	2	4	1	114

Tabla 3. Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C677T.

Gen	Genotipos	Frecuencias Genotípicas			Frecuencias Alélicas			Valor P HWE
		Casos	Controles	Todo	Casos	Controles	Todo	
MTHFR C677T rs1801133	C/C	0,22	0,35	0,30	0,55	0,64	0,605	0,78
	C/T	0,66	0,58	0,61				
	T/T	0,12	0,07	0,09	0,45	0,36	0,395	

Tomado de: HWE: Ecuación de Hardy Weinberg

Tabla 4. Asociación entre el polimorfismo MTHFR C677T y el riesgo de cáncer de mama entre casos y controles.

Gen	Genotipo	Casos (n=114) n (%)	Controles (n=195) n (%)	OR	95%IC	Valor P
MTHFR C677T rs1801133	C/C	25 (21,93)	69 (35,38)	1,0		
	C/T	75 (65,79)	113 (57,95)	1,8	1,1-3,2	0,039
	T/T	14 (12,28)	13 (6,67)	2,9	1,2-7,2	0,025
	C/T + T/T	89 (78,07)	126 (64,62)	1,9	1,1-3,3	0,019

Tabla 5. Asociación de genotipos con características histopatológicas e inmunohistoquímicas.

Variable	MTHFR C677T rs1801133	
	C/C	C/T + T/T
Seno afectado		
Derecho	15 (13%)	51 (45%)
Izquierdo	10 (9%)	38 (33%)
OR (95% IC)	1,1 (0,2-2,8)	
Valor de P	0,990	
Estadio Tumoral^a		
T1-T2	17 (15%)	66(58%)
T3-T4	4 (4%)	14 (12%)
OR (95% IC)	0,9 (0,3-3,1)	
Valor de P	1	
Nódulos Linfáticos		
+	14 (12%)	42(37%)
-	11 (10%)	47(41%)
OR (95% IC)	0,7 (0,3-1,7)	
Valor P	0,581	
Estado RE		
+	19 (17%)	53 (46%)
-	6 (5%)	36 (32%)
OR (95% IC)	2,2 (0,8-5,9)	
Valor P	0,203	
Estado RP		
+	16 (14%)	51(45%)
-	9 (8%)	38 (33%)
OR (95% IC)	1,3 (0,5-3,3)	
Valor P	0,711	
Estado HER2		
+	7 (6%)	26 (23%)
-	18 (16%)	63 (55%)
OR (95% IC)	0,9 (0,4-2,5)	
Valor P	1	
Márgenes quirúrgicos		
+	17 (15%)	63 (55%)
-	8 (7%)	26 (23%)
OR (95% IC)	1,1 (0,4-2,9)	
Valor P	0,983	

^a Análisis de 101 individuos. RE: Receptor de estrógeno. RP: Receptor de progesterona. HER: Factor de crecimiento epidermal.

Tabla 6. Asociación de los genotipos y receptores hormonales con sus respectivos valores de C_T .

Subtipos de cáncer de mama	Genotipos	Promedio MTHFR C_T	Promedio GAPDH C_T	ΔC_T (Promedio MTHFR C_T - Promedio GAPDH C_T)	$\Delta \Delta C_T$ (Promedio ΔC_T - Promedio tejido mamario control ΔC_T)	MTHFR normalizado cantidad relativa $2^{-\Delta \Delta C_T}$	U - Mann Whitney Valor <i>P</i>
Triple negativo	C/C	41,42	41,57	- 0,15	0,00	1,00 ^a	0,034
		43,02	44,49	- 1,47	- 1,32	2,49 ^b	
		42,38	42,20	0,18	0,00	1,00	
		42,06	43,87	- 1,81	- 1,99	3,97	
		43,65	46,77	- 3,12	0,00	1,00	
		53,86	46,58	7,28	10,4	7,40	
		42,52	46,38	- 3,86	0,00	1,00	
		42,63	47,50	- 4,87	- 1,01	2,01	
	C/T + T/T	42,60	47,13	- 4,53	0,00	1,00	
		41,68	45,07	- 3,39	1,14	- 2,22 ^c	
		41,75	49,21	- 7,46	0,00	1,00	
		41,29	47,14	- 5,85	0,33	- 3,03	
		42,12	47,10	- 4,98	0,00	1,00	
		42,55	45,55	- 3,00	1,98	- 4,00	
Luminal A	C/C	41,64	42,56	- 0,92	0,00	1,00	0,827
		40,67	42,39	- 1,72	0,80	- 1,75	
		45,67	46,39	- 0,72	0,00	1,00	
		45,64	43,54	2,10	2,82	- 7,14	
		41,75	42,65	- 0,90	0,00	1,00	
		44,20	42,20	2,00	2,90	- 7,70	
	C/T + T/T	41,20	41,45	- 0,25	0,00	1,00	
		40,93	41,51	- 0,58	- 0,33	1,28	
		42,58	43,21	- 0,63	0,00	1,00	
		44,71	44,38	0,33	0,96	- 2,00	
		43,57	44,67	- 1,10	0,00	1,00	
		46,16	43,18	2,98	4,08	- 16,95	

^a 1.00: Referencia. ^b Positivo: ARNm sobre-expresión. ^c Negativo: ARNm sub-expresión.

REFERENCIAS

- Aeo, S., Pavlov, D., Clavero, F. (2010). Riesgo relativo y Odds ratio ¿Qué son y cómo se interpreta?. *Rev. Obstet. Ginecol.* 5 (19): 51-4.
- Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S., Kvale, G. (2005). Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer.* 92: 167-175.
- Almeida, C. y Barry, S. (2010). *The basics of Cancer-Cancer: basic science and clinical aspects.* Volume 1, Chapter 1, pp 1-25. Editorial Wiley-BackWell, Massachusetts, USA.
- American Cancer Society. (2014). *Breast Cancer- Health Professional Version.* Recuperado el 13 de octubre de 2014 de www.cancer.org
- American Joint Committee on Cancer (AJCC). (2014). *Breast Cancer.* Recuperado el 7 de septiembre de 2014 de www.cancerstaging.org
- Anderson, W., Rosenberg, P., Prat, A., Perou, C., Sherman, M. (2014). How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?. *J Natl Cancer Inst.* 106 (8): dju165.
- Anjum, S., Fourkala, E., Zikan, M., Wong, A., Gentry-Maharaj., Jones, A., Hardy, R., Cibula, D., Kuh, D., Jacobs, I., Teschendorff, A., Menon, U., Widschwendter, M. (2014). A BRCA1-mutation associated DNA methylation signature in blood cells predicts sporadic breast cancer incidence and survival. *Genome Medicina* 6:47.
- Applied Biosystems. (2008). *Real-Time PCR: Understanding C_T.* Application Note. p:1-6.
- Araujo, F., Knox, J., Szyf, M., Price, G., Zannis-Hadjopoulos, M. (1998). Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication. *Mol Cell Biol.* 18:3475-82.
- Bagley, P. Y Selhub, J. (1998). A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA,* 95(22):13217-220.

- Bai, J., Zheng, M., Xia, X. (2009). MTHFR C677T polymorphism contributes to prostate cancer risk among caucasians: a meta-analysis of 3511 cases and 2762 controls. *Eur J Cancer*; 45:1443-9.
- Bartleet, J. y Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Bio*. 226: 3-6.
- Batschauer, A., Cruz, N., Oliveira, V., Coelho, F., Santos, I., Alves, M., Fernandes, A., Carvalho, M., Gomes, K. (2011). HFE, MTHFR and FGFR4 genes polymorphisms and breast cancer in Brazilian women. *Mol Cell Biochem*. 357 (1-2): 247-53.
- Beilby, J., Ingram, D., Hähnel, R., and Rossi, E. (2004). Reduce breast cancer risk with increasing serum folate in a case-control study of the C677T genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *European Journal of Cancer*. 40: 1250-54.
- Bennouar, N., Allami, A., Azeddoug, H., Bendris, A., Laraqui, A., Jaffali, A., Kadiri, N., Benzidia, R., Benomar, A., Fellat, S., Benomar, M. (2007). Thermolabile Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and homocysteine are risk factors for coronary artery disease in Moroccan Population. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 80687: 1-9.
- Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the million women study. *Lancet*. 362: 419-27.
- Bestor, TH. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 9:2395-402.
- Brandt, PA., Spiegelman, D., Yaun, SS., Adami. HO., Beeson, L., Folsom, A., Fraser, G., Goldbohm, R., Graham, S. Kushi, L. (2000). Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*. 152: 514-27.
- Breast Cancer. (2012). Tipos de cáncer de mama. Recuperado el 15 de octubre de 2014 de www.breastcancer.org.
- British Medical Journal. (1976). Hormone receptors and breast cancer. *British Medical Journal*. 6027: 66-8.

- Bustin, SA. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25:169-93.
- Calaf, G., Roy, D., Narayan, G. y Balajee, A. (2013). Differential expression of cell adhesion molecules in an ionizing radiation-induced breast cancer model system. *Oncology Reports.* 30: 285-291.
- Campbell, I., Baxter, S., Eccles, D. y Choong, D. (2002). Metylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer. *Breast Cancer Res.* 4: R14.
- Carvalho, R., Costa, DM., Cordeiro, DE., Viera, A., Rabenhorst, S. (2012b). Interaction of MTHFR C677T and A1298C, and MTR A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in northeast Brazil. *Anticancer Res.* 32(11): 4805-11.
- Carvalho, R., Menezes, D., Freire, T., Sales, D., Alencar, V., Rabenhorst, S. (2012a). Associations of polymorphisms of folate cycle enzymes and risk of breast cancer in a Brazilian population are age dependent. *Mol Biol Rep.* 39 (4): 4899-907.
- Castaño, L. y Bilbao, JR. (1997). Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría: Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. *An Esp Pediatr.* 46: 305-10.
- Catsburg, C., Kirsh, V., Soskolne, C., Kreiger, N., Rohan, T. (2014). Active cigarette smoking and the risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Epidemiology.*
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). (2013). Prevención y control del cáncer. Recuperado el 23 de Julio de 2014 de <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/dcpc/prevention/other.htm>.
- Chidgey, M. y Dawson, C. (2007). Desmosomes: a role in cancer?. *Br J Cancer.* 96: 1783-87.
- Chou, Y., Wu, M., Yu, JC., Lee, MS., Yang, T., Shih, H., Wu, TY., Sun, CA. (2006). Genetic polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductasa gene, plasma folate levels, and breast cancer susceptibility: a case-control study in Taiwan. *Carcinogenesis.* 27(11):2295-2300.

- Cicek, M., Nock, N., Li, L., Conti, D., Casey, G., Witte, J. (2004). Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 13(8):1331-36.
- Clarke, R., Liu, M., Bouker, K., Gu, Z., Lee, R., Zhu, Y., et al. (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*. 22: 7316-39.
- Cleator, S. y Ashworth, A. (2004). Molecular profiling of breast cancer: clinical implications. *Br J Cancer*. 90:1120-4.
- Coleman, RE. y Rubens, RD. (1987). The clinical of bone metastases from breast cancer. *British Journal of Cancer*. 55:61-6.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer., y Beral, V. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individuals data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet*. 360:187.
- Corral, F. y Yépez, MJ. (2004). Epidemiología del cáncer en Quito y en otras regiones del Ecuador. Registro Nacional de Tumores SOLCA, Quito-Ecuador.
- Corrao, G., Bagnardi, V., Zambon, A., Arico, S. (1999). Exploring the dose-response relationship between alcohol consumption and the risk of several alcohol-related conditions: a meta-analysis. *Addiction*. 94: 1551-73.
- Cueva, A. y Yépez, M.J. (2009). Epidemiología del Cáncer en Quito 2003-2005. Sociedad de Lucha contra el Cáncer/ Registro Nacional de Tumores. Edición 14º, pp: 133-134. ISBN-9942-9958-0.
- Damali, M., Boersma, J., Howe, T., Goodman, J., Mechanic, L., et al. (2006). Association of MTHFR gene polymorphisms with breast cancer survival. *BCM Cancer*. 6:257.
- Daroui, P. y Haffty, B. (2012). The role of radiation therapy in ductal carcinoma In Situ- *Radiation Medicine Rounds*. 3(1); 15-26.

- De Kok, JB., Van Balken, M., Roelofs, R., Van Aarseen, Y., Gunneweik, J. (2000). Quantification of h TERT, mRNA and telomerase activity in bladder washings of patients with recurrent urothelial cell carcinomas. *Clin Chem.* 46: 2003-7.
- Deligezer, U., Akisik, E., y Dalay, N. (2005). Homozygosity at the C677T of the MTHFR gene is associated with increased breast cancer risk in Turkish population. *In vivo.* 19(5): 889-93.
- Diakite, B., Tazzite, A., Hamzi, K., Juhadi, H., Nadifi, S. (2012). Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T polymorphism and breast cancer risk in Moroccan women. *African Health Sciences.* 12(2): 204-209.
- Doerfler, W. (1983). DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem.* 52: 93-124.
- Dong, X., Wu, J., Liang, P., Li, J., Yuan, L., Liu, X. (2010). Methylenetetrahydrofolate reductasa C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Arch Med Res.* 41:125-33.
- Dong-mei, L. y Yu-Mei, F. (2011). Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potencial therapeutic targets. *Breast Cancer Res Treat.* 128: 7-21.
- Dumitrescu, RG. Y Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk-Where do we stand in 2005?. *J Cell Mol Med.* 9:208-21.
- Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* (21): 5400-13.
- Ergul, E., Sazci, A., Utkan, Z., Canturk, N. (2003). Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. *Tumor Biol.* 24: 286-90.
- Erikson, C., Salsberg, E., Forte, G., Bruinooge, S., Goldstein, M. (2007). Future supply and demand for oncologist. *Journal of Oncology Practice,* 3:79-86.
- Esteller, M., Garcia, A., Martinez-Palones, J., Xercavins, J., Reventos, J. (1997). Germ line polymorphisms in cytochrome- P450 1A1 (C4887,

- CYP1A1) and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 18: 2307-11.
- Fard-Esfahani, P., Mohammadi-Torbati, P., Hashemi, Z., Fayaz, S., Golkar, M. (2012). Analysis of relation between C677T genotype in MTHFR gene and prostatic cancer in Iranian males. *Acta Med Iran*. 50: 657-63.
- Farhat, G., Cummings, S., Chlebowski, R., Parimi, N., Cauley, J., Rohan, T., Huang, A., Vitolins, M., Hubbell, A., Manson, J., Cochrane, B., Lane, D., Lee, J. (2011). Sex Hormone Levels and Risks of Estrogen Receptor-Negative and Estrogen Receptor-Positive Breast Cancers. *J Natl Cancer Inst*. 103: 562-70.
- Fejerman, L., Ahmadiyeh, N., Hu, D., Huntsman, S., Beckman, K., Caswell, J., Tsung, K., John, E., Torres-Mejía, G., Carvajal-Carmona, L., Echeverry, M., et al. (2014). Genome-wide association study of breast cancer in Latinas identifies novel protective variants on 6q25. *Nature Communications*. 5: 5260.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., et al. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and mortality Worldwide: IARC Cancer Base N°: 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Fernandes, C., Junqueira, R., Mesquita, L., Martinez, M. (2012). Estudio histológico, inmuno-histoquímico y de cultivo celular de mamas humana y canina normal y cancerosa. *Rev MVZ Córdoba*. 17(2): 2964-73.
- Forrest, AP. (1974). Hormones and neplasia. *J Clin Pathol Suppl*. 7:65-71.
- Giusti, B., Gori, A., Marcucchi, R., Sestini, I., Saracini, C., Sticchi, E., Gensini, F., Fatini, C., Abbate, R., Gensini, G. (2007). Role of C677T and A1298C MTHFR, A2756G MTR and-786 C/T eNOS gene polymorphisms in Atrial fibrillation susceptibility. *PLoS ONE*. 2(6): e495.
- Goldhirsch, A., Glick, JH., Gelber, R., Coates, A., Thürlimann, B., Senn, H. (2005). Meeting shighlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*. 16:1569-83.

- González, L., Ávila, A., Echeverri, C., Jaramillo, S., Salazar, R., Aristizábal, B. (2007). Cáncer de mama: HER2/neu, métodos, diagnósticos y consideraciones clínicas. *Rev Colomb Cancerol*. 11(1): 40-57.
- González, L., Ávila, A., Echeverri, C., Jaramillo, S., Salazar, R., Aristizábal, B. 2011. HER2/neu and Breast Cancer: Diagnosis and Clinical Issues. *Rev Colomb Cancer Rol*. 11(1):40-57.
- Hamilton, M. (2011). *Population Genetics: Why does Hardy-Weinberg work?*. First Edition. p: 17. USA. Wiley-Blackwell.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P. (2007). American society of clinical oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 25: 5287-5312.
- Hartge, P. (2003). Genes, hormones, and pathways to breast cancer. *N Engl J Med*. 348:2352-54.
- Hecht, SS. (2002). Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ Mol Mutagen*. 39(2-3):119-26.
- Heid, C., Stevens, J., Livak, KJ., Williams, PM. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 6: 986-94.
- Heijmans, B., Boer, J., Suchiman, E., Cornelisse, C., Westendorp, R., Kromhout, D., Feskens, E., Slagboom, P. (2003). A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductasa gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer. *Cancer Research*. 63: 1249-53.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson. R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*. 11: 1026-30.
- Honrado, E., Osorio, A., Palacios, J., Benitez, J. (2006). Pathology and gene expression of hereditary breast tumors associated with BRCA1, BRCA2 and CHEK2 gene mutations. *Oncogene*. 25:5837-45.
- Hosseini, M., Houshmand, M., Ebrahimi, A. (2010). MTHFR polymorphisms and breast cancer risk. *Arch Med Sci*. 7 (1): 134-37.
- Houssami, N., Ciatto, S., Martinelli, F., Bonardi, R., Duffy, S. (2009). Early detection of second breast cancers improves prognosis in breast cancer survivors. *Ann Oncol*. 20:1505-10.

- Hurtado-Estrada, G., Sánchez, E., Miranda, H., Mares, J., Medina, E., Grifaldo, B. (2004). Factores de pronóstico en cáncer de mama. *Gamo*. 3(2):28-32.
- Imigo, F., Mansilla, E., Delama, I., Poblete, MJ., Fonfach, C. (2011). Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuadr Cir*. 25:67-74.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2010). Estadísticas Hospitalarias, Camas y Egresos. Recuperado el 13 de junio de 2014 de <http://anda.inec.gob.ec/anda/index.php/catalog/258>.
- Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J. Ward, E., Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*: 2011; 61:69-90.
- Justenhoven, C., Hamann, U., Pierl, C., Rabstein, S., Pesch, B., Harth, V., Baisch, C., Vollmert, C., Illig, T., Bruning, T., Ko, Y., Brauch, H. (2005). One-Carbon metabolism and breast cancer risk: no association of MTHFR, MTR and TYMS polymorphisms in the GENICA study from Germany. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14(12): 3015-18.
- Kalemi, T., Lambropoulos, A., Gueorguiev, M., Chrisafi, S., Papazisis, K., Koysis, A. (2005). The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Lett*. 222(1): 57-65.
- Kang, S., Zhou, J., Wong, P., Kowaslisyn, J., Strokosch, G. (1988). Intermediate homocysteinaemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductasa. *Am J Hum Genet*. 43: 414-21.
- Koenders, PG., Beex, LV., Kloppenborg, PW., Smals, AG., Benradd, TJ. (1992). Human breast cancer: survival from first metastasis. Breast Cancer Study Group. *Breast cancer research and treatment*. 21: 173-80.
- Krebs, J., Goldstein, E., Kilpatrick. (2011). Lewin's GENES X: Many hotspots result from modified bases. 10th Ed. USA. Jones and Barlett Publishers.
- Kubista, M., Andrade, JM., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 27: 95-125.

- Kumar , V., Abbas, A., Fausto, N., Aster, J. (2010). Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional. Octava edición, pp. 1065-1092. Elsevier, Madrid-España.
- Kumar, R., Sharma, A. y Kumar-Tiwari, R. (2012). Application of microarray in breast cancer: An overview. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(1):21-6.
- Kundu, Tk. y Rao, M. (1999). CpG islands in chromatin organization and gene expression. *J Biochem.* 125: 217-22.
- La Vecchia, C., Ferraroni, M., D'Avanzo, B., Decarli, A., Franceschi, S. (1994). Selected micronutrient intake and the risk of gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3:393-8.
- Lacey, J., Kreimer, A., Buys, S., Marcus, P., Chang, SC., Leitzmann, M., Hoover, R., Prorok, P., Berg, C., Hartge, P. (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer.* 9: 84.
- Lajin, B., Alhaj-Sakur, A., Ghabreau, L., Alachkar, A. (2012). Association of polymorphisms in one-carbon metabolizing genes with breast cancer risk in Syrian women. *Tumour Biol.*33: 1133-9.
- Lancet. (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* 358: 1389-99.
- Langsenlehner, U., Krippel, P., Renner, W., Yazdani-Biuki, B., Wolf, G., Wascher, T., Paulweber, B., Weitzer, W., Samonigg, H. (2003). The common 677 C>T gene polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductasa gene is not associated with breast cancer risk. *Breas Cancer Res Treat.* 81: 169-72.
- Lee, S., Kang, D., Nishio, H., Lee, MJ., Kim DH., Han, W., Yoo, K. Ahn, S., Choe, K., Hirvonen, A., Noh, D. (2004). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, diet, and breast cancer in Korean women. *Exp Mol Med.* 36 (2):116-21.

- Li, D., Wang, M., Firozi, P., Chang, P., Zhang, W., Baer-Dubowska, W. (2002). Characterization of a major aromatic DNA adduct detected in human breast tissues. *Environ Mol Mutagen.* 39 (2-3): 193-200.
- Liang, H., Yan, Y., Li, T., Li, R., Li, M., Li, S. (2013). Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer risk in Chinese population: a meta-analysis of 22 case-control studies. *Tumor Biol.* 35:1695-701.
- Liew, SC., y Gupta, E. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics.* Article in Press. November 2014.
- Lin, J., Zeng, RM., Li, R., Cao, WH. (2014). Aberrant DNA methylation of the P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with the methylenetetrahydrofolate reductasa C677T genetic polymorphism and folate intake in gastric cancer. *Genet Mol Res.* 13:2060-8.
- Livak, K. y Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25: 402-408.
- Longnecker, M. (1994). Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control.* 5:73-82.
- López-Cortés, A., Jaramillo-Koupermann, G., Muñoz, MJ., Cabrera, A., Echeverría, C., Rosales, F., Paz-y-Miño, C. (2013). Genetic polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the Ecuadorian population. *Am J Med Scri.* 346 (6): 447-54.
- Ma, E., Iwasaki, M., Junko, I., Hamada, G., Nishimoto, I., Carvalho, M., Motola, J., Laginha, F., Tsugane, S. (2009). Dietary intake of folate, vitamin B6, and vitamin B12, genetic polymorphism of related enzymes, and risk of breast cancer: a case-control study in Brazilian women. *BMC Cancer.* 24 (9):122.

- MacNicoll, A., Easty, G., Neville, A., Grover, P., Sims, P. (1980). Metabolism and activation of carcinogenic polycyclic hydrocarbons by human mammary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 95(4):1599-600.
- Maltseva, D., Khaustova, N., Fedotov, N., Matveeva, E., Lebedev, A., Shkunikov, M., Galatenko, V., Schumacher, U., Tonevitsku, A. (2013). High-throughput identification of reference genes for research and clinical RT-qPCR analysis of breast cancer simple. *Journal of Clinical Bioinformatics.* 3(1): 13.
- Marrero, MJ. (2010). Metilación y expresión de genes en el cáncer diferenciado de tiroides. *Revista Cubana de Endocrinología.* 21(3): 340-50.
- Martin, D., Boersma, B., Howe, T., Goodman, J., Mechanic, L., Chanock, S. (2006). Association of MTHFR gen polymorphisms with breast cancer survival. *BMC Cancer.* 6:257.
- Maruti, S., Ulrich, C., Jupe, E., White, E. (2009). MTHFR C677T and postmenopausal breast cancer risk by intakes of one-carbon metabolism nutrients: a nested case-control study. *Breast Cancer Research.* 11: R91.
- McKinnon, PJ and Caldecott, K. (2007). DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 8:37-55.
- Michael, S., Qamar, R., Akhat, F. (2008). C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with primary closed angle glaucoma. *Mol Vis;* 14: 661-665.
- Morris, C., Wright, W., y Schlag, R. (2001). The risk of developing breast cancer within the next 5, 10 or 20 years of *a woman's life*. *Am J Prev Med.* 20 (3): 214-8.
- Morse, E., Maegga, B., Joseph, G., Miesfeldt, S. (2014). Breast Cancer Knowledge, beliefs, and screening practices among women seeking care at district hospitals in Dar es Salaam, Tanzania. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research.* 8: 73-79.
- Muhammad, A., Malik, FA. Y Mahmood, A. (2012). Mutational analysis of the MTHFR gene in breast cancer patients of pakstan population. *Asian Pacific J Cancer Prev.*13: 1599-1603.

- Muslumanoglu, M., Tepeli, E., Demir, S. (2009). The analysis of the relationship between A1298C and C677T polymorphisms of the MTHFR gene with prostate cancer in Eskisehir population. *Gene Test Mol Biomarkers*; 13:641-5.
- Narváes, C., Matthews., LaPorta., E., Simmons, K., Beaudin, S., Welsh, J. (2014). The impact of vitamin D in breast cancer: genomics, pathways, metabolism. *Frontiers in Physiology*. 5(213):1-10.
- National Cancer Institute (NCI). (2014). Breast Cancer (PDQ®) Health professional Version. Recuperado el 18 de octubre de 2014 de www.cancer.gov.
- National Center of Biotechnology Information (NCBI) (s.f). Estructuras cuaternarias de la proteína MTHFR. Recuperado el 14 de octubre de 2014 de www.ncbi.nlm.nih.gov.
- Okano, M., Bell, DW., Haber, D., Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for the novo methylation and mammalian development. *Cell*. 99:247-57.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). Breast Cancer: Prevention and Control. Recuperado el 4 de octubre de 2014 de <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>.
- Paz, MF., Ávila, S., Fraga, MF., Pollan, M., Capella, G., Peinado, MA., Sanchez-Céspedes, M., Hernan, J., Esteller, M. (2002). Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res*. 62:4519-24.
- Paz-y-Miño, C. y López-Cortés, A. (2014). *Genética molecular y citogenética humana. Fundamentos, aplicaciones e investigaciones en el Ecuador: Primera Edición*. Quito, Ecuador. Yachay EP.
- Platek, M., Shields, P., Marian, C., McCann, E., Matthew, R., Nie, J., et al. (2009). Alcohol consumption and genetic variation in MTHFR and MTR in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 18 (9): 2453-59.

- Pochel, F., Toomer, C., Bransfield, K., Leong, F., Douglas, S., Field, S., Bell, S., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A., Robinson, P., Inglehearn, C., Isaacs, J., Markham, A. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*. 3: 18
- Ponce, E., Martínez, E., Ávila, M. (2001). Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud pública de México*. 43 (2): 135-50.
- Pultz, B., Da Luz, F., De Faria, P., Lima, A., Araújo, A., Barbosa, M. (2014). Far Beyond the usual biomarkers in breast cancer: A review. *Journal of Cancer*. 5(7):559-71.
- Quiñones, LA., Lavanderos, MA., Cayún, JP., García-Martin, E., Agúndez, JA., Cáceres, DD., et al. (2014). Perception of the usefulness of drug/gene pairs and barriers for pharmacogenomics in Latin America. *Current Drug Metabolism*. 15: 202-08.
- Rai, V., Yadav, U., Kumar, P., Yadav, S., Mishra, O. (2014). Maternal methylenetetrahydrofolate reductasa C677T polymorphism and down syndrome risk: a meta-analysis from 34 studies. *PLoS One*. 9: 3108552.
- Ramalho, E., Silva-Filho, J., Cartaxo, M., Cavalcanti, C., Rego, M., Oliveira, M., Beltrão, E. (2014). Assessment of changes in the brca2 and p53 genes in breast invasive ductal carcinoma in northeast Brazil. *Biological Research*. 47:3.
- Rodríguez-Dorantes, M., Telléz, N., Cerbón, M., López, M., Cervantes, A. (2004). Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Investi Clín*. 56 (1):56-71.
- Rozen, R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinaemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductasa (MTHFR). *Thromb Haemost*. 78: 523-6.
- Saini, S., Jagadish, N., Gupta, A., Bhatnagar, A., Suri, A. (2013). A novel cancer testis antigen, A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) is a potential biomarker for breast cancer. *PLoS One*. 8 (2): e57095.

- Sambrook, J., Fritsch, I., Maniatis, T. (1987). *Molecular cloning: A laboratory manual (I)*. Second Edition. pp.6.5-. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Schmittgen, T. y Livak, K. (2008). Analysis real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*. 3(6): 1101-08.
- Secretaria de Salud Pública. (2002). *Compendio de Anatomía patológica de la glándula mamaria*. Primera Edición, Capítulo 3, pp 18-20. ISBN970-721-093-1, México D.F.
- Sharp, L., Little, J., Schofield, AC., Pavlidou, E., Cotton, SC., Miedzybrodzka, Z., Baird, JO., Haites, N., Heys, S, Grubb, DA. (2002). Folate and breast cancer: the role of the polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Cancer Lett*. 181: 65-71.
- Shrubsole, M., Yu-tang, G., Cai, Q., et al. (2004). MTHFR polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the shanghai breast cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13: 190-96.
- Siegel, R., Naishadham, D. y Jemal, A. (2013). *Cancer statistics, 2013*. CA: a cancer journal for clinicians. 63:11-13. DOI: 10.3322/caac.21166.
- Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., Jemal, A. (2011). The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths. *CA Cancer J Clin*: 2011; 61: 212-236.
- Singal, R., Ferdinand, L., Das, P. (2004). Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and prostate cancer risk. *Int J Oncol*; 25:1465-71.
- Skibola, C., Smith, MT., Kane, E., Roman, E., Rollinson, S., Cartwright, R., Morgan, G. (1999). Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:12810-15.
- Stankova, J., Lawrance, A. y Rozen, R. (2008). Methylenetetrahydrofolatereductasa (MTHFR): A novel target for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Desing*. 14: 1143-50.

- Sundaram, S., Le, T., Essaid, L., Freerman, A., Huang, M., Galanko, J., McNaughton, K., Bendt, K., Darr, D., Troester, M., Makowski, L. (2014). Weight loss reversed obesity-induced HGF/c-Met pathway and basal-like breast cancer progression. *Frontiers in Oncology*. 5:175.
- Sun-Lee, J. y Oh, M. (2014). Reproductive Factors and Subtypes of breast cancer defines by estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2: A register-based study from Korean. *Clinical Breast Cancer*.
- Taplin, S., Abraham, L., Barlow, WE., Fenton, J., Berns, E. (2008). Mammography facility characteristics associated with interpretive accuracy of screening mammography. *J Natl Cancer Inst*. 100: 876-87.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schawarz, G., Pfaffl, M. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*. 31: e122.
- Ulvik, A. y Ueland, P. (2001). Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in unprocessed whole blood and serum by real time PCR: applications to SNPs affecting homocysteine and folate metabolism. *Clin Chem*: 2050-3.
- Venkitaraman, A. (2009). Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 4:461-48.
- Vitolins, M., Milliron, B., Hopkins, J., Fulmer, A., Lawrence, J., Melin, S., Case, D. (2014). Weight loss intervention in survivors of ER/PR-negative breast cancer. *Clinical Medicine Insights: Women's Health*. 7:17-24.
- Vogelstein, B. y Kinzler, W. (2002). *The genetic Basis of Human Cancer*. Editorial Mc Graw Hill, USA.
- Wang, ZG., Cui, W., Yang, LF., Zhu, YQ., Wei, WH. (2014). Association of dietary intake of folate and MTHFR genotype with breast cancer risk. *Genet Mol Res*. 24 (13): 5446-51.
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2008). *Molecular Biology of the Gene*: 6th Ed. San Francisco, USA: Benjamin Cummings.

- Weinder, N. (2003). Breast cancer markers. Program and abstracts of the annual meeting of the American society of clinical pathology. Clin Pathol. Sep: 18-21.
- Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., et al. (1998). A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductasa (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Molecular genetics and metabolism, 64: 169-172.
- Weiwei, Z., Liping, C. y Dequan, L. (2014). Association between dietary intake of folate, Vitamin B₆, B₁₂ & MTHFR, MTR Genotype and breast cancer risk. Pak J Med Sci. 30(1): 106-110.
- Wellcome Trust Sanger Institute. (2014). Sequencing. Recuperado el 19 de septiembre de 2014 de www.sanger.ac.uk.
- Widschwendter, M. y Jones, P. (2002). DNA methylation and breast carcinogenesis. Oncogene. 21: 5462-82.
- Wong, M. y Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques. 39: 1-11.
- Wu, HC., Chang, CH., Tasai, RY., Lin, CH., Wang, RF., Tsai, CW. (2010). Significant association of methylenetetrahydrofolate reductasa single nucleotide polymorphisms with prostate cancer susceptibility in Taiwan. Anticancer Res. 30: 3573-7.
- Wu, YL., ding, XX., Sun, YH., Yang, HY., Sun, L. (2013). Methylenetetrahydrofolate reductasa (MTHFR) C677T/A1298C polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. J Neurol Sci. 335:14-21.
- Yegnasubramanian, S., Kowalski, J., Gonzalo, M., Zahurak, M., Paintadosi, S., Walsh, P., Bova, G., De Marzo, A., Isaacs, W., Nelson, W. (2004). Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. Cancer Res. 64(6): 1975-86.
- Zhang, Z., Shi, Q., Liu, Z., Sturgis, E., Spitz, M., Wei, Q. (2005). Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductasa and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: A case-control analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14(5): 1188-93.

- Zhu, H., Wicker, N., Shaw, G., Lammer, E., Hendricks, K., Suarez, L., Canfield, M., Finnell, R. (2003). Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. *Molecular Genetics and Metabolism*. 78:216-21.
- Ziv, E., John, E., Choudhry, S., Kho, J., Lorizio, W., Perez-Stable, E., Gonzalez-Burchard, E. (2006). Genetic Ancestry and Risk Factors for breast Cancer among Latinas in the San Francisco Bay Area. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15 (10):1878-85.

ANEXOS

Anexo 1. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer en diferentes órganos en mujeres (Jemal, 2011).

INCIDENCIA (%)		MORTALIDAD (%)	
Mama	66,4	Mama	15,3
Pulmón	18,6	Pulmón	13,6
Colon/Recto	24,2	Colon/recto	9,7
Tiroide	9,1	Ovario	5,1
Ovario	9,4	Páncreas	5,1
Melanoma	8,6	Estómago	4,7
Estómago	7,3	Cuello Uterino	3,2
Riñón	5,8	Leucemia	2,9
Cavidad Oral	2,4	Hígado	2,5
Esófago	1,2	Vejiga	1,0

Anexo 2. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de mama reportadas por varias regiones del mundo (Jemal, 2011).

América			Europa			Asia/Australia		
Región	Incidencia*	Mortalidad*	Región	Incidencia*	Mortalidad*	Región	Incidencia*	Mortalidad *
Norteamérica	76,7	14,8	Oeste de Europa	89,9	17,5	Australia	85,5	15,4
América del Sur	44,3	13,2	Sur de Europa	68,9	15,3	Sur-Centro de Asia	24,0	12,0
Caribe	39,1	14,2	Este de Europa	45,3	16,9	África del Este	19,3	6,3

* Tasas ajustadas para cada 100.000 personas por año

Anexo 3. Tasas de incidencia de cáncer de mama, reportadas en diferentes provincias del Ecuador (Cueva y Yépez, 2009, pp.133-134).

Provincia/año	Nº de casos	Tasa cruda*	Tasa estandarizada*
Pichincha (2003-2005)	732	31,4	35,6
Azuay (2011-2004)	172	18,7	21,3
Guayas (2001-2002)	408	19,4	22,3
Loja (2002-2003)	56	28,1	34,1
El Oro(2002-2004)	118	14,4	18,8
Manabí (199-2002)	256	10,5	14,0

*Tasas ajustadas para cada 100.000 personas por año

Anexo 4. Clasificación TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis) en cáncer de mama (AJCC, 2014).

Clasificación TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis)	
Tumor Primario (T)	
Tis	Carcinoma in situ
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal in situ
Tis (CLIS)	Carcinoma lobulillar in situ
T0	Sin evidencia de tumor primario
T1	Tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión
T2	Tumor entre 2 y 5 cm en su mayor dimensión
T3	Tumor mayor de 5 cm en su mayor dimensión
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión hacia la pared torácica, piel o axilas
Ganglios Linfáticos Regionales (N)	
pN0	No metástasis, histológicamente, en ganglios regionales, sin examen adicional
pN1	Metástasis de 1 a 3 ganglios axilares, o ganglios mamarios internos con afectación microscópica
pN1a	Metástasis de 1 a 3 ganglios axilares
pN1b	Metástasis en ganglios mamarios internos
pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y en ganglios mamarios internos
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares o en ganglios mamarios internos
pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares (> 0,2cm)
pN2b	Metástasis en ganglios mamarios internos clínicamente detectables en ausencia de ganglios axilares afectados
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios axilares o ganglios mamarios internos, o ganglios infraclaviculares
pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios axilares, o en ganglios infraclaviculares
pN3b	Metástasis en ganglios mamarios internos ipsilaterales, con presencia de ganglios axilares afectados (1 a 3)
Metástasis a distancia (M)	
M0	Sin presencia de metástasis conocidas
M1	Con metástasis a distancia

Anexo 5. Clasificación del carcinoma invasivo con sus características clínicas (Secretaría de la Salud Pública, 2002).

Histotipos del cáncer de mama de células invasoras	
Carcinoma Lobulillar	<ul style="list-style-type: none"> • Rango de edad de presentación de 45 a 57 años. • Presentan células pequeñas con un ribete de citoplasma, núcleo ovalado. • Los RE son positivos del 70% al 92%, y los RP son positivos del 33% al 63% de los casos.
Carcinoma Mucinoso	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma que contiene grandes cantidades de mucina extracelular. • Presenta RE positivos del 43% al 75% de los casos y el 14% es positivo para RP. • El 90% de los casos de carcinomas mucinosos puros son diploides.
Carcinoma Tubular	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma poco común, compuesto por canalículos bien formados, similares a túbulos. • Presentan excelente pronóstico. • Tiene una incidencia del 0,4% al 8% entre todos los carcinomas mamarios, con una edad promedio de presentación de 50 años.
Carcinoma Medular	<ul style="list-style-type: none"> • Pronostico relativamente favorable. • Edad de presentación en mujeres es de 46 a 54 años. • Células lobuladas, fibrosis encapsulada, color café-gris.
Carcinoma Papilar	<ul style="list-style-type: none"> • Edad de presentación es de 63 a 67 años. • Son positivos para RE y RP. • Se originan en la porción central de la glándula mamaria, presenta sangrado a través del pezón.
Carcinoma Metaplásico	<ul style="list-style-type: none"> • Se caracteriza por la presencia de adenocarcinoma mezclado con células escamosas, óseas y fusiformes. • Presenta sub-clasificaciones: carcinoma escamoso, carcinoma adenoescamoso, carcinoma con diferenciación condroide, y diferenciación ósea.

RE: Receptor de Estrógeno

RP: Receptor de Progesterona

Anexo 6. Subtipos de cáncer de mama determinados por perfiles de expresión génica e inmunohistoquímica (Kumar, 2012, p.1085).

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
Luminal A	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (-), bajo Ki67	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo grado histológico, respuesta hormonal. • Subtipo más común (42-59% de los casos) y menos agresivo, buen pronóstico. • Está asociado con el incremento de la edad.
Luminal B	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (+), alto Ki67	<ul style="list-style-type: none"> • Similar al Luminal A. • Receptores más frecuentes: RE (+)/RP (-). • Presente del 6% al 19% de los casos en cáncer de mama.
Triple Negativo	RE(-); RP(-); HER2/neu (-), CK5/6 (+) y/o EGFR (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Presente del 15% al 20% de los casos. • Un patrón muy agresivo, mal pronóstico. • Riesgo en edades menores a los 40 años. • Más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas.
HER2/neu	RE(-), RP (-); HER2/neu (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Presente del 7% al 12% de los casos. • Alto grado histológico.

RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona

CK5/6: Citoqueratina

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

Ki67: Factor de proliferación celular

Anexo 7. Encuesta Biomédica aplicada para individuos controles.

Código del laboratorio:

Fecha:

DATOS PERSONALES

Nombre y Apellidos: _____

Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____

Estado Civil: _____ Ocupación/Instrucción: _____

Lugar donde reside: _____

Lugar de procedencia: _____

Sexo: Femenino

Etnia: (caucásica, afroamericana, indígena, mestizo)

ANTECEDENTES PERSONALES

Fuma: SI ___ NO ___ Unidades por día ___ Tiempo de ser fumador _____

Hace cuánto tiempo dejo de fumar

—

Toma café (derivados): SI ___ NO ___ Cantidad y frecuencia: _____

Alcohol: SI ___ NO ___ Cantidad y frecuencia:

Edad de Menarquia: _____ Edad de Menopausia: _____

Número de hijos: _____ Edad del primer parto: _____

Tuvo algún aborto en su periodo reproductivo: _____

Consume anticonceptivos: SI ___ NO ___ Desde hace cuánto lo consume: _____

Hace cuánto tiempo dejo de consumirlo: _____

Sufre de sobrepeso: SI ___ NO ___ Peso actual: _____

EXPOSICIONES

Medicamentos

Enfermedades que tiene o tuvo, incluyendo las relacionadas con la gla. mamaria

Antecedentes familiares con cáncer/ Tipo de cáncer

—

Parentesco con la persona que tiene/tuvo cáncer

—

Anexo 8. Consentimiento informado.

A quien corresponda:

El Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas (UDLA), agradece a la Sra. (ita) _____ con C.I N°: _____, por la donación de una muestra sanguínea, misma que será sometida a extracción de ADN y ARN que será aporte a modo de control sano para el proyecto "**Frecuencias y expresión del polimorfismo funcional Ala677Val del gen MTHFR en población ecuatoriana con cáncer de mama**" específicamente para estudios de marcadores moleculares en cáncer de mama.

La participación en los análisis realizados será de absoluta confidencialidad, y los resultados obtenidos, serán publicados guardando la identidad de los individuos participantes.

Con la firma del presente documento, el sujeto certifica que no recibe ningún apoyo económico alguno de ningún tipo por parte del proyecto, y que de considerarlo necesario, puede excluirse del mismo.

Atentamente,

Dr. César Paz-y-Miño

Donante

Decano del Instituto de Investigaciones Biomédicas

Anexo 9. Método Livak (Livak, 2001, p.402).

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_{Tgen\ interes} - C_{Tinterno})A - (C_{Tgen\ interes} - C_{Tinterno})B]$$

C_T : primera señal fluorescente que el equipo detecta (intersección entre la curva de amplificación y la línea del umbral) (Wong & Medrano, 2005)

A: tejido neoplásico mamario

B: tejido sano mamario

Gen interés: MTHFR (Metilentetrahidrofolatoreductasa)

Interno: GAPDH (Gliceraldehído3-fosfatodeshidrogenasa)