



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**NIVELES DE METILACIÓN DE LOS GENES *RARβ2*, *GSTP1* y
SFRP1 EN ADN LIBRE CIRCULANTE (BIOPSIA LÍQUIDA) Y
CÁNCER DE MAMA EN MUJERES DE ONCOSALUD-AUNA**

2016-2017

PRESENTADO POR
PIERINA DANÓS DÍAZ

ASESOR
JOSE LUIS BULEJE SONO

TESIS

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INVESTIGACIÓN
CLÍNICA**

LIMA – PERÚ

2019



**Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA**

La autora permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO**

**NIVELES DE METILACIÓN DE LOS GENES *RARβ2*, *GSTP1* y
SFRP1 EN ADN LIBRE CIRCULANTE (BIOPSIA LÍQUIDA) Y
CÁNCER DE MAMA EN MUJERES DE ONCOSALUD-AUNA
2016-2017**

TESIS

PARA OPTAR

EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

**PRESENTADA POR
PIERINA DANÓS DÍAZ**

**ASESOR
PH.D JOSE LUIS BULEJE SONO**

**LIMA, PERÚ
2019**

JURADO

Presidente: Julio Elías Abugattas Saba, doctor en Medicina

Miembro: Ricardo Fujita Alarcón, doctor en Genética Molecular

Miembro: María Luisa Guevara Gil, doctor en Ciencias

A la maestra Patty, por enseñarme a aprender

AGRADECIMIENTOS

A Jose Luis Buleje, doctor en Biología y clínica del cáncer, por idear el proyecto que me permitió conocer la incertidumbre y la pasión por la investigación. A los integrantes del Centro de Investigación en Genética y Biología Molecular, especialmente a su director, el Dr. Ricardo Fujita por hacer posible ese espacio donde uno puede crecer; a la Dra. María Luisa Guevara por su invaluable apoyo profesional y emocional, necesario para crecer como persona y superar las dificultades; al Dr. Oscar Acosta por su gran disposición y su apoyo metodológico; a la Lic. Yanina Enriquez por su diligencia y amistad; a la dupla digital de Stefano Giannoni y Alexis Murillo, cuyos aportes técnicos y tácticos fueron fundamentales para este trabajo. Al Dr. José Sandoval, Alejandro Zevallos, Daisy Obispo, Rodrigo Sánchez y Lina Laymito por su amistad, apoyo y por hacer del CIGBM un ambiente inolvidable.

A Oncosalud-AUNA por contribuir a la realización de este proyecto con profesionales destacados como el Dr. Joseph Pinto y la Bióloga Jhajaira Araujo, mención especial por nunca romper la cadena de frío. Agradezco también a cada una de las participantes de este estudio, quienes se enrolaron en un acto altruista para contribuir con la investigación científica. A Innóvate Perú (Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad) de acuerdo al convenio N°138-PNICP-PIAP- 2015, por contribuir a la realización de este proyecto. Mención aparte merece el Dr. Julio Abugattas, por sus interminables, necesarias y acertadas correcciones.

A la Universidad de San Martín de Porres por ser el espacio donde pude madurar profesionalmente, en especial agradezco a la Lic. Milagro Castro, por enseñar con el ejemplo, motivándome a mejorar y perseguir nuevos retos y oportunidades; a la Mg. Estephane Proaño, por enseñarme que el alumno se puede convertir en el mejor maestro. Al personal de la Escuela de Posgrado por su diligencia y apoyo. Finalmente, agradezco de corazón a mis padres, a mi hermano Riccardo y a Alonzo Ezcurra, personas invaluableles en mi vida y sin las cuales nada de lo anterior hubiera sido posible.

ÍNDICE

	Págs.
Portada	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	
Resumen	x
Abstract	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1. Antecedentes	
1.2. Bases Teóricas	5
1.3. Definición de términos básicos	38
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	40
2.1. Formulación de hipótesis	
2.2. Variables y su operacionalización	41
	43
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	
3.1. Tipos y diseño	
3.2. Diseño muestral	
3.3. Procedimiento de recolección de datos	44
3.4. Procesamiento y análisis de datos	49
3.5. Aspectos éticos	52
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	53
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	73

CONCLUSIONES 86

RECOMENDACIONES 87

FUENTES DE INFORMACIÓN 88

ANEXOS

1. Instrumento de recolección de datos
2. Tablas suplementarias
3. Figuras suplementarias
4. Consentimiento informado
5. Oficio No. 872-2017-CIEI-USMP-CCM

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables del estudio y su operacionalización	41
Tabla 2. Co-variables del estudio y su operacionalización	42
Tabla 3. Características generales y clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de mama y controles	56
Tabla 4. Diferencias entre grupos de pacientes con cáncer de mama y controles sanos para las características generales	57
Tabla 5. Asociación del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo de los genes <i>GSTP1</i> y <i>RARβ2</i>	58
Tabla 6. Asociación y riesgo del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) de los genes <i>RARβ2</i> y <i>GSTP1</i> de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.	59
Tabla 7. Asociación entre el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del gen <i>RARβ2</i> y las características clínico-patológicas de controles y pacientes de cáncer de mama.	60
Tabla 8. Asociación entre el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del gen <i>GSTP1</i> y las características clínico-patológicas de controles y pacientes de cáncer de mama.	61
Tabla 9. Asociación entre las características clínicas de controles y el porcentaje de promotor metilado (PMR) de los genes <i>RARβ2</i> y <i>GSTP1</i> de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.	62
Tabla 10. Asociación entre las variables clínico-patológicas de pacientes de cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del gen <i>RARβ2</i> de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.	63
Tabla 11. Asociación entre las variables clínico-patológicas de pacientes de cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del gen <i>GSTP1</i> de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.	64
Tabla 12. Asociación del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del conjunto de genes <i>RARβ2+GSTP1</i>	65
Tabla 13. Asociación y riesgo del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del conjunto de genes <i>RARβ2+GSTP1</i> de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.	66

Tabla 14. Asociación entre el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del conjunto de genes <i>RARβ2+GSTP1</i> y las características clínico-patológicas de controles y pacientes de cáncer de mama.	68
Tabla 15. Asociación entre las características clínicas de controles y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del conjunto de genes <i>RARβ2+GSTP1</i> de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.	69
Tabla 16. Asociación entre las variables clínico-patológicas de pacientes de cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del conjunto de genes <i>RARβ2+GSTP1</i> de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.	71
Tabla 17. Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos para el porcentaje de promotor metilado (PMR) de los genes <i>RARβ2</i> , <i>GSTP1</i> y en conjunto (<i>RARβ2+GSTP1</i>)	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios epigenéticos durante el desarrollo del cáncer	11
Figura 2. Hipermetilación de los genes estudiados	15
Figura 3. Fuentes de ADN libre circulante para biopsia líquida	23
Figura 4. Conversión por sales de bisulfito para el estudio del promotor metilado	28
Figura 5. Esquema de Ensayo MethyLight para ocho muestras en Rotor Gene Q	35
Figura 6. Amplificación de una muestra de un Ensayo MethyLight ideal en Rotor Gene Q	36
Figura 7. Flujo de reclutamiento de participantes y muestras analizadas	53
Figura 8. Amplificación del promotor metilado de los genes <i>RARβ2</i> , <i>GSTP1</i> y <i>SFRP1</i> para los grupos de pacientes y controles	54

RESUMEN

Objetivo: Determinar la asociación entre el nivel de metilación del promotor (PMR) de los genes *RARβ2*, *GSTP1* y *SFRP1* (por separado y como panel) con el cáncer de mama y sus variables clínico-patológicas, a partir de ADN libre circulante (cfDNA) en plasma sanguíneo de pacientes y controles, evaluando su sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Metodología: Se seleccionaron 51 pacientes de cáncer de mama y 51 controles sanos, todas mujeres mayores de 40 años pareadas por edad de la red Oncosalud-AUNA. El cfDNA extraído de plasma sanguíneo fue convertido por sales de bisulfito. Se obtuvo el valor de PMR de los genes de estudio usando PCR MethyLight.

Resultados: Se encontró asociación significativa marginal entre el PMR de *GSTP1* (OR=11,5 IC95% [0,92-143,14] p=0,057) y *RARβ2* (OR=5,06 IC95% [1,01–25,31] p=0,048) y la presencia de cáncer de mama. El gen *SFRP1* no amplificó en ningún caso. La combinación del PMR de los genes *RARβ2+GSTP1* estuvo asociado con el cáncer de mama (OR=6,6 IC95% [1,71-25,74] p=0,006), el estado hormonal postmenopáusico de las pacientes (p= 0.029), el receptor de estrógeno negativo (ER; p=0.0169), el receptor de progesterona negativo (PR; p=0.044) y las controles premenopáusicas (p=0.029). El promotor metilado de ambos genes mostró una especificidad mayor al 90% y sensibilidad del 33%.

Conclusión: El nivel de metilación del promotor (PMR) de *RARβ2+GSTP1* podría contribuir a la susceptibilidad del cáncer de mama y está asociado a características clínicas de mal pronóstico en la muestra. La alta especificidad del promotor metilado de los genes *RARβ2+GSTP1* permitiría usarlos como biomarcador de biopsia líquida y como criterio de recomendación para pruebas adicionales en mujeres asintomáticas.

Palabras clave: cfDNA, PMR, biopsia líquida, MethyLight, *GSTP1*, *COL2A1*, *SFRP1*, *RARβ2*

ABSTRACT

Objective: To determine the association between the promoter methylation ratio (PMR) of the *RARβ2*, *GSTP1* and *SFRP1* genes (separately and as a panel) with breast cancer and its clinical-pathological variables, from circulating free DNA (cfDNA) in blood plasma of patients and controls, evaluating their sensitivity, specificity and predictive values.

Methodology: 51 breast cancer patients and 51 healthy controls were selected, all women older than 40 years matched by age, of the Oncosalud-AUNA network. The cfDNA extracted from blood plasma was converted by bisulfite salts. The PMR value of the study genes was obtained using MethyLight PCR.

Results: Marginal significant association was found between the PMR of *GSTP1* (OR = 11,5 IC95% [0,92-143,14] p = 0,057) and *RARβ2* (OR = 5,06 IC95% [1,01-25,31] p=0,048) and the presence of breast cancer. The *SFRP1* gene did not amplify in any case. The PMR combination of the *RARβ2+GSTP1* genes was associated with breast cancer (OR=6.6 IC95% [1,71-25,74] p=0,006), the postmenopausal hormonal status of the patients (p=0,029), the negative estrogen receptor (ER, p=0,0169), the negative progesterone receptor (PR, p=0,044) and the premenopausal controls (p=0,029). The methylated promoter of both genes showed a specificity greater than 90% and low sensitivity.

Conclusion: The level of promoter methylation (PMR) of *RARβ2+GSTP1* could contribute to the susceptibility of breast cancer and is associated with clinical characteristics of poor prognosis in the sample. The high specificity of the methylated promoter of the *RARβ2+GSTP1* genes would allow them to be used as a biomarker for liquid biopsy and as a recommendation criterion for additional tests in asymptomatic women.

Key words: cfDNA, PMR, liquid biopsy, MethyLight, *GSTP1*, *COL2A1*, *SFRP1*, *RARβ2*.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, el cáncer de mama es el segundo tipo con mayor incidencia, con 10.5% del total de casos (GLOBOCAN 2018). En Lima, esta enfermedad representaba el 12,1% del total de casos, de los cuales solo el 0,4% fue diagnosticado mediante un programa de detección precoz en el año 2011⁽¹⁾. La tasa de supervivencia de la enfermedad es de 98% en los primeros estadios, mientras que, durante la metástasis, esta tasa desciende al 27%⁽²⁾. Es por ello que las estrategias empleadas por el Ministerio de Salud para prevenir y tratar el cáncer de mama se enfocan en fomentar la prevención y la detección temprana de la enfermedad⁽³⁾.

Dentro de la oferta del sector privado para la prevención y tratamiento del cáncer de mama se encuentra la red de clínicas Oncosalud - AUNA, que registra y da seguimiento a los casos de cáncer de mama, fomentando campañas de despistaje de la enfermedad mediante programas de aseguramiento. Los métodos actuales de tamiz empleados, como la mamografía y el ultrasonido, tienen una especificidad y sensibilidad variable que puede conducir a falsos negativos o a sobre diagnóstico. Una vez que el cáncer es detectado, se clasifica por estadios de acuerdo a criterios histopatológicos como el tamaño del tumor, la infiltración en ganglios linfáticos y los receptores de superficie celular. Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, estos indicadores son insuficientes para realizar un diagnóstico de forma temprana, predecir la respuesta terapéutica, o el pronóstico del paciente⁽³⁾.

El ADN circulante (*cfDNAs*, por sus siglas en inglés) en plasma sanguíneo ha demostrado su utilidad como fuente de potenciales biomarcadores al contener ADN derivado del tumor, el cual presenta sus mismas mutaciones y cambios epigenéticos⁽⁴⁾. Respecto a estos últimos, destaca la metilación del promotor de genes relacionados a la tumorigénesis. Los patrones de ADN metilado tienen el potencial de identificar células tumorales diferenciándolas de las células sanas, por lo que actualmente se considera su uso como biomarcador y herramienta diagnóstica de fácil acceso y mínimamente invasiva, pues solo se necesita una muestra de sangre total para acceder al ADN libre circulante tumoral e identificar estos marcadores (biopsia líquida)^(5,6).

Algunos promotores de genes candidatos se han reportado metilados en la mayoría de pacientes con cáncer de mama^(2,4). Entre estos genes se encuentran *GSTP1* y *RARβ2*, de los cuales al menos uno presenta el promotor metilado en la mayoría de los tumores de cáncer de mama (98%); el gen *SFRP1* también se ha encontrado hipermetilado en pacientes con cáncer de mama (25-80%)⁽⁷⁻⁹⁾.

De acuerdo a la necesidad de encontrar biomarcadores de biopsia líquida para mejorar los métodos de tamiz actuales, se desarrolló el proyecto FINCyT: “Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (*cfDNAs*) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento”, financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad, de acuerdo al convenio N°138-PNIPC-PIAP- 2015. Este proyecto fue realizado en el Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres, con el apoyo logístico de la red Oncosalud-AUNA.

La presente tesis conforma uno de los objetivos secundarios del proyecto principal, y buscó determinar la asociación entre el nivel de metilación del promotor de los genes *GSTP1*, *SFRP1* y *RARβ2* – aislados a partir de *cfDNA* en plasma (biopsia líquida) – y la presencia de cáncer de mama en mujeres de Lima. Para ello, se estudiaron 51 pacientes y 51 controles provenientes de la red Oncosalud-AUNA para determinar el porcentaje de metilación del promotor (PMR) utilizando la técnica MethyLight, basada en PCR cuantitativa⁽¹⁰⁾.

El objetivo principal de la presente investigación fue determinar la asociación entre el nivel de metilación del promotor de los genes *RARβ2*, *GSTP1* y *SFRP1* (por separado y como panel) y el cáncer de mama. Además, se determinó si hubo asociación entre los niveles de metilación del promotor de estos genes (por separado y como panel) y las características clínicas de los controles y clínico-patológicas de los pacientes. Finalmente, se determinó la sensibilidad, especificidad y valor predictivo del nivel de metilación del promotor de cada gen por separado y como panel para conocer el valor diagnóstico estos marcadores.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

En el 2000, Eads et al. sentaron las bases del ensayo Methylight en un artículo analítico descriptivo, en el cual se describió el diseño del ensayo que usó PCR en tiempo real, además de resaltar sus ventajas para estudiar la metilación diferencial observada en tumores⁽¹¹⁾.

En el estudio se describen cuatro posibles aplicaciones de la tecnología Methylight: (A) La amplificación de un gen endógeno de referencia (indiferente a la metilación), para evaluar la masa de ADN inicial; (B) El ensayo Methylight cuantitativo que utiliza una sonda diferente para cada posibilidad de isla CpG (metiladas y no metiladas), que permite cuantificar la prevalencia de cada posible permutación de la secuencia; (C) El diseño de cebadores específicos para secuencias metiladas y no metiladas, que permite realizar la PCR específica de metilación como PCR cuantitativa; (D) El diseño de una reacción para el amplicón completamente metilado (cebadores y sonda específicas de metilación)⁽¹¹⁾.

Los investigadores concluyeron que, si bien la aplicación B puede ser usada para determinar la prevalencia de las especies heterogéneas de la metilación en un locus, la técnica Methylight que combina los enfoques de A y D permite sacar una razón entre las dos reacciones para medir la prevalencia de las moléculas metiladas en el locus de una manera costo-efectiva y con una sensibilidad de una copia metilada en 10 mil alelos sin metilar⁽¹¹⁾.

En 2005, Manel Esteller reconoce la hipermetilación de las islas CpG como un mecanismo que silencia la expresión de genes supresores de tumores. La hipermetilación también inhibe genes relacionados a impedir la invasión celular y la diseminación de células tumorales. Mecanismos como la desorganización de la cromatina e histonas también suman al dinamismo de este proceso. Se sugiere que las drogas demetilantes pueden reactivar estos genes hipermetilados y son propuestas como una forma de prevenir la metástasis⁽¹²⁾.

En 2005, Laird desarrolló una revisión sobre la epigenética del cáncer, donde describe los avances técnicos y teóricos en esta área. Entre ellos, el autor destaca la técnica MethyLight por su sensibilidad y capacidad de analizar en simultáneo diferentes paneles de genes, donde menciona que los patrones de metilación aberrantes pueden ser detectados en lesiones no malignas o pre cancerígenas. Seguidamente, resalta el incipiente uso de nuevas fuentes de ADN tumoral (aspirado de pezón, lavado de agujas, fluido prostático o eyaculación, esputo, jugo pancreático y otros)⁽¹³⁾.

También describe la posibilidad de utilizar inhibidores de metiltransferasas como Zebularine[®] como drogas prometedoras para la terapia epigenética. El autor concluye que los patrones de metilación tienen potencial para ser utilizados en aplicaciones diagnósticas como marcadores que puedan clasificar, detectar y medir el riesgo de la aparición del cáncer⁽¹³⁾.

En 2011, Dallol et al. desarrollaron un capítulo metodológico en el cual describieron detalladamente el protocolo del ensayo MethyLight y su aplicación, para determinar la metilación del promotor en muestras de tumores parafinados de cáncer colorectal. El estudio describe el empleo de controles de reacción para validar el ensayo, así como el diseño de una curva de calibración a partir del gen endógeno *COL2A1*⁽¹⁰⁾.

Es a partir de la curva de este gen que se establece la masa de ADN plantilla en la muestra problema y la concentración del amplicón de cada gen estudiado. Finalmente, el trabajo especifica la aplicación y cálculo de la fórmula para determinar el PMR de cada muestra problema⁽¹⁰⁾.

En el año 2013, Jeong et al. desarrollaron una investigación de tipo analítico descriptivo de diseño transversal. El estudio incluyó una muestra de 60 tumores mamarios que fueron analizados por pirosecuenciamiento para cinco genes candidatos, entre los que destaca *SFRP1*. El estudio determinó el estado de metilación de los genes y su asociación con subtipos moleculares⁽¹⁴⁾.

En el caso del gen *SFRP1*, la metilación del promotor fue significativamente menor en el tipo basal que en los tipos luminal A, luminal B y HER2. La expresión de Bcl-2, el receptor de progesterona y el receptor de estrógeno positivo también estuvieron asociados a la metilación de *SFRP1*. Se sugirió usar los niveles de metilación de *SFRP1* para discriminar entre el subtipo basal y los demás tipos de cáncer de mama⁽¹⁴⁾.

En 2015, Fang et al. realizaron una investigación de tipo metaanálisis de 19 estudios para evaluar el estado de la literatura sobre la asociación entre la hipermetilación de *RARβ2* y el riesgo de tener cáncer de mama. El OR obtenido para la metilación de *RARβ2* fue de 7.27 (IC 95%: 3.01– 17.52). Por lo tanto, la hipermetilación del promotor de *RARβ2* puede utilizarse como un biomarcador con potencial para detectar el cáncer de mama⁽¹⁵⁾.

En 2018, Gurioli et al. realizaron una revisión concerniente a la hipermetilación del promotor del gen *GSTP1* como biomarcador de biopsia líquida. Este marcador mostró alta especificidad, pero baja sensibilidad en cáncer de próstata, por lo que su uso con otros marcadores es recomendado y a la fecha no ha llegado a la práctica clínica. Los investigadores concluyeron que se necesitan más estudios prospectivos para determinar su eficacia como biomarcador en otros tipos de cáncer⁽¹⁶⁾.

1.2. Bases teóricas

Cáncer de mama

El cáncer de mama se manifiesta a partir de un grupo de células que dan origen a un tejido nuevo (neoplasia). La célula tumoral reúne una serie de características fisiológicas que la diferencian del resto de células normales del organismo ⁽¹⁷⁾.

Entre ellas están: la autogeneración de señales de crecimiento celular, la pérdida de sensibilidad ante señales supresoras del crecimiento celular, la evasión de la apoptosis o muerte celular, el tener un potencial replicativo ilimitado, ser capaz de realizar angiogénesis mientras invade tejidos y, finalmente, la capacidad de

hacer metástasis. Estos cambios representan la adaptación o resistencia de la célula tumoral a diferentes sistemas reguladores que previenen el desarrollo del cáncer y que están gobernados por múltiples genes y vías metabólicas⁽¹⁷⁾.

Estas células se caracterizan por presentar diversas alteraciones genéticas como son las deleciones y polimorfismos de nucleótido único (SNP por sus siglas en inglés) en genes reguladores del crecimiento celular y de la reparación del ADN, aneuploidías y otros ordenamientos cromosómicos, que son ampliamente descritos en la literatura y son estudiados con ayuda de técnicas moleculares como el secuenciamiento Sanger, la Amplificación de Sondas dependiente de Ligandos Múltiples (*Multiplex Ligation Probe Amplification* – MLPA por sus siglas en inglés) y el secuenciamiento de próxima generación (*Next Generation Sequencing* - NGS)⁽¹⁸⁾.

Las variantes encontradas son clasificadas y reportadas como mutaciones patogénicas, variantes de significado desconocido o variantes polimórficas en las diferentes poblaciones, con el objetivo de trazar el ATLAS o mapa genómico de la enfermedad⁽¹⁸⁾. Algunos factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama son: edad mayor de 40 años, antecedentes de cáncer de mama en parientes cercanos; enfermedades en la glándula mamaria; menarquia temprana y maternidad luego de los 35 años. A pesar de las asociaciones de estos factores con la enfermedad, el 75% de las pacientes no muestran exposición a alguno de estos factores de riesgo⁽¹⁹⁾.

Para mayor detalle, los factores de riesgo pueden dividirse en inherentes y extrínsecos. El primer grupo se caracteriza por ser parámetros independientes y no modificarse fácilmente durante la vida del paciente, como son el sexo, edad, raza, mutaciones genéticas, aparición de tumores benignos en la mama y la exposición a estrógenos desde una edad temprana debido a una menarquia antes de los 12 años. El haber tenido un embarazo exitoso antes de los 35 años y dar lactancia materna se consideran factores protectores⁽¹⁹⁾.

El segundo grupo incluye influencias ambientales como la dieta, el estilo de vida y medicación preexistente. Entre estas últimas, las terapias hormonales y anticonceptivas en base a estrógenos son un factor de riesgo controversial, debido a que sólo algunas formulaciones han sido asociadas como factores de riesgo, como las que combinan estradiol con levonogestrel. Otros factores a considerar son la exposición a radiación o sustancias químicas con potencial mutagénico⁽¹⁹⁾.

En el Perú, según las estadísticas de la Vigilancia Epidemiológica de Cáncer, el cáncer de mama fue el tercer cáncer con mayor prevalencia (periodo 2006-2011) y representaba el 10,3% de los casos. Para el 2018, el cáncer de mama fue el cáncer con mayor prevalencia en mujeres (13,8%), seguido del cáncer de cérvix (7,4%)⁽¹⁾.

Actualmente, la edad estandarizada de incidencia de la enfermedad es de 40 años, con una tasa de mortalidad del 10,3% de los casos (GLOBOCAN 2018). Solo en Lima, el cáncer de mama alcanza el 10.5% del total de casos, afectando mayormente a mujeres, de las cuales sólo el 0,4% ha sido diagnosticado mediante un programa de detección precoz o tamiz⁽³⁾.

Las estrategias empleadas por el Ministerio de Salud se han enfocado en fomentar la prevención y detección temprana de esta enfermedad. Esto se debe a que el diagnóstico del cáncer luego que el tumor hace metástasis tuvo una tasa de supervivencia del 27% durante el periodo 1995-2004. Sin embargo, el diagnóstico temprano del cáncer de mama tiene una tasa de supervivencia del 98%, además de requerir un tratamiento menos severo y ser de mejor pronóstico^(6,20).

En los primeros estadios, el pequeño tamaño del tumor lo hace difícil de distinguir del tejido sano. Los métodos comunes de tamiz como la mamografía suelen tener una pobre especificidad para detectar tumores asintomáticos, pasando por alto cánceres letales pre-metastásicos en el estadio en el que aún se pueden curar⁽²¹⁾.

El alto porcentaje de falsos positivos resultantes de la mamografía durante el descarte de cáncer de mama representan un costo significativo al sistema de salud, con consecuencias psicológicas y físicas en el paciente, donde la más grave resulta en la muerte del paciente como consecuencia de un falso negativo en una prueba de detección temprana. Adicionalmente, la mamografía no es informativa sobre la biología del tumor ⁽²¹⁾.

En la práctica, la mamografía se realiza cuando se detecta una anomalía durante el palpado de la mama. Esta prueba también se recomienda como tamiz anual o bianual a partir de los 40 años. A pesar de los problemas de especificidad mencionados, la mamografía ha logrado disminuir la mortalidad del cáncer de mama en las mujeres de 50 a 69 años⁽²²⁾.

Cuando el cáncer de mama es diagnosticado, se le clasifica por estadios que siguen criterios histopatológicos como: el tamaño del tumor, la infiltración en ganglios linfáticos y los receptores de superficie celular. La clasificación intrínseca de subtipos de cáncer de acuerdo a la inmunohistoquímica sirve para escoger el tratamiento en la etapa de neoadyuvancia o el tratamiento adyuvante ^(19,23).

De estos, solo el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y el Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) son los únicos factores predictivos validados, lo cual permite administrar terapias endocrinas y anti-HER2. De estos tres marcadores, la sobreexpresión de ER se asocia a un menor beneficio de la quimioterapia⁽²²⁾.

Esta clasificación basada en perfiles de expresión génica ha generado subtipos intrínsecos de cáncer de mama que brindan una identidad molecular al tumor independientemente del estadio en el que se encuentra, para luego ser utilizados como indicadores de recidiva, supervivencia y respuesta a la quimioterapia. Sin embargo, estos indicadores son insuficientes para predecir el pronóstico de la respuesta terapéutica debido a la heterogeneidad de la enfermedad⁽⁶⁾.

Modificaciones epigenéticas en el cáncer de mama

La epigenética son los cambios heredables en la expresión genética que no se deben a una alteración en la secuencia de ADN. Entre los cambios epigenéticos destacan la metilación del ADN y la modificación de histonas. Ambos tienen el potencial de modificar la expresión genética y la estabilidad del genoma. Los cambios epigenéticos se diferencian de las mutaciones genéticas en que son más frecuentes; son potencialmente reversibles, ya que dependen de la acción enzimática; no significan un cambio en la secuencia del código genético y ocurren en regiones definidas del genoma, marcadas por la presencia de islas CpG⁽⁶⁾.

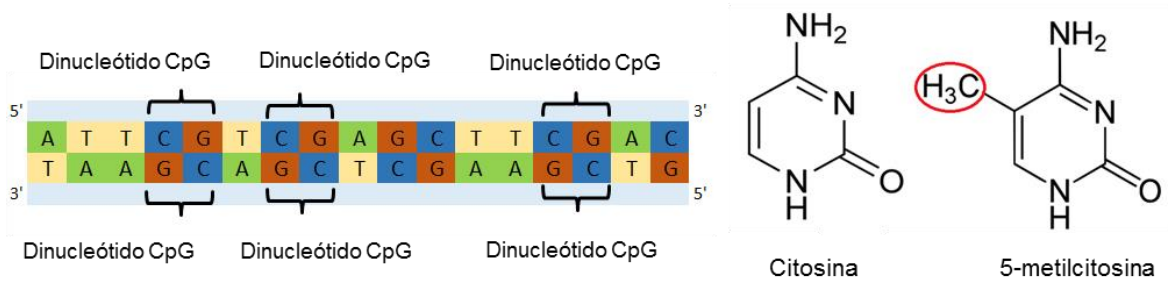
Las islas CpG son fragmentos pequeños de ADN que se localizan dentro y en los alrededores de la región promotora y de los sitios de inicio de la transcripción en aproximadamente la mitad de los genes humanos. Están compuestas de múltiples citosinas que se encuentran junto a una guanina en el sentido 5' → 3', particularidad que le da el nombre. Normalmente no metiladas en los tejidos sanos, muestran metilación en los tejidos tumorales⁽⁶⁾.

En los mamíferos, estos dinucleótidos se encuentran en muy baja proporción, caracterizándose por estar en grupos o clúster (de ahí el nombre de "islas") y se presentan como fragmentos de 200 pares de bases (pb) en el que la probabilidad que ocurra un dinucleótido "CG" en el sentido 5' → 3' es mayor a 0.60, característica que las distingue del ADN repetitivo común o parasítico. Además, estos lugares se encuentran sin metilar en la línea germinal y en la mayoría de células somáticas⁽²⁴⁾.

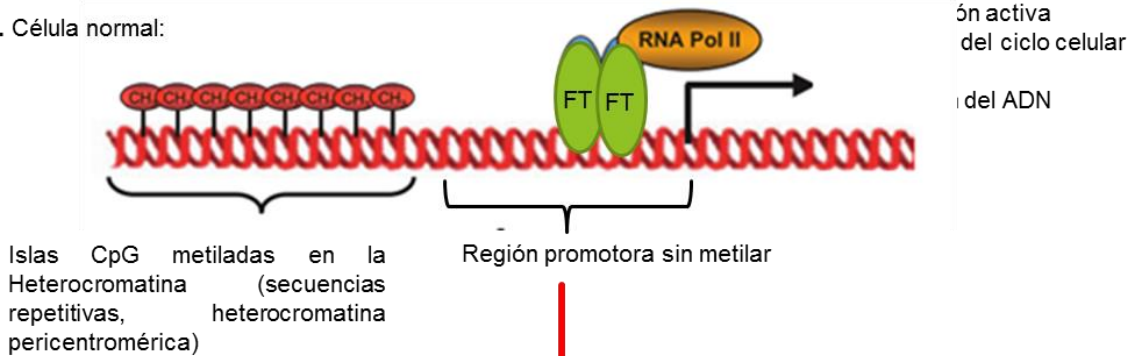
Una célula somática normal mantiene su patrón de metilación de la siguiente manera: en el momento de la división celular, las células hijas que provienen de una célula con promotor metilado en un gen que no debe expresarse, tendrán una hebra parental metilada. Esta modificación será entonces reconocida por una enzima metiltransferasa de mantenimiento, que reconocerá el sitio hemimetilado y metilará las citosinas faltantes⁽²⁵⁾.

En los últimos años se ha descrito el rol de los cambios epigenéticos presentes en las células tumorales y su utilidad como biomarcadores. Las alteraciones epigenéticas se encuentran presentes en las células neoplásicas en patrones característicos intra e inter tumorales que pueden servir para diferenciarlas de otros tipos celulares y clasificar subtipos de metilación. Los dos eventos epigenéticos más importantes en las células tumorales son la hipometilación y la hipermetilación del ADN, ilustrados en la figura 1⁽²⁶⁾.

A. Metilación de las islas CpG



B. Célula normal:



C. Célula cancerígena:

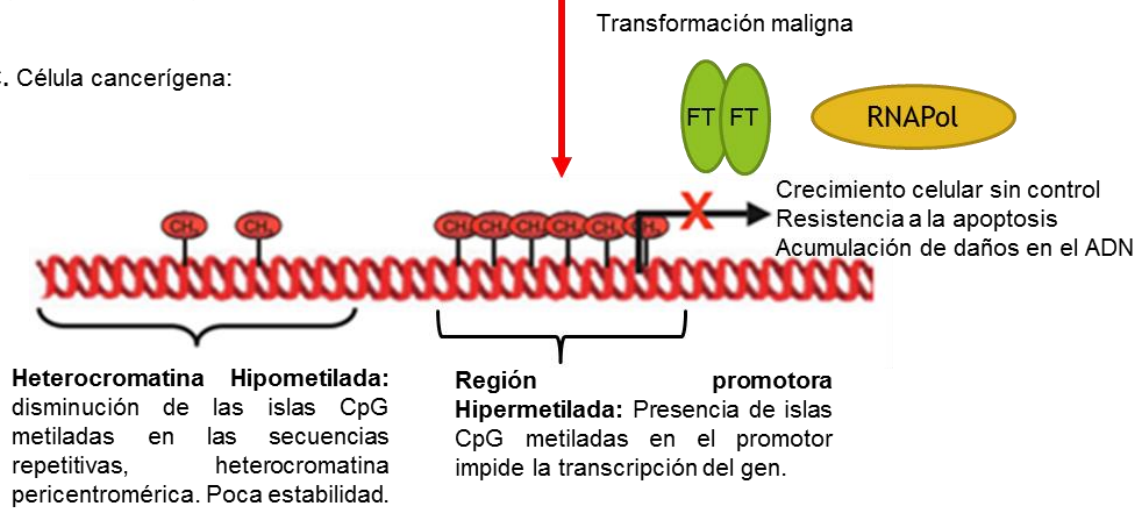


Figura 1. Cambios epigenéticos durante el desarrollo del cáncer

A. Los cambios en la metilación de las células tumorales ocurren en las islas CpG, dinucleótidos de citosina y guanina en sentido 5'→3'. Se muestra un grupo metilo (CH₃) en el carbono 5 de la citosina (5-metilcitosina). **B.** Se muestra la metilación normal en una célula sana, con las regiones de heterocromatina metiladas y la región promotora sin metilar, favoreciendo la estabilidad del genoma y transcripción génica. **C.** El diagrama muestra los primeros signos de transformación maligna en la célula, donde la heterocromatina se encuentra hipometilada y la región promotora hipermetilada impide la transcripción. **RNA Pol II:** ARN polimerasa II; **FT:** Factores de transcripción; **CH₃:** Grupos metilo en el carbono 5 de la citosina en la isla CpG. Adaptado de Esteller M. *Epigenetics in Biology and Medicine*. 2009. 312 p.

La descripción de la hipometilación en el ADN de tumores inició el interés en los cambios epigenéticos tumorales. En el tumor, la hipometilación se da en las regiones de ADN repetido, en regiones codificantes y en los intrones que permiten versiones alternativas del ácido ribonucleico (ARN) durante la transcripción de un gen. También están hipometiladas las regiones que no contienen genes. Durante la progresión del cáncer, el grado de hipometilación del ADN genómico incrementa, hallándose los niveles más bajos de metilación en el cáncer invasivo⁽²⁷⁾.

La hipometilación puede reactivar el ADN endoparasítico intragenómico y elementos Alu, capaces de translocarse por el genoma y causar disrupciones. En suma, la hipometilación del ADN tiene efectos distintos e impredecibles que propician los cambios en la expresión del genoma de la célula tumoral (28). Cabe resaltar que el ADN de tejidos provenientes de neoplasias mamarias está hipometilado en su mayoría. Se postula que la hipometilación general contribuye a la inestabilidad cromosómica del genoma tumoral, la activación de los transposones y la pérdida de la impronta materna o paterna. También se favorece la recombinación durante la mitosis, que conlleva a deleciones y translocaciones, promovándose los rearrreglos cromosómicos⁽²⁷⁾.

Por otra parte, la hipermetilación de las islas CpG es otro de los signos epigenéticos tempranos del cáncer, que usualmente se encuentra en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores. Este evento ocurre en las primeras etapas del desarrollo de distintos tipos de cáncer, en los que silencia genes con funciones muy importantes en la proliferación celular, como *MLH1* y *BRCA1*(29).

La hipermetilación del promotor génico puede afectar a los genes involucrados en la reparación del ADN, el control del ciclo celular, la carcinogénesis, la angiogénesis y otros procesos que de una u otra forma están relacionados con la progresión del cáncer. El efecto más resaltante se da cuando se silencian genes de reparación del ADN y se propicia la transformación neoplásica de la célula⁽²⁹⁾.

El perfil de hipermetilación de los promotores es específico según el tipo de cáncer. Estos patrones no solo se encuentran en los cánceres de origen esporádico, sino en los síndromes de cáncer hereditario, en el que la hipermetilación se comporta como el “segundo evento” desencadenante para que se desarrolle el cáncer⁽³⁰⁾. Se estima que en el mapa de la hipermetilación están presente entre 100 a 400 islas CpG de diferentes promotores en un mismo tumor. En el caso del cáncer de mama, es frecuente encontrar genes como *BRCA1*, *RASSF1A*, *GSTP1*, *RARβ2*, y otros hipermetilados en la región promotora⁽²⁸⁾.

El por qué algunas islas CpGs se metilan en algunos tipos de cáncer y no en otros es una pregunta aun sin contestar. Se piensa que las inactivaciones de ciertos genes le pueden dar al tumor una ventaja específica en cierto ambiente. Respecto al mecanismo mediante el cual se da esta metilación, es posible que las islas CpG se encuentren ubicadas cerca de una secuencia específica que promueva la metilación del promotor, o que su posición en el cromosoma sea convenientemente sujeto de una desregulación epigenética⁽²⁸⁾.

Aunque el mecanismo de acción de la modificación epigenética para el inicio de la tumorigénesis no ha sido completamente esclarecido, existen planteamientos aceptados que podrían explicar la asociación observada entre el epigenoma y el cáncer de mama. El epigenoma constitutivo se desarrolla durante las etapas tempranas de crecimiento intrauterino y el proceso que determina este epigenoma aún no está bien dilucidado. En esta etapa, pueden introducirse errores que son susceptibles de ser pasados a la línea germinal, y que pueden transmitirse a las siguientes generaciones⁽³¹⁾.

Los cambios epigenéticos suelen entenderse bajo el modelo o paradigma de la mutación somática: el cambio en la metilación, como la hipometilación general o la hipermetilación del promotor, le confieren a la célula una selección positiva que ocasionaría la proliferación de los clones con el cambio. Sin embargo, más que un cambio drástico en el epigenoma, ahora se postula que al menos una parte de los cambios epigenéticos consisten en pequeñas desviaciones del patrón normal que se acumulan a través de la “deriva epigenética”⁽³²⁾.

La “deriva epigenética” consistiría en un vestigio adaptativo de las primeras células, anterior incluso a la meiosis, que permitiría sortear las presiones del ambiente al crear diversidad epigenética para propiciar la adaptación al medio de una de estas variantes. Cuando la acumulación gradual de grupos metilo ocurre hasta afectar la expresión genética, puede ser seleccionada si este cambio le confiere a la célula una ventaja adaptativa, lo cual llevaría a la proliferación de esta línea celular⁽³²⁾.

La acumulación de las alteraciones en la metilación puede ocurrir más rápidamente que los defectos genéticos debido a que el efecto pequeño y acumulativo de estos cambios no ha propiciado la aparición de los múltiples mecanismos de corrección que se observan en la maquinaria genética⁽³³⁾.

Además, la variación genética conlleva a patrones epigenéticos propios, por lo que cierta susceptibilidad genética podría facilitar la alteración epigenética. También, cabe la posibilidad de que la influencia ambiental puede cambiar el epigenoma de células somáticas y germinales. Por último, es posible que el efecto de la mutación de un gen controlador de la metilación del ADN tenga el potencial de cambiar la metilación en tejidos extensos o específicos⁽¹³⁾.

En resumen, la metilación en la célula cancerígena se caracteriza por una hipometilación global de nucleótidos *CpG* y la hipermetilación de las islas *CpG* de los promotores asociados a genes de supresión de tumores. Sin embargo, se debe considerar que la metilación del promotor es tan solo un marcador que indica la integración de cambios en la estructura de la cromatina y la modificación de histonas (como la desacetilación y la sumonilación) que resultan en el silenciamiento de la transcripción del gen⁽¹³⁾.

Genes relacionados a la tumorigénesis empleados en este estudio

Respecto a la hipermetilación del promotor como factor de riesgo para el cáncer, se postula que el silenciamiento de la transcripción promueve la aparición de nuevas capacidades necesarias para la tumorigénesis. La exposición por tiempo prolongado a sustancias como el estradiol y estrógenos, que promueven el crecimiento, crearía el ambiente propicio para la propagación de este patrón hipermetilado a las células hijas. La acumulación de la hipermetilación en varios loci se daría en función a la edad de la paciente y la exposición a hormonas como el estrógeno, lo cual resultaría en una célula tumoral que ha ganado las seis capacidades necesarias para la carcinogénesis, como se ve en la figura 2⁽³⁴⁾.

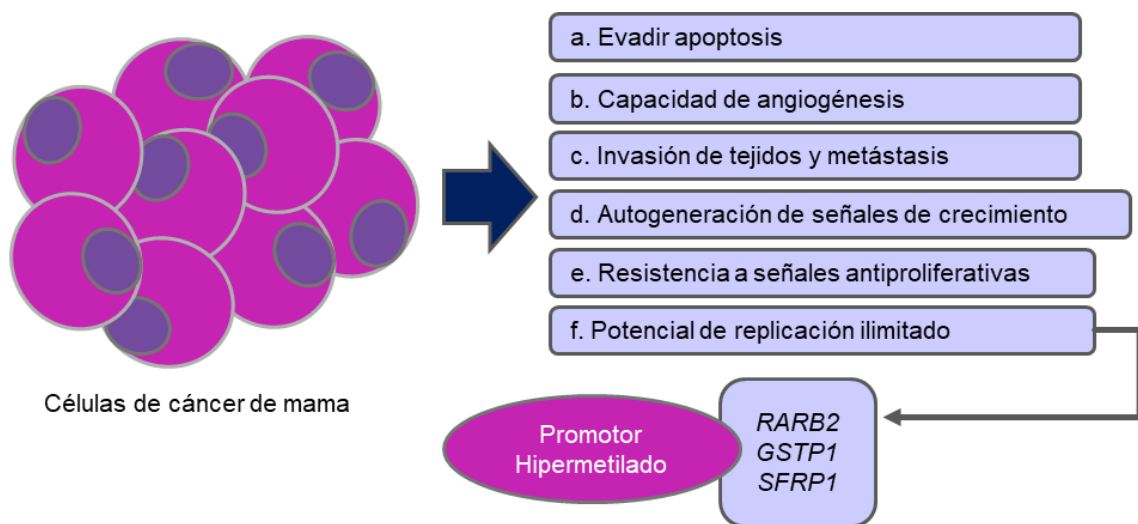


Figura 2. Hipermetilación de los genes estudiados

El silenciamiento de la transcripción debido a la metilación del promotor de algunos genes puede promover la adquisición de nuevas capacidades para la tumorigénesis (a-f). Las células mamarias pueden acumular islas CpG metiladas en varios genes debido a la edad o la exposición a factores de crecimiento (como los estrógenos). Las estrategias de defensa de la célula frente a estas seis capacidades estaría desactivada gracias a la metilación del ADN. En particular, los genes *RARB2*, *GSTP1* y *SFRP1* metilados estarían relacionados a la adquisición de potencial de replicación ilimitado. Adaptado de Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(6):1187–97

La caracterización de los patrones de metilación de distintos tipos de cáncer ya es una realidad y en la actualidad se pretende encontrar a los genes que manifiesten de manera más temprana las marcas de metilación propias de ciertos tumores para la aplicación clínica⁽⁴⁾.

Existe un gran interés en estudiar la metilación de genes relacionados a supresión de tumores para la obtención de biomarcadores de valor diagnóstico y pronóstico; debido a la necesidad de validar dichos marcadores en el diseño de paneles con sensibilidad y especificidad adecuadas. Sin embargo, aún se necesita responder a la pregunta de si este panel es válido para todas las poblaciones, pues a diferencia de las variantes genéticas, la epigenética está estrechamente ligada al medio ambiente⁽³⁵⁾.

A continuación, se describen los tres genes empleados en este estudio para caracterizar una muestra de pacientes de cáncer de mama y controles.

RARβ2

La proteína *RARβ2* es en realidad una isoforma del gen *RARβ2* cuando es transcrita por el promotor P2, localizado en el cromosoma 3p24. Entre las funciones de *RARβ2* está modular los efectos del ácido retinoico (RA) en el crecimiento celular y la diferenciación, con una posible función de inhibidor efectivo de la inducción para formar focos oncogénicos, una función parecida a la del gen *p53*. Este gen codifica para el receptor beta del ácido retinoico, miembro de la superfamilia de reguladores transcripcionales nucleares⁽³⁶⁾.

Este receptor se localiza en el citoplasma y se une a al ácido retinoico, forma biológicamente activa de la vitamina A. De esta manera, regula la señalización celular en la morfogénesis embrionaria, el crecimiento celular y la diferenciación. Se piensa que esta proteína limita el crecimiento de diferentes tipos celulares al regular la expresión de distintos genes⁽³⁶⁾. Además, muestra propiedades mediadoras del retinol anti-proliferativas, diferenciadoras, inmuno-moduladoras e inductoras de la apoptosis⁽³⁷⁾.

La pérdida en la expresión de *RARβ2* mediada por la metilación de su promotor ha sido reportada en carcinomas de mama. Además, se ha observado la metilación en la metástasis de cáncer de mama en tejidos óseos, cerebro y pulmón⁽³⁷⁾.

Es necesario dilucidar el mecanismo de acción de la metilación de *RARβ2* en la tumorigénesis. Explorar y entender este efecto es imperativo, pues otro mecanismo epigenético como la acetilación podría ser responsable de explicar en parte el silenciamiento de este gen⁽¹⁵⁾. Se ha reportado que la reducción en la expresión de *RARβ2* por la metilación puede ser revertida al inducir la re-acetilación de histonas en la región promotora, por lo que se puede considerar como un objetivo importante para la terapia epigenética⁽³⁸⁾.

Se piensa que la pérdida de la función de *RARβ2* resulta de la pérdida de heterocigosidad y la metilación del promotor. La metilación de *RARβ2* está involucrada en la respuesta hormonal⁽³⁹⁾. Se ha reportado que los pacientes que presentan metilación de *RARβ2* muestran una mayor recurrencia de la enfermedad y este gen se presenta como el más importante para un pronóstico adverso del desarrollo del cáncer⁽³⁷⁾.

La metilación aberrante del promotor de este gen lleva al descontrol del ciclo celular, ya que tiene propiedades antiproliferativas e inductoras de la apoptosis, lo que promueve la carcinogénesis mamaria. Gracias a este mecanismo descrito, *RARβ2* se postula como un predictor de la progresión tumoral. Este gen se ha estudiado en tumor y en sangre, además de suero y otros. Aún hay dudas sobre la significancia de este marcador en el diagnóstico del cáncer de mama y su asociación con los estadios y el grado histológico. Los resultados son variables y deben ser determinados⁽¹⁵⁾.

Existe controversia respecto a si la metilación de *RARβ2* es un cambio inicial o tardío del metiloma del cáncer de mama. Existen reportes que lo encuentran asociado a estadios iniciales y otros que lo encuentran en estadios tardíos, o que aumentan progresivamente con el desarrollo de la enfermedad⁽¹⁵⁾.

Un reciente metaanálisis indica que *RARβ2* no está asociado a los estadios o el grado histológico, lo cual indicaría que este cambio se da en la etapa inicial del cáncer. Sin embargo, se debe considerar la muestra usada y la sensibilidad de las técnicas usadas para estudiar la metilación. Además, en estos resultados no se toma en cuenta el estado hormonal, los receptores hormonales y el subtipo de cáncer de mama, que pueden ser fuentes de heterogeneidad. Es importante considerar que la metilación del ADN es uno de los componentes que promueve el silenciamiento genético y tomarlo como la única causa puede subestimar otros procesos biológicos, como la metilación de histonas, capaces de silenciar a este gen⁽¹⁵⁾.

a. *GSTP1*

Este gen fue uno de los primeros epimarcadores implementados para diagnóstico clínico, para discriminar cáncer de próstata en estadios tempranos. El promotor de este gen está metilado en el 90% de los casos de cáncer de próstata y se puede medir en suero, orina y semen⁽²⁹⁾.

El gen *GSTP1* es miembro de la familia del glutatión S-transferasas. Produce una enzima que cataliza la unión conjugada del glutatión (tripéptido que actúa como antioxidante en la célula) a los compuestos xenobióticos que puedan haber entrado en el organismo para formar glutatión disulfuro, que participa en la protección celular. La expresión de este gen ha sido reportada en el metabolismo del platino y también ha sido asociada a la sensibilidad a tratamiento de células tumorales⁽⁴⁰⁾.

La metilación de *GSTP1* está involucrada en el metabolismo carcinogénico. *GSTP1* codifica la enzima *Glutation-S-transferasa* clase pi, cuya falta de expresión es muy frecuente en el cáncer de próstata humano. Los primeros estudios datan de 1994 y esta información ha sido fuertemente corroborada. La metilación del *GSTP1* no se encuentra en el tejido normal de próstata o en las hiperplasias benignas. Se ha propuesto que la pérdida de esta enzima encargada de limpiar toxinas del tejido puede hacerlo susceptible a los agentes dañinos del genoma, lo que ocasionaría el desarrollo del cáncer⁽¹²⁾.

El gen *GSTP1* se encuentra hipermetilado en el cáncer de mama. Se conoce que este gen participa en la detoxificación de carcinógenos potenciales, y que la pérdida de expresión de este gen puede conllevar a daño en el ADN de células mamarias, por lo que podrían exponerse más fácilmente a los carcinogénicos. Además, la alta proporción de metilación de *GSTP1* (58%) en estadios tempranos de cáncer de mama indicaría que es un evento temprano en la carcinogénesis⁽⁴¹⁾.

La metilación de este gen también se ha asociado al cáncer luminal de tipo B. La supervivencia sin recaída fue peor para aquellos pacientes con tumores mamarios metilados en *GSTP1* y el riesgo de recurrencia es mayor. También, ha sido asociado con mal pronóstico en tumores mamarios infiltrantes en ganglios. Se considera que este marcador podría ser usado como factor pronóstico para adecuar el tratamiento de ciertos tipos de cáncer⁽⁴²⁾.

b. *SFRP1*

La familia de proteínas SFRP comprende cinco miembros, entre ellos *SFRP1*, que funcionan como inhibidores de la vía WNT (*wingless-type* en sus siglas en inglés), que juega un rol muy importante en el desarrollo embrionario, apoptosis, la diferenciación celular y la proliferación, el desarrollo tumoral y la progresión del cáncer. Como proteína, *SFRP1* es extracelular y soluble, que contiene un dominio rico en cisteína; también presenta receptores del tipo *frizzled* (FD por sus siglas en inglés) y del tipo WNT. La proteína *SFRP1* puede unirse directamente a los receptores FZ para formar complejos inactivos⁽⁴³⁾.

Se ha descrito que la función de este gen se pierde durante el desarrollo del cáncer y esta pérdida se asocia a un mal pronóstico, lo que indicaría una posible función de *SFRP1* como supresor de tumores. La metilación de *SFRP1* es el principal mecanismo de silenciamiento de este gen. Esta hipermetilación puede contribuir a la carcinogénesis de la mama y se puede usar como un marcador pronóstico del cáncer de mama. Es posible detectar la hipermetilación de *SFRP1* en el 83% de los tumores mamarios⁽¹⁴⁾.

Además, *SFRP1* tiene potencial para actuar de biomarcador de tumores triple negativo en cáncer de mama. En estudio de Jeog *et. al.* reportaron que los casos de cáncer de mama triple negativo mostraban un nivel de metilación del promotor disminuido o muy bajo para el gen *SFRP1*. Este hallazgo suma a la evidencia que sugiere que la expresión normal de *SFRP1* en tumores mamarios triple negativos estaría relacionada con una sensibilidad mayor a la quimioterapia con taxane o anthraciclina, y a un mejor pronóstico⁽¹⁴⁾.

Seugidamente, si se silenciaba este gen con el uso de siRNA, el tumor mostraba menor sensibilidad a fármacos como *paclitaxel*, *doxorubicin* y *cisplatin*. El estado de metilación de *SFRP1* tendría potencial como biomarcador para el estado basal o triple negativo del cáncer, así como para seleccionar el tratamiento. Se necesita realizar más estudios con un número de muestra mayor para conseguir evidencia adicional, además de estudiarse otros genes candidatos⁽¹⁴⁾.

También se detectaron diferencias significativas en las frecuencias de metilación de *SFRP1* y los carcinomas ductales invasivos ER positivos y negativos, lo que puede indicar un efecto del estatus ER en los cambios epigenéticos. Esta pérdida de expresión ha sido asociada al estadio tumoral y a un mal pronóstico en estadios tempranos de cáncer mamario, no obstante, se necesitan realizar más estudios sobre este gen para determinar las consecuencias funcionales de la metilación de este gen en cáncer de mama⁽⁴⁴⁾.

Metilación en el ADN libre circulante (cfDNA)

Los biomarcadores abarcan a las sustancias asociadas a la liberación de células tumorales, sustancias que se liberan en respuesta a estos tumores, marcadores fisiológicos y similares que sean susceptibles de medirse y estén relacionados directa o indirectamente a la actividad tumoral⁽⁴⁵⁾.

Con el desarrollo de técnicas más sensibles como la reacción de cadena de la polimerasa (PCR en sus siglas en inglés) cuantitativa y más recientemente, la PCR digital, se ha abierto la posibilidad de determinar la presencia de un tumor al detectar un biomarcador genético (ADN o ARN) a partir de unas cantidades iniciales muy pequeñas (menos de 1ng de ADN o ARN disponible)⁽⁴⁵⁾.

La presencia de ácidos nucleicos libres circulantes (cfDNA por sus siglas en inglés) en la sangre fue descrita por Mandel y Metais en 1948⁽⁴⁶⁾. A finales del siglo XX, ya se habían identificado ADN, ARN mensajero y microARNs provenientes del tumor que circulaban en la sangre de los pacientes de cáncer. El cfDNA en la sangre puede aislarse a partir del plasma y del suero sanguíneo, con lo cual se abre la posibilidad de monitorear la progresión de la enfermedad durante el tratamiento. A esta forma de examinar indirectamente el tumor se le conoce como biopsia líquida⁽⁴⁷⁾.

La liberación de los cfDNA a la sangre se da por tres mecanismos principales: El crecimiento tumoral provoca apoptosis en las células cancerígenas y necrosis en el microambiente tumoral. También se ha sugerido a la secreción de exosomas como una fuente de estos cfDNA. Se estima que un tumor de 100g pueda liberar 3.3% del ADN tumoral a la sangre cada día, en forma de fragmentos de 70 a 200pb. No obstante, el cfDNA puede provenir de la inflamación de tejidos, la menstruación, procesos infecciosos, obesidad y traumatismos recientes⁽⁴⁷⁾.

La ventaja principal de usar ADN libre circulante como biopsia líquida es la facilidad de obtención de la muestra a partir de suero y/o plasma sanguíneo, orina, aspirado de pezón, etc. Se considera especialmente útil en los casos en los que, por la localización del tumor, las biopsias pongan en riesgo la integridad del paciente. La variedad de kits comerciales hacen posible una extracción de cfDNA estandarizada, con resultados aceptables de concentración y calidad como se muestra en la figura 3⁽⁴⁸⁾.

A pesar de que la biopsia de tejido tumoral se mantiene como el patrón de oro para confirmar el diagnóstico de cáncer de mama, tiene la desventaja de no poder monitorearse continuamente la progresión de la enfermedad. Aspectos que escapan de esta prueba son la heterogeneidad genética dentro del tumor primario y la presencia de tumores metastásicos diseminados por el organismo que no pueden ser identificados⁽⁴⁸⁾.

Actualmente se estudian los ADN libres circulantes tumorales con pruebas que evalúan desde pocos genes a todo el genoma humano. Todo bajo el supuesto de que para un determinado tumor existe una serie de alteraciones somáticas (genéticas, epigenéticas, proteicas, *miRNAs*) que lo identifican y no están presentes en el tejido sano⁽²¹⁾.

Mientras la mayoría de test desarrollados se enfocan en las alteraciones genéticas del ADN circulante, es importante señalar que el *cfDNA* contiene RNAs tumorales (que reflejan la expresión aberrante de oncogenes) y patrones de metilación del ADN (que generalmente silencian a los genes supresores de tumores). Estas son valiosas fuentes de información complementarias a las mutaciones genéticas que pueden complementar el perfil y darle identidad a un determinado tipo de cáncer⁽²¹⁾.

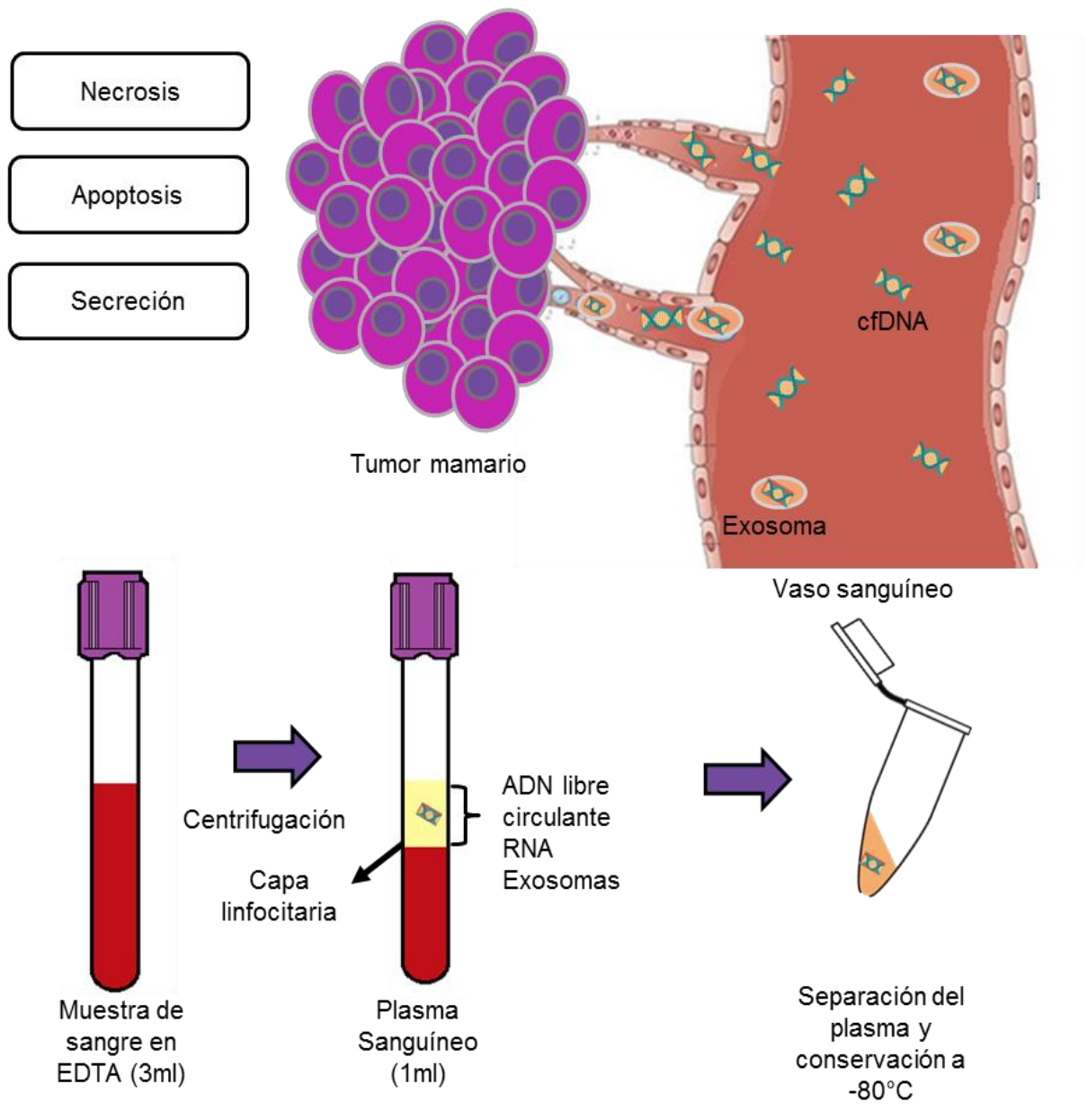


Figura 3. Fuentes de ADN libre circulante para biopsia líquida

La metilación del ADN puede ser detectada en el ADN libre circulante presente en la sangre. El ADN proveniente del tumor circula en el torrente sanguíneo de los pacientes debido a los eventos de apoptosis, necrosis y secreción de las células tumorales, lo cual libera ADN a la sangre. El ADN libre circulante (cfDNA) puede estudiarse en el plasma sanguíneo obtenido por centrifugación, minimizando la interferencia del ADN linfocitario.

Sin embargo, aún hay muchas preguntas de investigación básica por contestar sobre la biología del ADN libre circulante. Entre ellas están el dilucidar el mecanismo por el cual se produce y llega hasta la circulación sistémica; las variaciones fisiológicas que pueda tener durante el día y otros aspectos de la biología humana que contribuyan a variar su concentración; el tiempo de vida en la circulación sistémica; las relaciones que puedan haber entre la cantidad de ADN libre circulante y características del tumor como genotipo, tamaño, angiogénesis, anatomía y otras como la epigenética; la identificación de los tipos de tumores que liberan *cfDNA* y el estadio a partir del cual comienzan a liberar estos potenciales biomarcadores⁽²¹⁾.

Los tumores, mamarios o de cualquier tipo, son biológicamente diversos. Según El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) existe una gran variación entre los tipos de cáncer al comparar su ADN, ARN y niveles epigenéticos (hipermetilación e hipometilación, entre otros). Esta variación no solo se da entre tejidos, si no dentro de un mismo tejido. No hay que olvidar que el microambiente tumoral y el sistema inmune contribuyen a la evolución y letalidad del tumor. Es por ello que se afirma que una población de pacientes de cáncer, así sea del mismo tipo, se comporta como si fuera un conjunto de enfermedades heterogéneas, muy personalizadas⁽²¹⁾.

Este comportamiento constituye un reto para identificar a los posibles biomarcadores sensibles y específicos para un tipo de cáncer. Los estudios realizados hasta el momento, así como en la presente investigación, comparten limitaciones como un número de muestra pequeño y utilizar diferentes técnicas para medir el *cfDNA* que no son comparables entre sí, ya sea por el fundamento de la técnica usada, el origen de la muestra estudiada, los cebadores y sondas diseñados, aspectos que introducen fuentes de variación que dificultan las comparaciones y los metaanálisis⁽²¹⁾.

Para que un análisis de ADN libre circulante sea útil en la práctica clínica debe probar su sensibilidad, especificidad y valor predictivo en poblaciones definidas y diferentes. Es necesario que el test sea altamente específico debido a la baja proporción de casos nuevos de cáncer en la población, que es menos del 1% al

año para un tipo tumoral cualquiera. Además, se debe considerar las alteraciones somáticas que ocurren en los tejidos en función de la edad. Si se consiguiera caracterizar los patrones biológicos de cada tipo tumoral, será posible identificar con una biopsia líquida dónde se aloja el incipiente tumor⁽⁴⁸⁾.

Al contrario que la diversidad observada en las variaciones genómicas, se espera que las variaciones epigenéticas tengan menor variabilidad y sean compartidas por más pacientes. Para confirmar las variantes que definan el cáncer, también deben estudiarse grandes números de controles sanos. Además, se deben realizar estudios longitudinales de tipo cohorte para determinar las variaciones genéticas y epigenéticas que llevan al cáncer en el largo plazo, además de distinguir a los falsos positivos de los verdaderos positivos⁽²¹⁾.

Para conocer los patrones de metilación en diferentes genes y regiones reguladoras de la expresión de los tumores mamarios, puede emplearse el secuenciamiento de próxima generación (NGS), que permite evaluar diferentes lugares del genoma utilizando lecturas de secuencias cortas y amplificadas muchas veces, capaz de detectar mutaciones de frecuencias muy bajas (1% del total del cfDNAs) a diferencia del secuenciamiento Sanger que necesita una concentración de muestra inicial mayor. Particularmente, el NGS debe tener una sensibilidad muy alta (y por lo tanto más costosa) para poder capturar la variación de las pocas moléculas de *cfDNA* tumoral en una mayoría de moléculas de *cfDNA* normal⁽²¹⁾.

Debido a la baja concentración de los fragmentos que contengan al gen de interés en el total de los fragmentos del *cfDNA* extraído del paciente, es conveniente bioaumentar la masa de *cfDNA* inicial, que se logra con ayuda de kits comerciales. Actualmente, el costo de estas técnicas tiende a volverse cada vez más accesible conforme la tecnología NGS es adquirida por más centros de investigación. La migración a estudios empleando NGS es progresiva, siendo el ensayo MethyLight la técnica más usadas para buscar biomarcadores en el ADN circulante hasta el momento⁽²¹⁾.

Por ello, es necesario mejorar la especificidad de los biomarcadores estudiando la hipermetilación del ADN que tiene la ventaja de ocurrir en las islas CpG, regiones específicas del genoma aptas para el diseño de paneles. Al igual que con las mutaciones genéticas, es posible detectar las alteraciones epigenéticas (metilación) en el ADN circulante plasmático que tiene origen tumoral, por lo que en los últimos años se ha convertido en un objeto de estudio importante para el desarrollo de un test epigenético no invasivo a partir de una biopsia líquida⁽⁶⁾.

Cuantificación de la metilación en ADN libre circulante (cfDNA)

La importancia de las islas CpG en la regulación transcripcional es tal que la 5-metilcitosina es considerada la “quinta base” del ADN. Actualmente se investigan estas citosinas metiladas como biomarcador de diagnóstico en cáncer, aplicaciones de prueba tamiz, posibilidad de determinación de tratamiento, supervivencia y monitoreo del paciente con miras a implementarse en la práctica clínica⁽⁴⁹⁾.

Sin embargo, no todos los nucleótidos CpG tienen las citosinas metiladas. Esta variación provee información de donde y cuando se da la expresión del gen en el caso de islas CpG en la región promotora). A esta variación se le conoce como patrones de metilación y son establecidos durante el desarrollo embrionario y mantenidos durante la diferenciación celular, adquiriendo patrones propios en los tejidos diferenciados como una forma de establecer y restringir funciones. Son justamente estos patrones normales de expresión y no expresión los que presentan variación en las células tumorales⁽⁵⁰⁾.

Como toda modificación epigenética, la metilación no cambia la secuencia del ADN. Por tanto, es necesario generar este cambio de forma artificial para estudiar las citosinas metiladas y diferenciarlas de las que no lo están, de forma confiable y reproducible. Para estudiarlos, se utilizan tres métodos principales: Digestión diferencial usando enzimas de restricción, que no cortan las secuencias metiladas; Fragmentación del ADN sensible a químicos; y sensibilidad diferencial a una conversión química. Es este último método uno de los más difundidos y se conoce como “Conversión por sales de Bisulfito”⁽⁵⁰⁾.

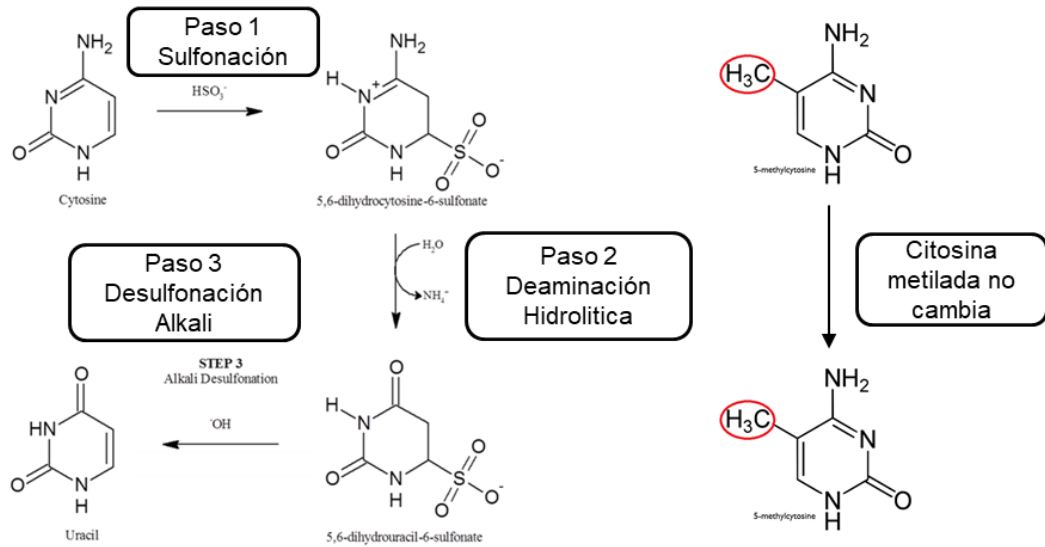
Esta técnica fue descrita inicialmente por Frommer *et al.* en 1992, siguiendo luego modificaciones hasta llegar a los kits comerciales expendidos actualmente. La conversión por bisulfito se ha convertido en el estándar para analizar la metilación, definiendo la presencia del grupo metilo en el carbono 5 para cada citosina en el genoma. El fundamento parte de la reacción química selectiva que tienen las sales del bisulfito de sodio con la citosina sin metilar, que no sucede con la 5-metilcitosina. Para que la reacción suceda, el ADN debe estar en hebra simple (denaturado), siendo imposible realizar esta conversión en ADN de doble hebra⁽⁵⁰⁻⁵²⁾.

Este proceso se fundamenta en la semejanza química entre la base nitrogenada citosina y el uracilo, presente en el ARN en lugar de la timina. La reacción de conversión de la citosina en uracilo involucra cinco pasos: La denaturación total del ADN en hebras simples lograda con temperatura a 95°C; la reacción de las sales de bisulfito con el enlace de los carbonos 5-6 de la citosina sin metilar que produce una citosina sulfonada derivativa; la deaminación hidrolítica de la citosina sulfonada para producir un uracilo sulfonado derivativo; y finalmente la remoción de este grupo sulfonado para obtener uracilo⁽⁵⁰⁾.

La duración de este proceso toma 6 horas en los kits comerciales, pudiendo extenderse para asegurar la completa conversión de las citosinas no metiladas. Las citosinas metiladas son insensibles a este proceso y permanecen como citosinas. Al final de la conversión, se generan hebras simples que no son complementarias (esto debido que los uracilos se oponen a las guaninas)⁽⁵⁰⁾. En la figura 4 se aprecia una versión simplificada de este proceso.

Por este motivo, para amplificar este ADN, deben diseñarse cebadores y sondas específicos para una de las hebras. Durante la PCR, los uracilos son amplificados como timinas y las 5-metilcitosinas son amplificadas como citosinas. Para determinar el estado de metilación, este producto de PCR (ADN de doble hebra estable) debe ser secuenciado por Sanger o analizado por ensayo Methylight en una PCR tiempo real^(11,50).

A. Conversión del ADN por sales de bisulfito



B. Detalle del cambio de secuencia en la hebra simple de ADN



C. Diseño de cebadores y sonda específicos de metilación

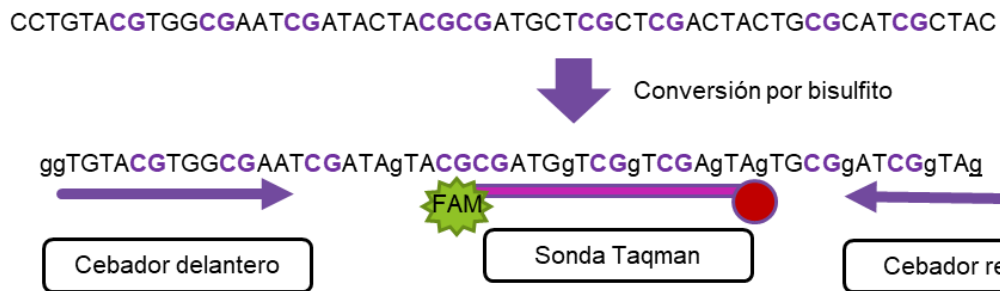


Figura 4. Conversión por sales de bisulfito para estudio del promotor metilado

A. Las citosinas cambian a uracilo como resultado de la conversión por sales de bisulfito. Las citosinas metiladas se mantienen. **B.** Este proceso genera dos hebras simples no complementarias que tendrán secuencias diferentes dependiendo de la metilación de las islas CpG. **C.** Los cebadores y sonda específicos de metilación son diseñados teniendo en cuenta una de las dos hebras y la presencia de las citosinas metiladas. *Adaptado de: A.Eads et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids. 2000; B. Dallol A. et al. Analysis of DNA Methylation in FFPE Tissues Using the MethyLight Technology. In: Al-Mulla F, editor. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 191–204.*

Dentro de las limitaciones de la conversión por bisulfito, la integridad del ADN plantilla influye en los resultados obtenidos. Al trabajar con ADN proveniente de tumores embebidos en parafina o de ADN libre circulante, estos ADN poseen una alta fragmentación, que se agrava con el tratamiento químico de las sales de bisulfito. Es necesario realizar un diseño de cebadores para generar un amplicón de tamaño no mayor a 200 pares de bases para maximizar la probabilidad de hallar la plantilla de ADN convertido que se desea estudiar⁽⁵³⁾.

El ADN convertido por bisulfito es muy sensible a la degradación, por lo que debe ser almacenado a -80°C en lo posible, consiguiéndose almacenar estable durante un mes a 4°C. El ADN convertido por bisulfito puede almacenarse un año a -20°C, consideración apropiada para mantener muestras de estándares comerciales 100% metiladas convertidas por bisulfito. En lo posible, debe de evitarse procesos de congelación y descongelación. En suma, es recomendable analizar este ADN en el tiempo más breve posible a la conversión para obtener los valores más confiables⁽⁵³⁾.

El diseño de los cebadores y las sondas es lo que distingue al ensayo MethyLight de las otras técnicas utilizadas para el estudio de secuencias metiladas. Su principal ventaja es poder medir de forma cuantitativa la metilación, debido a que los niveles bajos de metilación pueden encontrarse debajo del umbral de silenciamiento genético, y por lo tanto, carecer de significancia biológica, lo cual aumenta el riesgo de dar falsos positivos, como es el caso de la PCR específica de metilación cualitativa (PCR-MSP en sus siglas en inglés)⁽⁴⁹⁾.

El ensayo MethyLight es ampliamente utilizado para determinar el porcentaje de metilación del promotor (PMR en sus siglas en inglés) de un gen de interés. Esta técnica permite procesar varias muestras simultáneamente con relativa sencillez y es promisorio para el diagnóstico clínico molecular. La metodología comprende el uso de cebadores específicos para la secuencia del promotor de un gen de interés metilado y una sonda *Taqman* marcada con colorantes como VIC o FAM para detectar la amplificación en un termociclador de tiempo real. La amplificación del promotor del gen a estudiar debe ser comparada con la concentración de un gen de referencia, como *ALU*, *COL2A1* o *ABL*^(11,49).

El fundamento del MethyLight semicuantitativo es el siguiente: el diseño de los cebadores y la sonda para la PCR se realiza a partir de la secuencia teórica completamente metilada y convertida por bisulfito, en las que todas las islas CpG se han conservado exitosamente. Programas en línea como MethPrimer son muy útiles para estos fines. El juego de cebadores y sonda resultante reportaran solo una de las hebras del ADN (recordar que el cambio en la secuencia produce hebras no complementarias) donde se amplifica un amplicón metilado ideal en el que todas las islas CpG se encuentran metiladas y se mantienen como citosinas luego de la conversión de bisulfito⁽⁵⁴⁾.

Sin embargo, durante la amplificación se ha reportado que cada isla CpG resulta en dos diferentes variaciones de la secuencia, que dependen de si el sitio particular se encontraba metilado (C-citosina) o no (U-uracilo). Por ejemplo, si la sonda abarca tres islas CpG, el número posible de variantes de esa pequeña secuencia luego de la conversión de bisulfito es de $2^3=8$ especies diferentes. Tratándose de una PCR específica para metilación cuantitativa, tanto los cebadores como las sondas abarcan desde una a múltiples islas CpG, por lo que amplificarán las especies que conservan los sitios metilados incluidos dentro de los cebadores y las sondas, pudiendo ser flexibles en las islas CpG fuera de estos oligonucleótidos⁽¹¹⁾.

Otro aspecto a considerar es que la eficiencia de la PCR cambia con el contenido de citosinas y guaninas del cebador diseñado, pudiéndose favorecer la amplificación de determinadas secuencias por encima de otros diseños de cebadores. Esto se debe a que el ADN metilado, al tener un mayor contenido de citosinas en su secuencia, tiene una mayor temperatura de fusión o *melting* (T_m por sus siglas en inglés). Esta característica afecta la eficiencia de la PCR, que preferentemente amplificará una plantilla de ADN sin metilar^(49,53,55).

Este sesgo varía de acuerdo a la zona de la isla CpG que se consideró para el diseño de los cebadores y la sonda, además de si se utilizó la hebra sentido o antisentido del ADN, pues una vez que se produce la conversión del ADN por sales de bisulfito se producen dos secuencias que ya no son complementarias.

Esto resulta en una fuente de variabilidad entre los diferentes trabajos publicados que puede atribuirse al sesgo existente entre los diferentes juegos de cebadores y sondas diseñados para el ensayo MethyLight⁽¹⁶⁾.

De acuerdo con el diseño del ensayo MethyLight según Dallol et al. es necesario contar con los cebadores y sondas específicos para metilación a una concentración de 100uM cada uno. Este juego de oligonucleótidos diluidos a una concentración de trabajo de 10uM pasará a llamarse la mezcla cebador-sonda (Primer Probe Mix – PPM en sus siglas en inglés). Además, es necesario adquirir controles de reacción para demostrar la especificidad y la sensibilidad de la reacción⁽¹⁰⁾.

El control 100% metilado convertido por bisulfito, para elaborar la curva estándar utilizada para la cuantificación absoluta del número de copias del amplicón de interés y para demostrar la amplificación positiva del juego de sondas y cebadores de cada gen de estudio; El control 100% No metilado convertido por bisulfito es necesario para demostrar la especificidad del gen de referencia (*COL2A1*, *ABL*, *Alu*) que está diseñado en una región insensible a la metilación y debe amplificar también esta secuencia, también llamado “E”. El último control de especificidad es el “F” que contiene ADN genómico no convertido por bisulfito, que no debe amplificar en ningún caso. Finalmente, como toda reacción de PCR debe contar con un blanco o tubo sin ADN plantilla (NTC por sus siglas en inglés) para verificar la ausencia de contaminantes en los reactivos⁽¹⁰⁾.

La cuantificación absoluta de la metilación de los genes de interés se realiza al determinar el número de copias inicial del amplicón de interés a partir de una curva estándar de un gen de referencia como *COL2A1*. Ubicado en el cromosoma 12, este gen codifica la proteína “Cadena 1 alfa del pro colágeno tipo II” conocida también con los nombres AOM, ANFH, y COL11A3^(56,57).

La proteína codificada forma una fibra de colágeno que mantiene la estructura de los tejidos conectivos, como pueden ser el cartílago hialino, los discos intervertebrales, el humor vítreo del ojo y el oído interno. Estudios anteriores han relacionado mutaciones de este gen con las colagenopatías de tipo II, para las

que se da diagnóstico clínico-molecular. Entre las enfermedades relacionadas a este gen se encuentran la acondrogénesis, la displasia de Kniest, el síndrome Stickler tipo I y otras, que comparten sintomatologías asociadas a baja estatura, problemas oculares y pérdida de audición⁽⁵⁸⁾.

Este gen fue evaluado por primera vez como gen de referencia para el cálculo del PMR, como gen de referencia endógeno, compararon su eficacia con la beta-actina (*ACTB*), para normalizar la cantidad basal de ADN de la muestra a estudiar. El fragmento diseñado por Widschwendter et al., se ubica en el intrón 19-20 en la cadena antiparalela del gen⁽⁵⁹⁾.

Luego de la conversión de bisulfito, se originan cambios en ambas cadenas de ADN que no las hacen complementarias, por lo que los cebadores diseñados son específicos de una de las cadenas elegidas. Al comparar la eficiencia de *COL2A1* con otro gen normalizador como *ACTB*, las varianzas en el PMR fueron mayores con *ACTB*, por lo cual concluyen que *COL2A1* sería un control superior para normalizar el ADN. El uso de *COL2A1* como gen normalizador se ha extendido a manuales de la técnica MethyLight y es ampliamente utilizado en trabajos recientes^(18,59).

Los cebadores utilizados, al situarse en una región intrónica, no presentan islas CpG y por tanto es indiferente a la metilación del ADN. El amplicón resultante tiene una longitud de 92 pares de bases, que es reportado por la sonda marcada con FAM tanto en el ADN completamente metilado como en el ADN que está sin metilar. Es importante mencionar que la sonda de la bibliografía tiene un error en la secuencia, en el que se omite una citosina en el nucleótido número 28, que al parecer se originó en una versión antigua de la secuencia del gen pero que no afecta la función de reportero de este oligonucleótido⁽⁵⁹⁾.

Se escogió este gen para tener resultados comparables con los publicados por otros autores, sin embargo, recientemente se ha recomendado utilizar el marcador *ALU*, ampliamente repetido en el genoma, como gen normalizador por no ser influenciado por duplicaciones o deleciones génicas presentes en los tumores dada su inestabilidad cromosómica⁽¹⁰⁾.

La disposición de las muestras en el ensayo MethyLight varía de acuerdo al termociclador utilizado. Sin embargo, se debe respetar la disposición mínima como se muestra en la figura 6 para estudiar tres genes de interés en un lote de 8 muestras:

- Curva de calibración con el gen de referencia (*COL2A1* en este caso) con cuatro puntos (A,B,C y D) por triplicado
- Controles de especificidad “E”, “F” y “NTC” para el gen *COL2A1*
- ADN libre circulante convertido por bisulfito de cada muestra para gen de referencia *COL2A1*, con el que se obtiene el ADN plantilla amplificable de la muestra luego de la conversión de bisulfito. A esta cantidad obtenida para cada muestra se le llamara “C”.
- Control “D” (ADN control 100% metilado convertido por bisulfito) para el gen *COL2A1* por duplicado
- ADN libre circulante convertido por bisulfito de cada muestra para cada gen de estudio (*RARB2RARB2*, *SFRP1*, *GSTP1*) que será comparado con la curva de calibración de *COL2A1* para obtener la concentración de ADN metilado del gen de interés. A esta cantidad obtenida para cada muestra se le llamara “A”.
- Control “B” (ADN control 100% metilado convertido por bisulfito) para cada gen de estudio (*RARB2RARB2*, *SFRP1*, *GSTP1*) por duplicado. A esta cantidad obtenida para cada muestra se le llamara “B”

Para obtener el porcentaje de promotor metilado (PMR) de cada muestra se utilizan los valores “A, B, C y D” en la formula descrita en la figura 5.

El programa de amplificación debe ser el mismo para los cuatro genes que entran en el estudio, por lo que la estandarización previa es importante. Al final de la amplificación, deben obtenerse curvas con formas sigmoidales, características de una correcta amplificación. El ciclo umbral (Ct en sus siglas en inglés) es calculado automáticamente por el equipo con ayuda de la curva de calibración y el establecimiento de una línea umbral.

Este umbral será cruzado por las muestras en el número de ciclos necesario para que la fluorescencia de la sonda TaqMan, marcada con el colorante FAM (verde), supere el porcentaje del fondo y pueda considerarse como una amplificación positiva. El ciclo en el que ocurre esto es conocido como Ct de la muestra e idealmente debe estar entre los ciclos 20 a 30 de la amplificación (10). Para muestras fragmentadas como el cfDNA convertido por bisulfito, el Ct suele encontrarse entre los ciclos 30 y 40. Una muestra que amplifique marcando un Ct mayor a 45 ciclos es considerada como una amplificación inespecífica o aberrante y no es considerada dentro del estudio. En la Figura 6 se muestran las curvas ideales obtenidas en el ensayo MethyLight para poder calcular el PMR de cada muestra⁽¹⁰⁾.

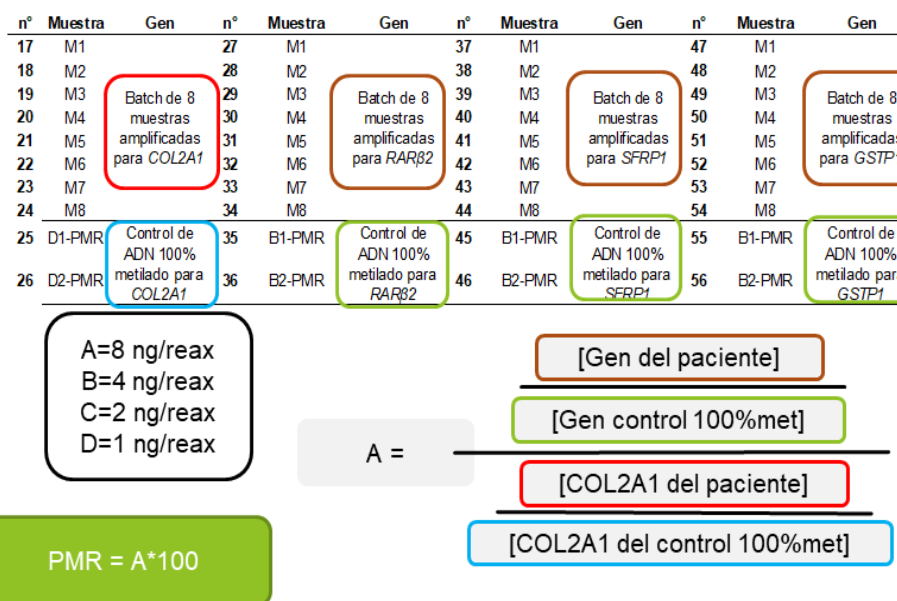
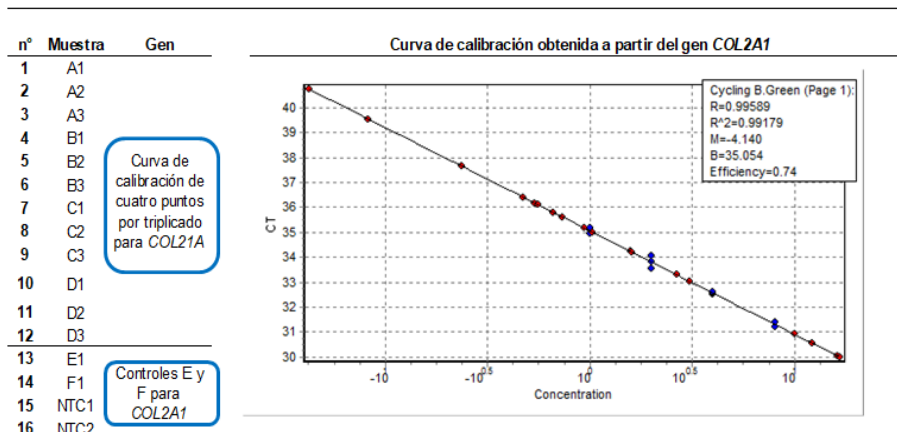


Figura 5. Esquema de Ensayo MethyLight para ocho muestras en Rotor Gene Q

Muestras 1-12: Curva de calibración en base al gen de referencia (COL2A1) y un control comercial 100% metilado convertido por bisulfito. **Muestras 13-16:** Los controles E (ADN 100% no metilado convertido por bisulfito), F (ADN genómico no convertido por bisulfito) y NTC (mix MethyLight sin ADN) son incluidos para validar la especificidad de la reacción. El set de ocho muestras a analizar se incluye en los tubos siguientes para cada gen, comenzando por el gen de referencia COL2A1 y los genes de estudio para cada muestra (RARβ2, SFRP1, GSTP1). Cada gen es validado con su control de reacción (sensibilidad) por duplicado con ADN 100% metilado convertido por bisulfito (D1-PMR para COL2A1 y B1-PMR para los genes estudiados). Finalmente, el PMR de cada muestra se obtiene con la formula descrita por Eads *et al.*

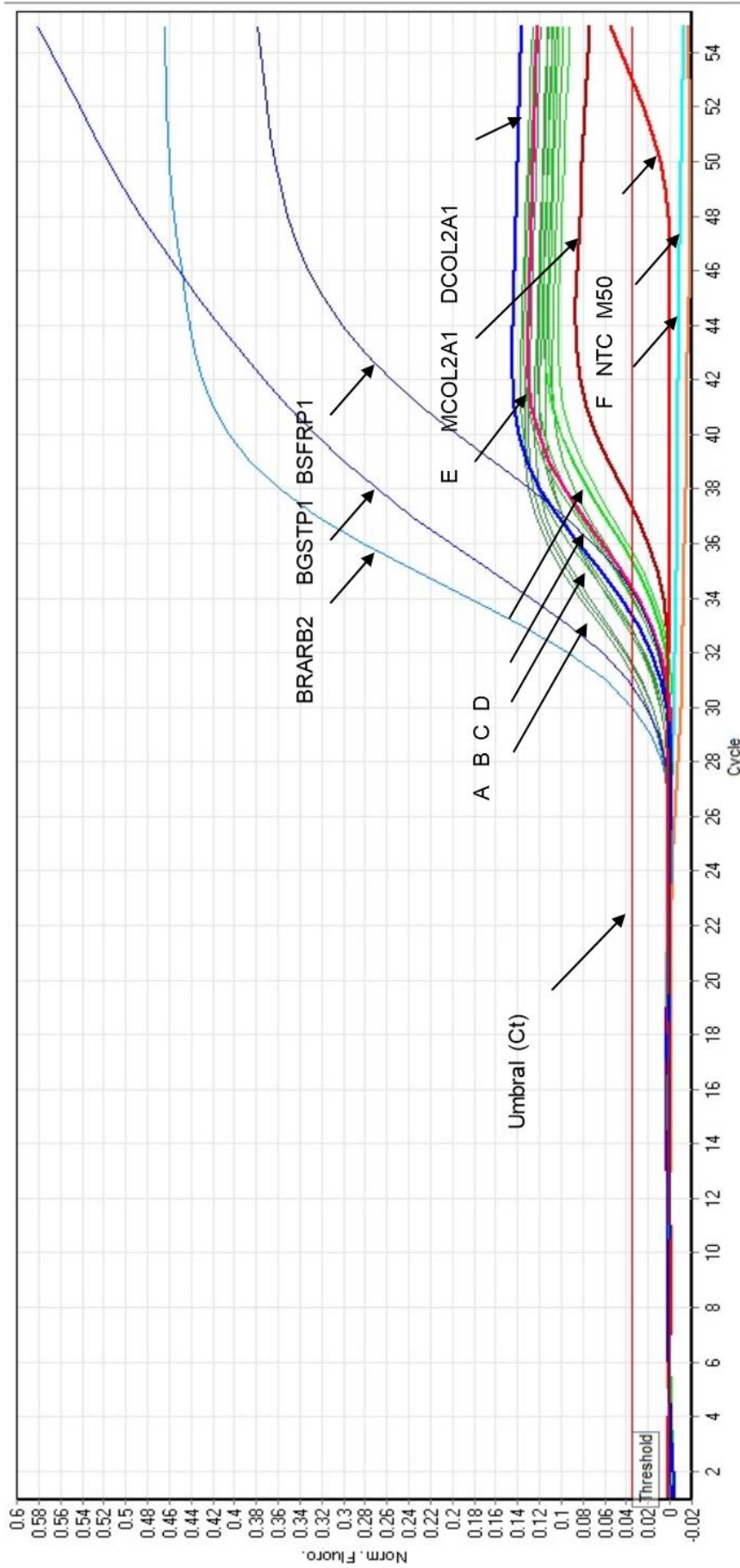


Figura 6. Amplificación de una muestra en un ensayo MethyLight ideal en Rotor Gene Q

La amplificación de los controles de reacción y las muestras se muestran como curvas coloreadas en la imagen. **A:** 8ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde; **B:** 4ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde; **C:** 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde; **D:** 1 ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde. **E:** 2 ng/reax de ADN 100% NO metilado convertido por bisulfito en anaranjado. **F:** 2 ng/reax de ADN 100% NO metilado NO convertido por bisulfito en anaranjado. **NTC:** control sin ADN en celeste. **M COL2A1:** muestra amplificada para gen COL2A1 que cruza el umbral antes de los 50 ciclos. **M50:** muestra que amplifico para COL2A1, SFRP1, RARB2 luego de los 50 ciclos de amplificación (en rojo). **RARB2:** 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen RARB2 en celeste; **B GSTP1:** 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen GSTP1 en añil; **SFRP1:** 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen SFRP1 en azul; **Ct:** ciclo umbral determinado por la curva estándar en el que las amplificaciones negativas deben romper en un solo punto antes de los 50 ciclos de reacción.

Una ventaja única del ensayo Methylight es la naturaleza de los datos. Se genera una mezcla de valores discretos (PMR= 0 producto de las muestras que no amplificaron) y valores variables que corresponden a las muestras que presentaron el promotor metilado. Estos valores de PMR son medidas continuas. Es posible obtener información de ambos tipos de datos, especialmente de los valores de PMR pues estos pueden revelar el grado de asociación del marcador de metilación con variables de estudio como edad, estado hormonal, estadio tumoral, etc⁽⁶⁰⁾.

El PMR es un valor que no se distribuye normalmente, por lo que se analiza usando pruebas estadísticas no paramétricas. En el ensayo Methylight se cumple que a mayor concentración de ADN metilado, mayor será el valor obtenido de PMR. La cantidad y la calidad del ADN y su grado de conversión de bisulfito pueden variar entre muestras. En teoría, este valor no debe superar el 100%, pero se han reportado casos en los que se han obtenido valores mayores. La distribución del PMR es bimodal, (PMR \leq 1% o PMR >10%) con muy pocos casos que muestren valores de PMR entre 3% y 5%, estableciéndose el valor de corte en 4%. Solo es necesario una sola corrida de Methylight para determinar el estado de metilación del promotor génico y es altamente reproducible, pues muestra poca variación entre las repeticiones de bisulfito y entre ensayos con diferencia de días⁽⁴⁹⁾.

La comparación con ensayos inmunohistoquímicos muestra que la expresión de la proteína disminuye significativamente con valores de PMR mayores a cuatro, por lo que se asocia los valores altos de PMR a una pérdida de la expresión genética debido a la metilación o silenciamiento del gen. Sin embargo, existen casos infrecuentes en los que se evidencia pérdida de la expresión en ausencia de metilación del promotor y casos con un PMR mayor a diez que muestran expresión normal de la proteína. Ello sería prueba de la existencia de otros mecanismos de silenciamiento genético que pueden asemejarse a la metilación parcial o mono alélica, o bien a la delección o mutación genética⁽⁴⁹⁾.

1.3. Definición de términos básicos

Acetilación: Reacción que introduce un grupo funcional acetil en un compuesto orgánico. Des-acetilación es el proceso contrario. La acetilación es una modificación química post-translacional de las histonas, tubulinas y el supresor de tumores p53⁽²⁸⁾.

Cromatina: Complejo de ADN y proteínas que constituye los cromosomas. La cromatina condensa el ADN de forma que quepa en el interior del núcleo, organiza la mitosis y la meiosis y controla la expresión génica. Los cambios en la estructura de la cromatina se dan por la metilación del ADN y las modificaciones de histonas⁽²⁸⁾.

DNA metil-transferasas: Familia de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo metilo al ADN, se comporta como donador del grupo metilo la S-adenosil metionina⁽²⁸⁾.

Epigenética: Se define como los diferentes estados fenotípicos de la expresión genética que no están determinados por un cambio en la secuencia del ADN y que por esta razón son potencialmente reversibles, pero pueden mantenerse estables durante la división celular. Comprende fenómenos como los estados alternados de condensación de la cromatina, la composición de las proteínas asociadas al ADN, la modificación de histonas y la metilación de las islas CpG en el caso de mamíferos⁽¹³⁾.

Epigenoma: Estado epigenético general de una célula⁽²⁸⁾.

ER: Receptor de estrógeno en la membrana celular que promueve el crecimiento tumoral en el cáncer de mama⁽²⁸⁾.

HER2: Codificado por el gen ERBB2 (Receptor de tirosin kinasa 2 erb-b2) tiene múltiples nombres en la literatura, siendo uno de los más difundidos el de "Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano". Esta proteína kinasa se encuentra sobre expresado en los adenocarcinomas⁽²⁸⁾.

Histona: Componente principal de la cromatina. El núcleo de histonas, compuesto por las subunidades H2A, H2B, H3 y H4, se ensamblan para formar el nucleosoma⁽²⁸⁾.

Impronta genómica: Proceso de marcaje epigenético de un locus basado en su procedencia parental, que resulta en una expresión genética mono alélica⁽²⁸⁾.

Islas CpG: Sectores del ADN ricos en dinucleótidos CpG en sentido 5'→3'. La notación “p” hace referencia al enlace fosfodiéster entre la citosina y la guanina. Estas islas se encuentran en aproximadamente el 40% de los promotores humanos⁽²⁸⁾.

Metilación del ADN: Definido por la presencia de un grupo metilo en el carbono 5 de una citosina que se encuentra al lado de una guanina en el sentido 5' a 3' de la hebra de ADN. La metilación suprime la expresión génica y promueve la unión de proteínas represoras y bloquea a los factores de transcripción. Estos cambios epigenéticos se pueden propagar durante la replicación celular debido a la secuencia CpG es palíndroma y la metilación presente en ambas hebras complementarias se utiliza como un marcador del estado epigenética de un locus pues puede ser identificado como MS-PCR⁽¹³⁾.

Neoadyuvancia: Primer tratamiento administrado al paciente que busca reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía. Puede ser quimioterapia, radioterapia y/o terapia hormonal⁽²⁸⁾.

PR: Receptor de progesterona en la membrana celular que promueve el crecimiento tumoral en el cáncer de mama⁽²⁸⁾.

PMR: Ratio de metilación del promotor expresado en porcentaje⁽¹⁰⁾.

Transposones: Secuencias de ADN que tienen la facultad de moverse por el genoma de una célula. El proceso llamado transposición genera cambios en la organización del ADN y mutaciones en el genoma⁽²⁸⁾.

Tratamiento por bisulfito: Técnica que trata el ADN con bisulfito de sodio para determinar su patrón de metilación. Esta técnica modifica las citosinas a uracilo, pero deja sin cambio a las citosinas metiladas. En la presente tesis se realizó con el kit Epiect Bisulfite de Qiagen⁽⁵²⁾.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la hipótesis

Hipótesis general

Los niveles de metilación en los promotores de los genes *SFRP1*, *GSTP1* y *RARβ2* en el ADN libre circulante en plasma (biopsia líquida) están asociados con el cáncer de mama en mujeres de una muestra de ONCOSALUD-AUNA durante el periodo 2016-2017.

Hipótesis específicas

El nivel de metilación en los promotores de los genes *SFRP1*, *GSTP1* y *RARβ2* en el ADN libre circulante en plasma (biopsia líquida) está asociado con las características clínico patológicas de los pacientes y controles.

El nivel de metilación en los promotores del conjunto de genes estudiados en el ADN libre circulante en plasma (biopsia líquida) está asociado con el cáncer de mama.

El nivel de metilación en los promotores del conjunto de genes estudiados en el ADN libre circulante en plasma (biopsia líquida) está asociado con las características clínico patológicas de los pacientes y controles.

El nivel de metilación en los promotores de los genes *SFRP1*, *GSTP1* y *RARβ2* puede ser utilizado como biomarcador de biopsia líquida en la práctica clínica.

2.2. Variables y su operacionalización

Tabla 1. Variables del estudio y su operacionalización

Variable	Definición	Tipo de Variable según su naturaleza	Tipo de Variable según su relación	Indicador o definición operativa	Escala de medición	Categorías	Valores de las categorías	Medio de Verificación
Cáncer de mama	Presencia de tumor mamario en cualquier estadio	Cualitativa	Independiente	Presencia de tumor mamario diagnosticado por patología	Nominal	Negativo Positivo	0. Negativo 1. Positivo	Historia Clínica
Metilación del promotor de los genes <i>RARB2</i>, <i>GSTP1</i> y <i>SFRP1</i>	Porcentaje de metilación del promotor respecto a un gen de referencia (<i>COL2A1</i>)	Cuantitativa continua	Dependiente	100 veces la ratio de metilación (GEN/COL2A1) de cada muestra entre la ratio (GEN/COL2A1) del control de metilación	Porcentaje	No Metilado Metilado	0.PMR=0 0.PMR<4 0.PMR<10 1.PMR ≠0 1.PMR≥4 1.PMR≥10	Ensayo Methylight

Tabla 2. Covariables del estudio y su operacionalización

Variable	Definición	Tipo de Variable según su naturaleza	Tipo de variable según su relación	Indicador o definición operativa	Escala de medición	Categorías	Valores de las categorías	Medio de Verificación
Edad	Tiempo vivido al momento del análisis	Cuantitativa	Independiente	Fecha de nacimiento menos fecha de análisis	Razón	Rango		Historia Clínica
Estado Hormonal	Estado menstrual al momento del diagnóstico o ingreso al estudio	Cualitativa	Independiente	Estado Menstrual	Nominal	Pre menopausia Postmenopausia	0.Premenopausia 1.Postmenopausia	Historia Clínica
Masa de ADN inicial	Masa de ADN libre circulante (ng) utilizados para el estudio	Cuantitativa continua	Independiente	Nanogramos de ADN circulante extraídos de 1 ml de plasma sanguíneo	Razón	Rango		Medición con Nanodrop
COL2A1 (ng/reax)	Concentración de COL2A1 amplificado en la reacción Methylight	Cuantitativa continua	Independiente	Nanogramos de COL2A1 amplificados en la reacción Methylight	Razón	Rango		Cuantificación con curva estándar
Estadio tumoral	Estadio de proliferación tumoral	Cualitativa	Independiente	Determinado por centro de atención según escala TNM Estadio I, II, III o IV	Ordinal	I, II, III, IV	1. I 2. II 3. III 4. IV	Historia Clínica
Estadios iniciales y finales	Estadio de proliferación tumoral categorizado	Cualitativa	Independiente	Categorización de estadios en iniciales y finales	Ordinal	Iniciales (I y II) Finales (III y IV)	0. Iniciales (I y II) 1. Finales (III y IV)	Historia Clínica
ER	Bioquímica	Cualitativa	Independiente	Fluorescencia Inmuno-Histoquímica	Nominal	Positivo Negativo	1.Positivo 0.Negativo	Historia Clínica
PR	Bioquímica	Cualitativa	Independiente	Fluorescencia Inmuno-Histoquímica	Nominal	Positivo Negativo	1.Positivo 0.Negativo	Historia Clínica
HER2	Bioquímica	Cualitativa	Independiente	Fluorescencia Inmuno-Histoquímica	Nominal	Positivo Negativo	1.Positivo 0.Negativo	Historia Clínica
Conteo de Linfocitos	Número de células en ul de sangre	Cuantitativa	Independiente	Número de células en ul de sangre	Razón	Rango		Historia Clínica
Glucosa en sangre	mg de Glucosa en un dl de sangre	Cuantitativa	Independiente	mg de Glucosa en un dl de sangre	Razón	Rango		Historia Clínica
Grupo sanguíneo	Tipo de antígeno en el sistema AB0	Cualitativa	Independiente	Reacción de aglutinación positiva	Nominal	A, B, O, AB	1. O 2. A 3. B 4. AB	Historia Clínica

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Tipos y diseño

Estudio de tipo analítico, observacional, caso y control.

Observacional: debido a que no existió intervención del investigador y los datos obtenidos fueron el reflejo de un estado fisiológico, biológico intrínseco del sujeto de investigación.

Analítico relacional: Debido a que se planteó hipótesis de asociación entre las variables de estudio que se comprobaron mediante análisis bivariados y por análisis multivariable.

Caso y control: Se identificó a personas voluntarias con la enfermedad (cáncer de mama) y se los comparó con un grupo control conformado por mujeres supuestamente sanas del mismo grupo etario, que fueron evaluadas por despistaje como parte del programa ONCOSALUD-AUNA. El diseño experimental incluyó mujeres de 40 años o más, realizándose pareamiento por edad entre los controles y pacientes.

3.2. Diseño muestral

Población universo

Todas las mujeres que asisten a consulta de despistaje de cáncer de mama en ONCOSALUD-AUNA.

Población de estudio

Mujeres mayores de 40 años diagnosticadas con cáncer de mama en cualquier estadio. El grupo control estuvo conformado por mujeres sin cáncer de mama confirmado por mamografía y pareadas por edad a las pacientes.

Tamaño de la muestra

El tamaño muestral para un estudio de caso y control pareado fue calculado usando el software Epidat v.4.2 a partir de un OR de 7.85 obtenido del metanálisis de Fang et al.(15), con lo cual se fijó una muestra mínima de 50 pacientes y 50 controles para alcanzar la potencia estadística requerida del 80%.

Selección de la muestra

La selección de la muestra fue de tipo no probabilístico, debido a que se realizó un muestreo por conveniencia en la red Oncosalud - AUNA de Lima desde enero del 2016 hasta diciembre del 2017.

Criterios de selección

Criterios de Inclusión

Pacientes: mujeres aseguradas en Oncosalud – AUNA recientemente diagnosticados con cáncer de mama. Mayores de 40 años y sin tratamiento previo. Firma de consentimiento informado.

Controles: Mujeres aseguradas en Oncosalud - AUNA sin cáncer de mama que acuden a sus despistajes anuales.

Criterios de Exclusión: Paciente con tratamiento previo; mujeres menores de 40 años; no aceptación de consentimiento informado.

3.3 Procedimiento de recolección de datos

La presente investigación es un sub-estudio del proyecto principal Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfDNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento, dentro del cual figura en uno de sus hitos de desarrollo la realización de la presente tesis de maestría. El Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de San Martín de Porres otorgó la autorización para la presente investigación por medio del Oficio No. 872-2017-CIEI-USMP-CCM fechado el 17 de octubre de 2017.

Las muestras utilizadas fueron recolectadas por el proyecto principal en el periodo 2016-2017 y por tal razón no fue necesario utilizar un nuevo consentimiento informado. Todos los procedimientos que se describen a continuación estuvieron alineados con los objetivos del proyecto principal, concretamente en el objetivo secundario de encontrar biomarcadores epigenéticos.

La mamografía se recomienda como prueba tamiz de forma anual o bianual a partir de los 40 años⁽²²⁾. Escoger esta edad como criterio de inclusión al presente estudio permitió captar a las pacientes de cáncer de mama esporádico, disminuyendo la probabilidad de incluir pacientes con cáncer de mama familiar o hereditario. Debido a que la hipermetilación del promotor tendría la función de “segundo evento” desencadenante en el cáncer de mama hereditario⁽³⁰⁾, considerar controles menores de 40 años que hayan aceptado enrolarse por tener un familiar enfermo, podría introducir un sesgo, aumentando la frecuencia de controles metilados.

Respecto al estado hormonal de las participantes, se ha planteado que la exposición prolongada a estradiol y estrógenos resultaría en la acumulación de la hipermetilación en varios loci relacionados a la carcinogénesis⁽³⁴⁾. Esta exposición podría darse por el uso de anticonceptivos hormonales y factores del desarrollo hormonal de cada participante (edad de menarquia, edad de embarazo exitoso, lactancia materna) que no fueron considerados como criterios de restricción al momento de enrolarse en el estudio.

Por lo tanto, el estado hormonal se incluyó como una variable de confusión necesaria para la obtención del OR ajustado y se obtuvo a partir de la historia clínica. Se consideró a las mujeres postmenopáusicas como aquellas que no hubieran presentado menstruación en un periodo de 12 meses o más. Las mujeres pre menopáusicas fueron consideradas como las que presentaban menstruación regular o irregular dentro de los 12 meses anteriores a la fecha de colecta de la muestra.

Las muestras empleadas consistieron de una muestra de sangre en un tubo BD Vacutainer® con EDTA K2, que fue transportado hasta las instalaciones del Centro de Investigación de Genética y Biología Molecular (CIGBM), cuidándose de mantener la cadena de frío (4°C) en todo momento. El plasma de la muestra fue separado por centrifugación refrigerada y codificado para ser analizado en el laboratorio, almacenándose a -80°C. Se extrajo el ADN libre circulante (*cfDNA*) con la ayuda del *NucleoSpin Plasma XS* para los pacientes y controles. El *cfDNA* obtenido fue cuantificado con el equipo Nanodrop⁽⁶¹⁾.

Se convirtió 447.5 ± 242.6 ng de *cfDNA* con sales de bisulfito utilizando el *Epitect Bisulfite Kit de Qiagen* (52). Se utilizaron 35ul de *cfDNA* cuantificado para obtener la cantidad de ADN inicial de cada muestra. De acuerdo con las instrucciones del Kit *Epitect Bisulfite*(62) para muestras altamente fragmentadas, este fue mezclado con 5ul de agua libre de *RNAsas*, 85ul de sales de bisulfito y 15ul de *Protect Buffer* en un tubo de PCR de 0.2ml.

Se incubaron las muestras en el termociclador durante 6 horas en ciclos de 60°C y 95°C para lograr una conversión completa. Finalizado el programa, se centrifugaron las muestras para añadirles 250ul de buffer BL, se mezclaron por inversión y se le dio vórtex brevemente. Seguidamente se le añadió 250ul de etanol absoluto y toda la mezcla se colocó en la columna que estuvo guardada bajo refrigeración a 4°C. Se centrifugó a 12000 rcf (fuerza centrífuga relativa) durante un minuto y se lavó con 500ul de *Wash Buffer*.

Luego, se completó la conversión por bisulfito al añadir 500ul de *buffer de sulfonación*, se dejaron incubar las columnas con las tapas cerradas por 15 minutos. Se realizaron dos lavados con 500ul de *Wash Buffer* y se centrifugó a 12000 rcf durante un minuto. Las columnas fueron centrifugadas una vez más para eliminar cualquier residuo de líquido.

Cada columna fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5ml e incubada a 56°C por 5 minutos para eliminar cualquier residuo de etanol. Finalmente, se eluyó el ADN convertido por bisulfito en 40ul, que fueron separados en dos alícuotas de 20ul y 15ul para evitar una futura degradación por congelamiento y descongelamiento repetitivo. Las alícuotas fueron guardadas a -80°C hasta el momento de su utilización en el Ensayo MethyLight.

Con el fin de amplificar la región promotora de los genes en estudio se consideró el cambio en la secuencia una vez convertido el ADN por bisulfito de sodio. Se realizó una búsqueda bioinformática usando la base de datos epigenética del NCBI (*National Center for Biotechnology Information* por sus siglas en inglés) para identificar la región promotora de cada gen que era susceptible de metilarse

o con presencia de islas CpG. Los resultados de la búsqueda se muestran en la tabla suplementaria 1 (Tabla S1).

Las secuencias de cada gen estudiado fueron descargadas en formato FASTA e introducidas al programa *MethPrimer*⁽⁵⁴⁾ para obtener posibles pares de cebadores para la posibilidad metilada y no metilada de la misma región, así como la secuencia del oligonucleótido que sirvió de sonda *Taqman* para el ensayo MethyLight.

La idoneidad de cada pareja de cebadores y sonda se simuló mediante el software *Oligoanalyzer*⁽⁶³⁾ y para el caso de los genes *GSTP1*, *RARβ2* y *COL2A1*, se optó por utilizar los cebadores y la sonda para promotor metilado descritos en Fujita et al.⁽⁵⁾ Se diseñó la secuencia de cebadores y sonda para el promotor del gen *SFRP1* utilizando el software *MethPrimer*⁽⁵⁴⁾. Los pares de cebadores y sondas que fueron considerados para el ensayo están descritos en la tabla suplementaria 2 (Tabla S2) y se diluyeron a 100uM Stock para preparar alícuotas de trabajo a 10uM.

Cebadores y sondas se disolvieron en agua libre de nucleasas para lograr una concentración de 100uM y se almacenaron los stocks a -20°C. La preparación del mix primer-sonda 10X (PPM 10X) consta de una solución a 4uM de primer sentido, 4uM de primer antisentido y 2uM de sonda para cada juego de cebadores diseñados para un gen de estudio. Se prepararon alícuotas de 50ul para cada gen, que fueron rotuladas y protegidas con papel aluminio y almacenándose a -20°C hasta el momento de su utilización.

Preparación de controles de reacción

- **Control "E"**: Para comprobar la amplificación del gen de referencia *COL2A1*, indiferente a la metilación del ADN, en un ADN control 100% no metilado. El control E contiene ADN 100% no metilado convertido por bisulfito (stock a 10ng/ul) diluido a una concentración de 0.5 ng/ul, almacenado a -80°C hasta su utilización.

- **Control “F”:** Para asegurar la especificidad de los cebadores del gen de referencia *COL2A1*, se utiliza ADN control 100% no metilado no convertido por bisulfito (stock a 10ng/ul) diluido a 0.5ng/ul. Este control no debe amplificar en el ensayo. Almacenado a -80°C hasta su utilización.
- **Punto B/D Methylight:** Consiste en ADN control 100% metilado a una concentración de 0.25 ng/ul para ser utilizado como normalizador y control positivo de amplificación del gen de estudio. Almacenado a -80°C hasta su utilización.

Condiciones de la PCR Methylight

Se utilizó el equipo *Rotor Gene Q* de *Qiagen* con el mismo programa para la amplificación de las regiones promotoras de los genes a estudiar. La concentración de reactivos del mix de reacción y las condiciones para la amplificación se encuentran en la tabla suplementaria 3 (Tabla S3).

El ensayo Methylight fue realizado en grupos de ocho muestras que podían incluir, al azar, pacientes y controles de acuerdo al orden de llegada. Cada ensayo Methylight tuvo su propia curva de calibración a partir de una dilución seriada de ADN control 100% metilado *Qiagen* cuyo R^2 estuvo siempre por encima de 0.93, lo cual indicó una alta correlación entre los puntos.

Cada ensayo fue validado por sus controles de reacción (“E”, “F” y “NTC”) para *COL2A1* (Figura S1). Los resultados modelo de la amplificación de los genes de estudio *RARβ2*, *SFRP1* y *GSTP1* se muestran en las figuras suplementarias (Figura S2-S4).

Se obtuvieron las gráficas de amplificación positiva para *COL2A1* en todos los pacientes y controles del estudio. Esta amplificación determinó la entrada de la muestra al estudio para poder realizarse el cálculo del PMR.

Las muestras que tuvieron que ser repetidas hasta obtener amplificación positiva de *COL2A1* se muestran en la Tabla S4. En todos los casos, se procuró repetir la muestra en los días siguientes para minimizar la degradación del ADN plantilla.

Cálculo del PMR

Se obtuvieron los valores de concentración (ng/reacción) de los genes *COL2A1*, *RARβ2*, *SFRP1* y *GSTP1* para cada muestra y para los controles de reacción con ayuda del *software Rotor Gene Q Series*⁽⁶⁴⁾. Estos valores de concentración se utilizaron en la fórmula tal como figura en Dallol et al.⁽¹⁰⁾ expresada en la Figura 6. El valor de PMR de cada muestra se ingresó en una base de datos para ser comparados con las demás variables de estudio.

3.4. Procesamiento y análisis de los datos

El análisis de los datos resultantes de los procedimientos descritos en el punto anterior se realizó considerando únicamente las variables ya obtenidas por el estudio principal. Las variables brindadas por la historia clínica y consideradas para el análisis fueron “Cáncer de mama” para diferenciar entre pacientes y controles; “Edad” en años, “Estado Hormonal” que puede ser premenopáusico o postmenopáusico; Resultados positivos y negativos de la prueba inmunohistoquímica para “Receptor de Progesterona”, “Receptor de Estrógeno” y “HER2”; Conteo de Linfocitos (cel/ul); Grupo sanguíneo (A, B, O); Glucosa en sangre (mg/dl) , “Estadio tumoral” dividido en I, II, III y IV, “Estadios iniciales y finales” dividido en “Inicial” (I y II) y “Final” (III y IV).

Las variables obtenidas por el presente estudio fueron “Masa de ADN inicial” en nanogramos, “Concentración de *COL2A1*” en nanogramos en reacción y “Metilación del promotor de los genes *RARβ2*, *GSTP1* y *SFRP1*” en porcentaje de PMR.

Los valores calculados de PMR de los tres genes se obtuvieron a partir de la curva de concentración del gen *COL2A1*, los valores de Ct de cada muestra y de los controles de reacción usando la fórmula de Dallol et al⁽¹⁰⁾. Los datos fueron almacenados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel^{®(65)} con doble digitación para minimizar errores y se realizó el control de calidad mediante revisión simple para eliminar vacíos de información.

Se describieron las variables cuantitativas y cualitativas, categorizándolas con valores de “cero” y “uno” para que puedan ser analizadas con el programa STATA versión 12.0^{®(66)}.

Para determinar la asociación entre los porcentajes de metilación en los promotores de los genes *SFRP1*, *GSTP1* y *RARB2* y el cáncer de mama, se utilizaron las formas cuantitativa y cualitativa de la variable PMR. Esta variable en su forma cuantitativa continua no tiene distribución normal, por lo que se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para variables con dos categorías.

Seguidamente, se recategorizó el PMR de los tres genes de interés con los puntos de corte 4% y 10% de metilación como se ha utilizado en la bibliografía^(49,59). Se utilizó la prueba de “Regresión logística condicional de efectos fijos para casos y controles pareados” para obtener el Odds Ratio (OR) con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (IC95%). Se consideró un porcentaje de significancia del 5%. La edad y el estado hormonal se consideraron variables de confusión, por lo cual se ajustó la regresión logística teniendo en cuenta estos efectos y se obtuvo un OR ajustado.

Para determinar si los niveles de metilación en los promotores de los genes *SFRP1*, *GSTP1* y *RARB2* estaban asociados con las características clínico patológicas de los pacientes y controles, se utilizaron las formas cuantitativa y cualitativa de la variable PMR. Seguidamente, el PMR cuantitativo fue analizado con la prueba U de Mann Whitney para variables con dos categorías (edad, estado hormonal, ER, PR, HER2), la prueba Kruskal Wallis para variables con más de dos categorías (estadio tumoral, grupo sanguíneo) y la correlación de Spearman para variables numéricas como la edad, el conteo de linfocitos y otros. Este análisis se realizó por separado en los grupos de pacientes y controles.

De forma similar se procedió a estimar la asociación del PMR cualitativo y las variables clínico-patológicas de pacientes y controles. Para ello se empleó la prueba Chi-cuadrado y la Exacta de Fisher, categorizando la variable edad en su punto de corte de 55 años. Se realizó este análisis por separado en los grupos de controles y pacientes.

Para conocer si los niveles de metilación en los promotores del conjunto de genes estudiados estaban asociados con el cáncer de mama, los valores de PMR cuantitativos de los genes se ingresaron en una misma variable, considerando que no hubo ningún caso en el que una muestra amplificara para más de un gen a la vez. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para determinar la asociación a la presencia de cáncer de mama.

A continuación, se evaluó el PMR del conjunto de genes de forma cualitativa, usando los puntos de corte 4% y 10%. Se utilizó la prueba de “Regresión logística condicional de efectos fijos para casos y controles pareados” para obtener el Odds Ratio (OR) con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (IC95%). Se consideró un porcentaje de significancia del 5%. La edad y el estado hormonal se consideraron variables de confusión, por lo cual se ajustó la regresión logística teniendo en cuenta estos efectos y se obtuvo un OR ajustado.

Se determinó la asociación entre los niveles de metilación en los promotores del conjunto de genes estudiados y las características clínico patológicas de los pacientes. En el caso del PMR cuantitativo, este fue analizado con la prueba U de Mann Whitney para variables con dos categorías (edad, estado hormonal, ER, PR, HER2), la prueba Kruskal Wallis para variables con más de dos categorías (estadio tumoral, grupo sanguíneo) y la correlación de Spearman para variables numéricas como la edad, la concentración de glucosa en sangre y otros. Este análisis se realizó por separado en los grupos de pacientes y controles.

El PMR cualitativo de los genes en conjunto, con punto de corte de 4% y 10% se asoció con las variables clínico-patológicas de pacientes y controles, utilizando la prueba Chi-cuadrado y la Exacta de Fisher. Finalmente, se determinó la sensibilidad, especificidad valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) de cada marcador estudiado y del conjunto de estos. La sensibilidad y especificidad se obtuvieron con el software Epidat, mientras que el VPP y el VPN se obtuvieron con el software MedCalc, ello debido a que este software reporta el p-valor de los valores predictivos.

3.5. Aspectos éticos

La presente investigación es un subestudio del proyecto Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento que contempla el estudio epigenético (entendido como el análisis de presencia de metilación en el promotor de un gen) de los genes *RARβ2*, *GSTP1* y *SFRP1* como posibles biomarcadores. El consentimiento informado del proyecto principal fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de San Martín de Porres (IRB00003251- FWA0015320), emitido el 22 de junio del 2015 con número de oficio 826 – 2015 – CIEI – USMP – CCM.

El presente es un estudio retrospectivo y dado que las muestras utilizadas son las mismas obtenidas para el estudio principal, no fue necesario obtener nuevamente el consentimiento informado. La autorización para el desarrollo de esta tesis fue brindada por el Comité de Ética de la Universidad de San Martín de Porres, por medio del Oficio No. 872-2017-CIEI-USMP-CCM fechado el 17 de octubre de 2017.

Los objetivos y procedimientos de este proyecto de tesis estuvieron alineados con la información ofrecida en el proyecto principal. La información obtenida respecto a la metilación de los tres genes estudiados no será relacionada al pronóstico o respuesta a tratamiento de los participantes involucrados. Respecto a los riesgos y beneficios de la investigación, algunos participantes manifestaron molestias leves en el momento de la toma de muestra (pinchazo, dolor en la zona afectada).

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Para la presente investigación se reclutaron en total 67 pacientes y 71 controles, de las cuales solo 51 pacientes y 51 controles cumplieron con los criterios de inclusión (mayor a 40 años) y fueron elegibles para el ensayo Methylight. El flujo de reclutamiento se muestra en la Figura 7.

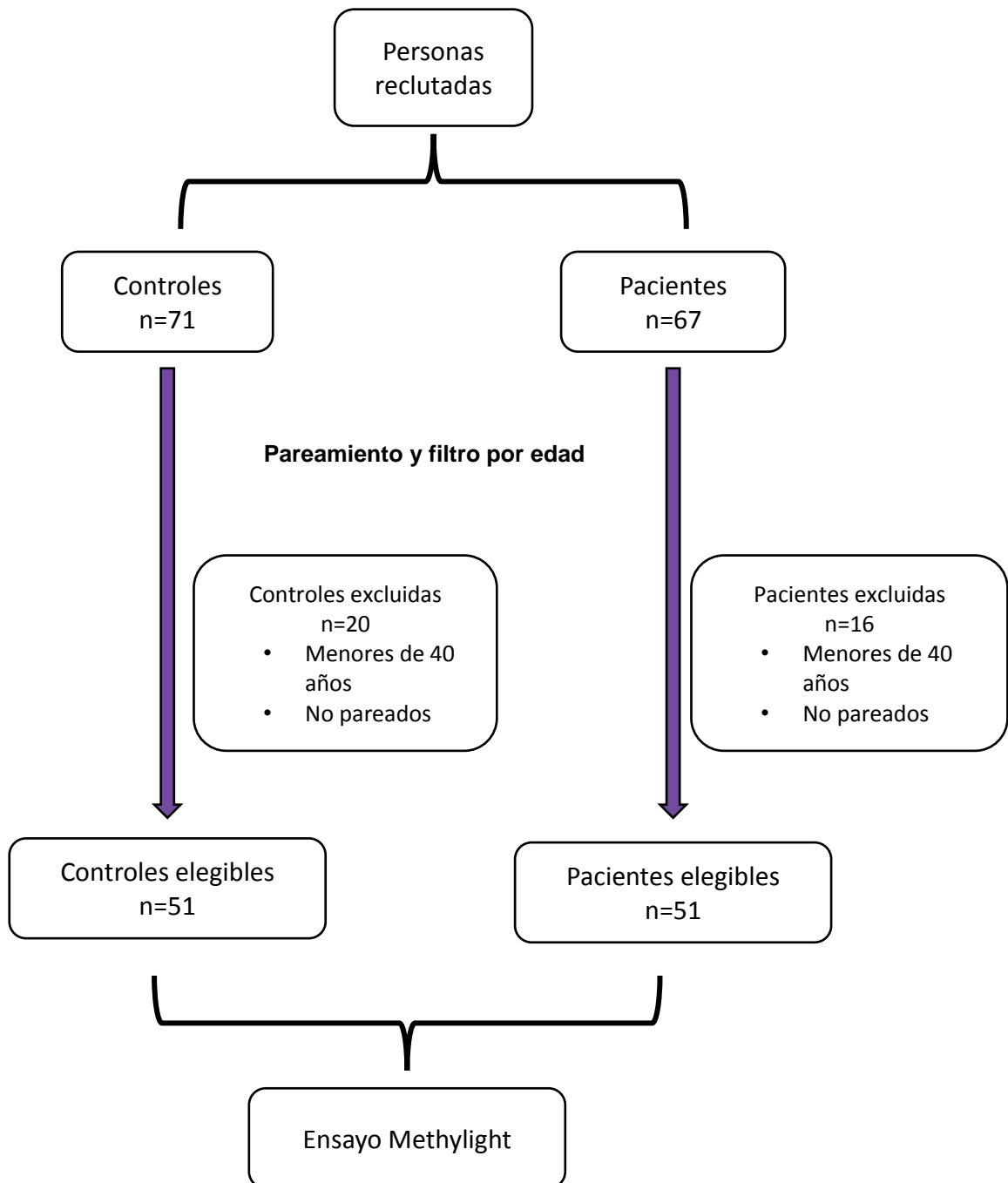


Figura 7. Flujo de reclutamiento de participantes y muestras analizadas

Como se muestra en la Figura 8, se obtuvo la amplificación del promotor del gen *RARβ2* en un total de 11 pacientes y 4 controles. El promotor del gen *GSTP1* se encontró metilado en 6 pacientes y un control. El promotor metilado del gen *SFRP1* no amplificó en ninguno de los pacientes y controles estudiados. Ello a pesar que los cebadores diseñados fueron estandarizados adecuadamente y validados con la amplificación positiva del ADN control 100% metilado en cada ensayo Methylight. Se observaron amplificaciones aberrantes del promotor de este gen en dos pacientes, pero al estar después de los 45 ciclos no fueron tomadas en cuenta para el análisis. Se validó la correcta amplificación de este gen en cada ensayo con el control B por duplicado (Figura S3).

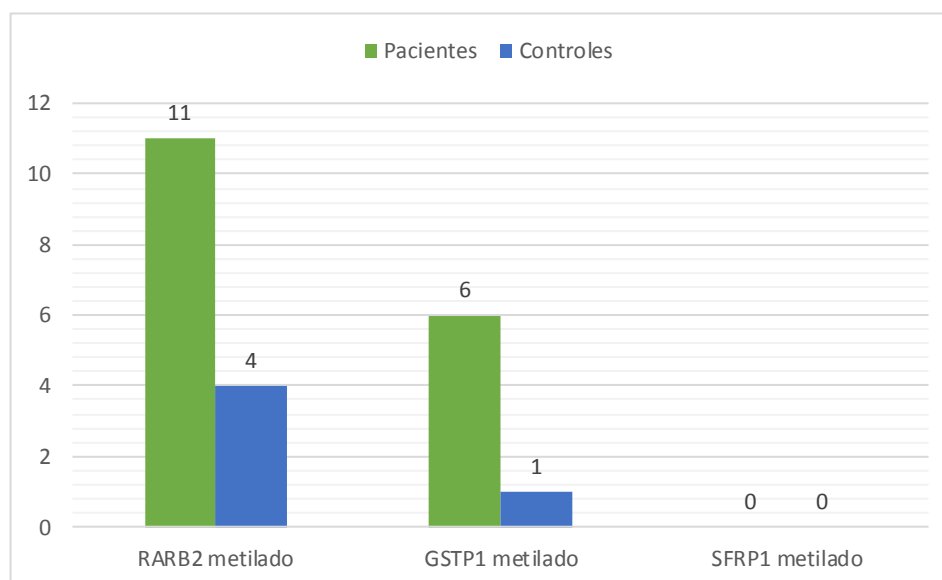


Figura 8. Amplificación del promotor metilado de los genes *RARβ2*, *GSTP1* y *SFRP1* para los grupos de pacientes y controles

Las características generales y clínicas de los controles y de los pacientes con cáncer de mama se listan en la Tabla 3, que contiene descripción las variables consideradas en este estudio.

La edad promedio de los pacientes fue de 55.9 ± 9.8 años y la de los controles 55.9 ± 10.5 años. Respecto al estado hormonal, se encontró un porcentaje de mujeres post-menopáusicas de 53.95% en los pacientes y de 46.05% en los controles.

Entre los aspectos relativos a los pasos previos de extracción y conversión de *cfDNA* por sales de bisulfito, la masa de *cfDNA* inicial para la conversión de bisulfito en los pacientes fue de 428.4 ± 169.6 ng y para los controles 466.6 ± 299.5 ng.

La masa de *COL2A1* en la reacción indica indirectamente la concentración de hebras simples de *cfDNA* convertido por bisulfito que sirve de plantilla útil para la búsqueda de secuencias metiladas del promotor de los genes de estudio (*RAR β 2*, *GSTP1* y *SFRP1*). Se obtuvieron 0.44 ± 0.5 ng de *cfDNA* como la cantidad promedio de ADN plantilla que ingresa a la reacción para ser amplificado.

Del grupo de pacientes analizado, el estadio de cáncer más frecuente fue estadio III con 50%, seguido de estadio II con 22%, estadio I con 16% y estadio IV con 12%. Respecto a los marcadores inmunohistoquímicos, el 69% de los pacientes fue positivo para el receptor de estrógeno (ER), el 53% de los pacientes fue positivo para el receptor de progesterona (PR) y solo el 27% fue positivo para HER2.

Los grupos sanguíneos de los pacientes fueron O (83.7%), seguido de A (13.95%) y AB (2.33%). Las variables conteo de linfocitos (mediana 5325 cel/ul) y porcentaje de glucosa en sangre (mediana 91.8 mg/dl) no muestran distribución normal. Estas variables fueron obtenidas exclusivamente de la historia clínica de los pacientes. En el caso de los controles esta información no figura en su ficha informativa y la muestra sanguínea obtenida fue utilizada íntegramente para la extracción de *cfDNA* para este estudio.

Tabla 3. Características generales y clínico-patológicas de los pacientes con cáncer de mama y controles

	Controles n(%)	mama n(%)
	n =102	51 (50)
Edad	n= 51	n= 51
Promedio	55.86	55.94
Mediana	53.00	52.00
95% CI	[52 - 60.9]	[51 - 59]
Rango	[40 - 85]	[42 - 80]
Estado hormonal	n= 51	n= 51
Premenopausica	16 (61.54)	10 (38.46)
Postmenopausica	35 (46.05)	41 (53.95)
Masa de ADN inicial (ng)	n= 40	n= 40
Promedio	428.37	466.64
Mediana	399.95	424.00
Mediana 95% CI	[399.5-405.1]	[321.4-524.4]
Rango	[156.25-1292]	[99.84-1268]
COL2A1 (ng/reax)	n= 51	n= 51
Promedio	0.41	0.47
Mediana	0.29	0.37
95% CI	[0.2 - 0.39]	[0.19 - 0.54]
Rango	[0.01 - 1.648]	[0.05 - 4.45]
Estadio tumoral		n= 50
I		8 (16)
II		11 (22)
III		25 (50)
IV		6 (12)
Estadios iniciales y finales		n=50
Estadios iniciales (I y II)		19 (38)
Estadios finales (III y IV)		31 (62)
Receptor de Estrógeno (ER)		n=49
Negativo		15 (30.61)
Positivo		34 (69.39)
Receptor de Progesterona (PR)		n=49
Negativo		23 (46.94)
Positivo		26 (53.06)
HER2		n=48
Negativo		35 (72.92)
Positivo		13 (27.08)
Conteo de linfocitos (cel/ul)		n=50
Promedio		5296.026
Mediana		5325
95% CI		[4701.4 - 6161.6]
Rango		[720 - 14000]
Glucosa en sangre (mg/dl)		n=47
Promedio		91.88
Mediana		91.8
95% CI		[86.8 - 93.4]
Rango		[69 - 122.4]
Grupo Sanguíneo		n=43
A		6 (13.95)
B		0 (0)
AB		1 (2.33)
O		36 (83.72)

En la tabla 4, se muestran las comparaciones entre grupos de pacientes con cáncer de mama y controles sanos para las variables compartidas. No se encontraron diferencias significativas para la edad entre los grupos de pacientes y controles ($p=0.9572$) lo cual indica un pareamiento adecuado. Tampoco se hallaron diferencias significativas en el estado hormonal de los grupos ($p=0.173$).

Respecto a las variables propias de la ejecución técnica del experimento, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de masa de ADN inicial (en Nanogramos) que se utilizó para la conversión por bisulfito entre los grupos de pacientes y controles ($p=0.9157$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la concentración de *COL2A1* (ng/reax) de pacientes y controles ($p=0.9546$).

Tabla 4. Diferencias entre grupos de pacientes con cáncer de mama y controles sanos para las características generales

	Controles n(%)	Pacientes de cáncer de mama n(%)	Prueba	Valor P
N=102	51 (50)	51(50)		
Masa de ADN inicial (ng)	n= 40	n= 40		
Promedio	428.37	466.64	-0.106	0.9157**
Mediana	399.95	424.00		
Mediana 95% CI	[399.5-405.1]	[321.4-524.4]		
Rango	[156.25-1292]	[99.84-1268]		
COL2A1 (ng/reax)	n= 51	n= 51		
Promedio	0.41	0.47	-0.057	0.9546**
Mediana	0.29	0.37		
95% CI	[0.2 - 0.39]	[0.19 - 0.54]		
Rango	[0.01 - 1.648]	[0.05 - 4.45]		
Edad	n= 51	n= 51		
Promedio	55.86	55.94	0.054	0.9572**
Mediana	53.00	52.00		
95% CI	[52 - 60.9]	[51 - 59]		
Rango	[40 - 85]	[42 - 80]		
Estado hormonal	n= 51	n= 51		
Premenopausica	16 (61.54)	10 (38.46)	1.858	0.173*
Postmenopausica	35 (46.05)	41 (53.95)		

*Según prueba χ^2 ** Según prueba U de Mann Whitney

Como se muestra en la Tabla 5, el PMR cuantitativo del gen *RARβ2* no mostró diferencias significativas entre los valores de PMR de ambos grupos (**p=0.0757**). De igual manera, promotor metilado del gen *GSTP1* no obtuvo diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles (**p= 0.0515**).

Tabla 5. Asociación del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo de los genes *GSTP1* y *RARβ2*

	Controles n(%)	Pacientes n(%)	Prueba	Valor P
PMR cuantitativo				
PMR <i>RARβ2</i>				
Promedio	n= 51 6.98	n= 51 4.60	-1.776	0.0757**
Mediana	0	0		
95% CI	[0 - 0]	[0 - 0]		
Rango	[0 - 163.3]	[0 -73.9]		
PMR <i>GSTP1</i>				
Promedio	n= 51 0.48	n= 51 5.28	-1.947	0.0515**
Mediana	0	0		
95% CI	[0 - 0]	[0 - 0]		
Rango	[0 - 24.7]	[0 - 146.9]		

Sólo se consideró el riesgo de los genes *RARB2* y *GSTP1* debido a que *SFRP1* no amplificó en ningún caso. IC = Intervalo de Confianza. **Prueba: U de Mann Withney

Seguidamente, en la Tabla 6 se muestra la asociación encontrada entre la metilación cualitativa del gen *RARβ2* y el cáncer de mama cuando se ajusta la regresión por las variables de confusión (**p=0.048**), donde las pacientes con cáncer de mama tienen una probabilidad cinco veces mayor de haber sido expuestas a la metilación de *RARβ2* que las controles (OR de 5.06 con I.C. 95% de [1.01-25.3]).

En el caso del gen *GSTP1*, la significancia se encuentra en el límite (**p=0.057**) y se sugiere un incremento en el riesgo de tener cáncer de mama entre las mujeres con *GSTP1* metilado en comparación con las controles (OR de 11.5 con I.C. 95% de [0.92-143]). En ambos casos, el riesgo se pronuncia luego de ajustar por edad y estado hormonal.

Para *RARβ2*, la significancia del OR se pierde cuando se utilizan los puntos de corte del PMR mayores al 4% y al 10%. El gen *GSTP1* obtuvo valores de PMR superiores a 10% en todos los casos, por lo que no varía al aplicársele los puntos de corte.

Tabla 6. Asociación y riesgo del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) de los genes *RARβ2* y *GSTP1* de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.

PMR cualitativo		Controles		OR pareado	P-valor	IC 95%	OR Pareado Ajustado*	P-valor Ajustado*	IC 95%
		Metilado	No Metilado						
Pacientes	PMR <i>RARβ2</i>								
	Metilado	2	9	4.50	0.054*	[0.97 - 20.8]	5.06	0.048**	[1.01 - 25.31]
	No Metilado	2	38						
	Total	4	47						
Pacientes	PMR <i>GSTP1</i>								
	Metilado	0	6	6.00	0.097*	[0.72 - 49.8]	11.50	0.057**	[0.92 - 143.14]
	No Metilado	1	44						
	Total	1	50						
PMR con punto de corte 4%	PMR <i>RARβ2</i>								
	Metilado	2	8	4.00	0.080*	[0.84 - 18.8]	4.07	0.077**	[0.85 - 19.34]
	No Metilado	2	39						
	Total	4	47						
Pacientes	PMR <i>GSTP1</i>								
	Metilado	0	6	6.00	0.097*	[0.72 - 49.8]	11.50	0.057**	[0.92 - 143.14]
	No Metilado	1	44						
	Total	1	50						
PMR con punto de corte 10%	PMR <i>RARβ2</i>								
	Metilado	2	9	3.00	0.178*	[0.6 - 14.86]	3.03	0.176**	[0.61 - 15.09]
	No Metilado	2	38						
	Total	4	47						
Pacientes	PMR <i>GSTP1</i>								
	Metilado	0	6	6.00	0.097*	[0.72 - 49.8]	11.50	0.057**	[0.92 - 143.14]
	No Metilado	1	44						
	Total	1	50						

Sólo se consideró el riesgo de los genes *RARβ2* y *GSTP1* debido a que *SFRP1* no amplificó en ningún caso. IC = Intervalo de Confianza. *Prueba: Regresión logística condicional de efectos fijos para casos y controles pareados **Prueba: Regresión logística condicional de efectos fijos para casos y controles pareados, ajustada por edad y estado hormonal.

Respecto a los controles metilados en el gen *RARβ2* (Tabla 7), se encontró asociación en el límite de la significancia ($p=0.051$) con el estado hormonal premenopáusico. No se encontró asociación significativa entre el promotor metilado de *RARβ2* y las demás variables clínicas de los controles. En el caso de las pacientes, la metilación de *RARβ2* no estuvo asociada a ninguna variable clínico-patológica.

Tabla 7. Asociación entre el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del gen *RARβ2* y las características clínico-patológicas de controles y pacientes de cáncer de mama.

Metilacion del gen <i>RARβ2</i> (PMR cuantitativo) para controles (N=51)						
	N	Promedio	Mediana	Rango	z	P-valor
Estado hormonal						
Premenopausica	16	17.39	0	[0 - 163.312]	1.959	0.0501*
Postmenopausica	35	2.22	0	[0 - 77.821]		
	N	Coef. Rho				P-valor
Edad	51	-0.26				0.0635***
COL2A1 (ng/reax)	51	-0.03				0.8150***
Masa de ADN inicial (ng)	40	0.03				0.8592***
Metilacion del gen <i>RARβ2</i> (PMR cuantitativo) para pacientes (N=51)						
	N	Promedio	Mediana	Rango	z	P-valor
Estadio tumoral						
I	8	5.68	0	[0 - 39.56]	2.053	0.5616**
II	11	1.92	0	[0 - 14.692]		
III	25	3.31	0	[0 - 34.649]		
IV	6	14.24	0	[0 - 73.936]		
Grupo Sanguineo						
A	6	4.21	0	[0 - 20.371]	0.632	0.7290**
B	0					
AB	1	0.00	0	0		
O	36	5.37	0	[0 - 73.936]		
Estado hormonal						
Premenopausica	10	0.49	0	[0 - 4.864]	-1.072	0.2839*
Postmenopausica	41	4.60	0	[0 - 73.936]		
Estadios iniciales y finales						
Estadios iniciales (I y II)	19	3.50	0	[0 - 39.56]	0.4	0.6893*
Estadios finales (III y IV)	31	5.43	0	[0 - 73.936]		
Desconocido	1					
Receptor de Estrógeno (ER)						
Negativo	15	6.50	0	[0 - 34.649]	1.247	0.2124*
Positivo	34	4.038794	0	[0 - 73.936]		
Desconocido	2					
Receptor de Progesterona (PR)						
Negativo	23	7.45	0	[0 - 73.936]	0.754	0.4508*
Positivo	26	2.44	0	[0 - 39.56]		
Desconocido	2					
Receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2)						
Negativo	35	5.30	0	[0 - 73.936]	0.646	0.5183*
Positivo	13	3.80	0	[0 - 34.649]		
Desconocido	3					
	N	Coef. Rho				P-valor
Edad	51	0.18				0.2165***
Conteo de linfocitos (cel/ul)	50	-0.05				0.7481***
Glucosa en sangre (mg/dl)	47	-0.03				0.8352***
COL2A1	51	0.20				0.1678***
ADN input	40	-0.15				0.3710***

P-valor obtenido con *Prueba U de Mann Whitney ** Prueba Kruskal Wallis ***Correlacion de Spearman

Por otra parte, el promotor de *GSTP1* metilado de forma cuantitativa no estuvo asociado a ninguna característica clínica de los controles o de los pacientes de cáncer de mama (Tabla 8).

Tabla 8. Asociación entre el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del gen *GSTP1* y las características clínico-patológicas de controles y pacientes de cáncer de mama.

Metilacion del gen <i>GSTP1</i> (PMR cuantitativo) para controles (N=51)						
	N	Promedio	Mediana	Rango	z	P-valor
Estado hormonal						
Premenopausica	16	1.545313	0	[0 - 24.73]	1.479	0.1391
Postmenopausica	35	0	0	[0 - 0]		
	N	Coef. Rho				P-valor
Edad	51	-0.1107				0.4394
COL2A1 (ng/reax)	51	-0.2403				0.0895
Masa de ADN inicial (ng)	40	-0.2428				0.1312
Metilacion del gen <i>GSTP1</i> (PMR cuantitativo) para pacientes (N=51)						
	N	Promedio	Mediana	Rango	z	P-valor
Estadio tumoral						
I	8	0.00	0	[0 - 0]	3.9030	0.2721**
II	11	3.05	0	[0 - 33.504]		
III	25	7.64	0	[0 - 146.95]		
IV	6	5.73	0	[0 - 18.4]		
Grupo Sanguineo						
A	6	5.58	0	[0 - 33.504]	0.2810	0.8689**
B	0	-	-	-		
AB	1	0.00	0	[0 - 0]		
O	36	6.10	0	[0 - 146.95]		
Estado hormonal						
Premenopausica	10	0.00	0	[0 - 0]	-1.272	0.2034*
Postmenopausica	41	6.57	0	[0 - 146.946]		
Estadios iniciales y finales						
Estadios iniciales (I y II)	19	1.76	0	[0 - 33.504]	-0.864	0.3877*
Estadios finales (III y IV)	31	7.27	0	[0 - 146.95]		
Receptor de Estrógeno (ER)						
Negativo	15	5.86	0	[0 - 43.94]	1.445	0.1484*
Positivo	34	4.86	0	[0 - 146.95]		
Desconocido	2					
Receptor de Progesterona (PR)						
Negativo	23	4.62	0	[0 - 43.94]	1.468	0.1421*
Positivo	26	5.65	0	[0 - 146.95]		
Desconocido	2					
Receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2)						
Negativo	35	5.68	0	[0 - 146.946]	-0.634	0.5258*
Positivo	13	4.19	0	[0 - 43.94]		
Desconocido						
	N	Coef. Rho				P-valor
Edad	51	0.19				0.1895***
Conteo de linfocitos (cel/ul)	50	0.04				0.7870***
Glucosa en sangre (mg/dl)	47	0.06				0.6705***
COL2A1	51	0.08				0.5692***
ADN input	40	0.07				0.6800***

P-valor obtenido con *Prueba U de Mann Whitney ** Prueba Kruskal Wallis ***Correlacion de Spearman

Seguidamente, se consideró el PMR de los genes *RARβ2* y *GSTP1* como valores cualitativos, con el punto de corte de 4% y 10%, para ser comparados con las variables clínicas de pacientes y controles. En el caso de los controles, la Tabla 9 muestra que el promotor metilado de *RARβ2* cualitativo y con punto de corte mayor a 4% está asociado a las mujeres pre menopáusicas con una significancia en el límite ($p=0.05$), no encontrándose asociación con la edad con punto de corte de 50 años.

Tabla 9. Asociación entre las características clínicas de controles y el porcentaje de promotor metilado (PMR) de los genes *RARβ2* y *GSTP1* de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.

	PMR cualitativo sin punto de corte		PMR cualitativo con punto de corte de 4% PMR		PMR cualitativo con punto de corte de 10% PMR		P-valor
	N (%)	PMR(+), n(%)	N (%)	PMR(+), n(%)	N (%)	PMR(+), n(%)	
RARβ2							
Edad							
Menores de 55	28 (100)	4 (14.29)	28 (100)	4 (14.29)	28 (100)	25 (89.29)	3 (10.71) 0.106*
Mayores de 55	23 (100)	0 (0)	23 (100)	0 (0)	23 (100)	23 (100)	0 (0)
Estado hormonal							
Premenopausicas	16 (100)	3 (16.75)	16 (100)	3 (18.75)	16 (100)	14 (87.5)	2 (12.5) 0.174*
Postmenopausicas	35 (100)	1 (2.86)	35 (100)	1 (2.86)	35 (100)	34 (97.14)	1 (2.86)
GSTP1							
Edad							
Menores de 55	28 (100)	1 (3.57)	28 (100)	1 (3.57)	28 (100)	27 (96.43)	1 (3.57) 1.0000*
Mayores de 55	23 (100)	0 (0.00)	23 (100)	0 (0.00)	23 (100)	23 (100)	0 (0.00)
Estado hormonal							
Premenopausicas	16 (100)	1 (6.25)	16 (100)	1 (6.25)	16 (100)	15 (93.75)	1 (6.25) 0.314*
Postmenopausicas	35 (100)	0 (0.00)	35 (100)	0 (0.00)	35 (100)	0 (0.00)	0 (0.00) 0.314*

El P-valor fue obtenido con la prueba χ^2 o la exacta de Fisher*

Para los pacientes, no se encontró asociación de las variables clínico patológicas con el promotor metilado de *RARβ2* cualitativo en ningún punto de corte (Tabla 10).

Tabla 10. Asociación entre las variables clínico-patológicas de pacientes de cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del gen *RARβ2* de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.

Muestra	PMR cualitativo sin punto de corte				PMR cualitativo > 4%				PMR cualitativo > 10%			
	N=51	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor	N=51	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor	N=51	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor
Edad												
Menores de 55	27 (100)	23 (85.19)	4 (14.81)	0.310*	27 (100)	23 (85.19)	4 (14.81)	0.485*	27 (100)	25 (92.59)	2 (7.41)	0.232*
Mayores de 55	24 (100)	17 (70.83)	7 (29.17)		24 (100)	18 (75)	6 (25)		24 (100)	19 (79.17)	5 (20.83)	
Estado hormonal												
Premenopausicas	10 (100)	9 (90)	1 (10)	0.428*	10 (100)	9 (90)	1 (10)	0.664*	10 (100)	10 (100)	0 (0)	0.320*
Postmenopausicas	41 (100)	31 (75.61)	10 (24.39)		41 (100)	32 (78.05)	9 (21.95)		41 (100)	34 (82.93)	7 (17.07)	
Estado tumoral												
I	8 (100)	5 (62.5)	3 (37.5)	0.504*	8 (100)	6 (75)	2 (25)	0.766*	8 (100)	7 (87.5)	1 (12.5)	0.576*
II	11 (100)	9 (81.82)	2 (18.18)		11 (100)	9 (81.82)	2 (18.18)		11 (100)	10 (90.91)	1 (9.09)	
III	25 (100)	21 (84)	4 (16)		25 (100)	21 (84)	4 (16)		25 (100)	22 (88)	3 (12)	
IV	6 (100)	4 (66.67)	2 (33.3)		6 (100)	4 (66.67)	2 (33.3)		6 (100)	4 (66.67)	2 (33.3)	
Grupo Sanguíneo												
A	6 (100)	4 (66.67)	2 (33.3)	0.678*	6 (100)	4 (66.67)	2 (33.3)	0.446*	6 (100)	5 (83.33)	1 (16.67)	1.000*
B	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
AB	1 (100)	1 (100)	0 (0.00)		1 (100)	1 (100)	0 (0.00)		1 (100)	1 (100)	0 (0.00)	
O	36 (100)	29 (80.56)	7 (19.44)		36 (100)	30 (83.33)	6 (16.67)		36 (100)	31 (86.11)	5 (13.89)	
Estados iniciales y finales												
Estados iniciales (I y II)	19 (100)	14 (73.68)	5 (26.32)	0.5640	19 (100)	15 (78.95)	4 (21.05)	1.0000*	19 (100)	17 (89.47)	2 (10.53)	0.695*
Estados finales (III y IV)	31 (100)	25 (80.65)	6 (19.35)		31 (100)	25 (80.65)	6 (19.35)		31 (100)	26 (83.87)	5 (16.13)	
Receptor de Estrógeno (ER)												
Negativo	15 (100)	10 (66.67)	5 (33.33)	0.2750	15 (100)	10 (66.67)	5 (33.33)	0.2470	15 (100)	11 (73.33)	4 (26.67)	0.179*
Positivo	34 (100)	28 (82.35)	6 (17.65)		34 (100)	29 (85.29)	5 (14.71)		34 (100)	31 (91.18)	3 (8.82)	
Desconocido	2											
Receptor de Progesterona (PR)												
Negativo	23 (100)	17 (73.91)	6 (26.09)	0.566*	23 (100)	17 (73.91)	6 (26.09)	0.483*	23 (100)	18 (78.26)	5 (21.74)	0.230*
Positivo	26 (100)	21 (80.77)	5 (19.23)		26 (100)	22 (84.62)	4 (15.38)		26 (100)	24 (92.31)	2 (7.69)	
Desconocido	2											
HER2												
Negativo	35 (100)	26 (74.29)	9 (25.71)	0.702*	35 (100)	27 (77.14)	8 (22.86)	0.706*	35 (100)	30 (85.71)	5 (14.29)	1.000*
Positivo	13 (100)	11 (84.62)			13 (100)	11 (84.62)	2 (15.38)		13 (100)	11 (84.62)	2 (15.38)	
Desconocido	3											

El P-valor fue obtenido con la prueba χ^2 y la exacta de Fisher*

De forma similar, el promotor metilado de *GSTP1* no estuvo asociado a las variables clínico-patológicas de los pacientes (Tabla 11).

Tabla 11. Asociación entre las variables clínico-patológicas de pacientes de cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del gen *GSTP1* de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.

Muestra	PMR cualitativo sin punto de corte				PMR cualitativo > 4%				PMR cualitativo > 10%			
	N=53	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor	N=53	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor	N=53	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor
Edad												
Menores de 55	27 (100)	26 (96.30)	1 (3.7)	0.088*	27 (100)	26 (96.30)	1 (3.7)	0.088*	27 (100)	26 (96.30)	1 (3.7)	0.088*
Mayores de 55	24 (100)	19 (79.17)	5 (20.83)		24 (100)	19 (79.17)	5 (20.83)		24 (100)	19 (79.17)	5 (20.83)	
Estado hormonal												
Premenopausicas	10 (100)	10 (100)	0 (0.00)	0.331*	10 (100)	10 (100)	0 (0.00)	0.331*	10 (100)	10 (100)	0 (0.00)	0.331*
Postmenopausicas	41 (100)	35 (85.37)	6 (14.63)		41 (100)	35 (85.37)	6 (14.63)		41 (100)	35 (85.37)	6 (14.63)	
Estadio tumoral												
I	8 (100)	8 (100)	0 (0.00)	0.234*	8 (100)	8 (100)	0 (0.00)	0.234*	8 (100)	8 (100)	0 (0.00)	0.234*
II	11 (100)	10 (90.91)	1 (9.09)		11 (100)	10 (90.91)	1 (9.09)		11 (100)	10 (90.91)	1 (9.09)	
III	25 (100)	23 (92)	2 (8)		25 (100)	23 (92)	2 (8)		25 (100)	23 (92)	2 (8)	
IV	6 (100)	4 (66.67)	2 (33.33)		6 (100)	4 (66.67)	2 (33.33)		6 (100)	4 (66.67)	2 (33.33)	
Grupo Sanguíneo												
A	6 (100)	5 (83.33)	1 (16.67)	0.608*	6 (100)	5 (83.33)	1 (16.67)	0.608*	6 (100)	5 (83.33)	1 (16.67)	0.608*
B	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
AB	1 (100)	0 (0.00)	0 (0.00)		1 (100)	0 (0.00)	0 (0.00)		1 (100)	0 (0.00)	0 (0.00)	
O	36 (100)	32 (88.89)	4 (11.11)		36 (100)	32 (88.89)	4 (11.11)		36 (100)	32 (88.89)	4 (11.11)	
Estadios iniciales y finales												
Estadios iniciales (I y II)	19 (100)	18 (94.74)	1 (5.26)	0.637*	19 (100)	18 (94.74)	1 (5.26)	0.637*	19 (100)	18 (94.74)	1 (5.26)	0.637*
Estadios finales (III y IV)	31 (100)	27 (87.1)	4 (12.90)		31 (100)	27 (87.1)	4 (12.90)		31 (100)	27 (87.1)	4 (12.90)	
Receptor de Estrógeno (ER)												
Negativo	15 (100)	12 (80)	3 (20)	0.160*	15 (100)	12 (80)	3 (20)	0.160*	15 (100)	12 (80)	3 (20)	0.160*
Positivo	34 (100)	32 (94.12)	2 (5.88)		34 (100)	32 (94.12)	2 (5.88)		34 (100)	32 (94.12)	2 (5.88)	
Desconocido	2				2				2			
Receptor de Progesterona (PR)												
Negativo	23 (100)	19 (82.61)	4 (17.39)	0.173*	23 (100)	19 (82.61)	4 (17.39)	0.173*	23 (100)	19 (82.61)	4 (17.39)	0.173*
Positivo	26 (100)	25 (96.15)	1 (3.85)		26 (100)	25 (96.15)	1 (3.85)		26 (100)	25 (96.15)	1 (3.85)	
Desconocido	2				2				2			
HER2												
Negativo	35 (100)	32 (91.43)	3 (8.57)	0.602*	35 (100)	32 (91.43)	3 (8.57)	0.602*	35 (100)	32 (91.43)	3 (8.57)	0.602*
Positivo	13 (100)	11 (84.62)	2 (15.38)		13 (100)	11 (84.62)	2 (15.38)		13 (100)	11 (84.62)	2 (15.38)	
Desconocido	3				3				3			

El P-valor fue obtenido con la prueba χ^2 y la exacta de Fisher*

Se estimó la asociación de la metilación en conjunto de los genes estudiados (*RARβ2* + *GSTP1*) y el cáncer de mama como se muestra en la Tabla 12. Usando la prueba U de Mann Whitney para el PMR cuantitativo, se encontró asociación significativa entre la metilación de los genes en conjunto y la presencia de cáncer de mama (p=0.0081).

Tabla 12. Asociación del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del conjunto de genes *RARβ2*+*GSTP1*

	Controles n(%)	Pacientes n(%)	Prueba	Valor P
PMR cuantitativo	n= 51	n= 51		
Promedio	7.46	9.88	-2.647	0.0081*
Mediana	0	0		
95% CI	[0 - 0]	[0 - 0]		
Rango	[0 - 163.3]	[0 - 146.95]		

Sólo se consideró el riesgo de los genes *RARβ2* y *GSTP1* debido a que *SFRP1* no amplificó en ningún caso. IC = Intervalo de Confianza. *Prueba: U de Mann Whitney

En la Tabla 13, se muestra la asociación estimada entre con la variable PMR cualitativa de ambos genes (*RARβ2* + *GSTP1*) con los puntos de corte de 4% y 10% y el cáncer de mama. Se obtuvo significancia estadística en todos los casos (p<0.05) y valores de OR mayor a 1.

Considerando el valor cualitativo sin punto de corte, las pacientes con cáncer de mama tienen una probabilidad cinco veces mayor de haber sido expuestas a la metilación de *RARβ2* y *GSTP1* que las controles (OR de 5 con I.C. 95% de [1.44-17.27]).

Este riesgo es 6.60 veces mayor si se ajusta para los efectos de la edad y el estado hormonal (OR de 6.6 con I.C. 95% de [1.71-25.54]). Esta tendencia se mantiene en el punto de corte de 4% de metilación y de 10%.

Tabla 13. Asociación y riesgo del cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del conjunto de genes *RARβ2+GSTP1* de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.

		Controles		OR pareado	P-valor	IC 95%	OR Pareado Ajustado*	P-valor Ajustado*	IC 95%	
		Metilado	No Metilado							Total
		Metilado	No Metilado							Total
PMR cualitativo										
Pacientes	Metilado	2	15	5.00	0.0011*	[1.44 - 17.27]	6.60	0.006**	[1.71 - 25.54]	
	No Metilado	3	31							
	Total	5	46							
PMR con punto de corte 4%										
Pacientes	Metilado	2	14	4.67	0.015*	[1.34 - 16.24]	5.79	0.010**	[1.53 - 21.85]	
	No Metilado	3	32							
	Total	5	46							
PMR con punto de corte 10%										
Pacientes	Metilado	1	12	4.00	0.032*	[1.13 - 14.17]	4.98	0.019**	[1.29 - 19.20]	
	No Metilado	3	35							
	Total	4	47							

Sólo se consideró el riesgo de los genes *RARβ2+GSTP1* en un panel conjunto debido a que *SFRP1* no amplificó en ningún caso. IC = Intervalo de Confianza. *Prueba: Regresión logística condicional de efectos fijos para casos y controles pareados **Prueba: Regresión logística condicional de efectos fijos para casos y controles, ajustada por edad y estado hormonal.

En la Tabla 14 se muestra la asociación del PMR de ambos genes tomado de forma cuantitativa y las variables clínico-patológicas de controles y pacientes. Se encontró asociación significativa entre tener al menos uno de estos genes metilado y ser pre menopáusica en los controles ($p=0.0147$). El promotor metilado de al menos uno de estos genes también se asocia a una menor edad en los controles ($p= 0.0406$).

Respecto a las pacientes, se encontró asociación significativa entre la metilación de al menos uno de estos genes y el receptor de estrógeno negativo ($p=0.0423$). También se evidenció una asociación significativa de la metilación de estos genes y una edad más avanzada en las pacientes ($p=0.0496$).

Tabla 14. Asociación entre el porcentaje de promotor metilado (PMR) cuantitativo del conjunto de genes *RARβ2+GSTP1* y las características clínico-patológicas de controles y pacientes de cáncer de mama.

Metilación del gen <i>RARβ2+GSTP1</i> (PMR cuantitativo) para controles (N=51)							
	N	Promedio	Mediana	Rango	z	P-valor	
Estado hormonal							
Premenopausica	16	18.93	0	[0 - 163.312]	2.439	0.0147	
Postmenopausica	35	2.22	0	[0 - 77.821]			
	N	Coef. Rho					P-valor
Edad	51	-0.2878					0.0406
COL2A1 (ng/reax)	51	-0.1366					0.3393
Masa de ADN inicial (ng)	40	-0.102					0.5312
Metilación del gen <i>RARβ2+GSTP1</i> (PMR cuantitativo) para pacientes (N=51)							
	N	Promedio	Mediana	Rango	z	P-valor	
Estadio tumoral							
I	8	5.68	0	[0 - 39.56]	3.8060	0.2832**	
II	11	4.96	0	[0 - 33.504]			
III	25	10.94	0	[0 - 146.95]			
IV	6	19.97	13.7	[0 - 73.936]			
Grupo Sanguineo							
A	6	9.79	2.43	[0 - 33.504]	0.9730	0.6148**	
B	0	-	-	-			
AB	1	0.00	0	[0 - 0]			
O	36	11.47	0	[0 - 146.95]			
Estado hormonal							
Premenopausica	10	0.49	0	[0 - 4.86]	-1.852	0.0640*	
Postmenopausica	41	12.17	0	[0 - 146.946]			
Estadios iniciales y finales							
Estadios iniciales (I y II)	19	5.26	0	[0 - 33.504]	-0.362	0.7173*	
Estadios finales (III y IV)	31	12.69	0	[0 - 146.95]			
Receptor de Estrógeno (ER)							
Negativo	15	12.36	0	[0 - 43.94]	2.03	0.0423*	
Positivo	34	8.90	0	[0 - 146.95]			
Desconocido	2						
Receptor de Progesterona (PR)							
Negativo	23	12.07	0	[0 - 73.94]	1.658	0.0972*	
Positivo	26	8.08	0	[0 - 146.95]			
Desconocido	2						
HER2							
Negativo	35	10.97	0	[0 - 146.946]	-0.111	0.9119*	
Positivo	13	7.98	0	[0 - 43.94]			
Desconocido							
	N	Coef. Rho					P-valor
Edad	51	0.28					0.0496***
Conteo de linfocitos (cel/ul)	50	-0.02					0.8720***
Glucosa en sangre (mg/dl)	47	-0.01					0.9365***
COL2A1	51	0.20					0.1541***
ADN input	40	-0.07					0.6472***

P-valor obtenido con *Prueba U de Mann Whitney ** Prueba Kruskal Wallis ***Correlacion de Spearman

Tomando en cuenta el PMR cualitativo de ambos genes en el grupo control, la Tabla 15 sugiere una asociación significativa ($p=0.014$) entre ser menor de 50 años y tener el promotor metilado en *RARβ2* o *GSTP1*. La metilación de al menos uno de estos genes se encuentra asociado al estado hormonal pre menopáusico en controles ($p= 0.029$) para el PMR cualitativo y el punto de corte de 4%.

Tabla 15. Asociación entre las características clínicas de controles y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del conjunto de genes *RARβ2+GSTP1* de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.

	PMR cualitativo sin punto de corte		PMR cualitativo con punto de corte de 4% PMR cualitativo con punto de corte de 10%		P-valor						
	N (%)	PMR(-), n(%)/PMR(+), n(%)	N (%)	PMR(-), n(%)/PMR(+), n(%)							
<i>RARβ2+GSTP1</i>											
Edad											
Menores de 50	16 (100)	12 (75)	4 (25)	16 (100)	12 (75)	4 (25)	0.0140	16 (100)	13 (81.3)	3 (18.7)	0.0500
Mayores de 50	35 (100)	34 (97.1)	1 (2.9)	35 (100)	34 (97.1)	1 (2.9)		35 (100)	34 (97.1)	1 (2.9)	
Edad											
Menores de 55	28 (100)	23 (82.14)	5 (17.86)	28 (100)	23 (82.14)	5 (17.86)	0.056*	28 (100)	24 (85.71)	4 (14.29)	0.117*
Mayores de 55	23 (100)	23 (100)	0 (0)	23 (100)	23 (100)	0 (0)		23 (100)	23 (100)	0 (0)	
Estado hormonal											
Premenopausicas	16 (100)	12 (75)	4 (25)	16 (100)	12 (75)	4 (25)	0.029*	16 (100)	13 (81.25)	3 (18.75)	0.086*
Postmenopausicas	35 (100)	34 (97.14)	1 (2.86)	35 (100)	34 (97.14)	1 (2.86)		35 (100)	34 (97.14)	1 (2.86)	

El P-valor fue obtenido con la prueba χ^2 o la exacta de Fisher*

El PMR cualitativo de ambos genes en el grupo de pacientes, como se muestra en la Tabla 16, está asociado con una edad mayor de 55 años en las pacientes para los tres puntos de corte ($p < 0.05$).

Se mantiene la asociación de la metilación de *RARβ2* + *GSTP1* y el receptor de estrógeno negativo en los tres puntos de corte ($p < 0.05$). Adicionalmente, se evidencia una asociación entre los valores más altos de metilación (superior a 10% de PMR) y el receptor de progesterona negativo ($p = 0.044$). No se encontró asociación con las demás variables clínico-patológicas de los pacientes.

Tabla 16. Asociación entre las variables clínico-patológicas de pacientes de cáncer de mama y el porcentaje de promotor metilado (PMR) del conjunto de genes RARβ2+GSTP1 de forma cualitativa, mayor al 4% y mayor al 10% de metilación.

Muestra	PMR cualitativo sin punto de corte				PMR cualitativo > 4%				PMR cualitativo > 10%			
	N=53	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor	N=53	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor	N=53	PMR(-), n(%)	PMR(+), n(%)	P-valor
Edad												
Menores de 55	27 (100)	22 (81.48)	5 (18.52)	0.0170	27 (100)	22 (81.48)	5 (18.52)	0.0360	27 (100)	24 (88.89)	3 (11.11)	0.0120
Mayores de 55	24 (100)	12 (50)	12 (50)		24 (100)	13 (54.17)	11 (45.83)		24 (100)	14 (58.33)	10 (41.67)	
Estado hormonal												
Premenopausicas	10 (100)	9 (90)	1 (10)	0.135*	10 (100)	9 (90)	1 (10)	0.1420	10 (100)	10 (100)	0 (0)	0.048*
Postmenopausicas	41 (100)	25 (60.98)	16 (39.02)		41 (100)	26 (63.41)	15 (36.59)		41 (100)	28 (68.29)	13 (31.71)	
Estado tum oral												
I	8 (100)	5 (62.5)	3 (37.5)	0.233*	8 (100)	6 (75)	2 (25)	0.268*	8 (100)	7 (87.5)	1 (12.5)	0.107*
II	11 (100)	8 (72.73)	3 (27.27)		11 (100)	8 (72.73)	3 (27.27)		11 (100)	9 (81.82)	2 (27.27)	
III	25 (100)	19 (76)	6 (24)		25 (100)	19 (76)	6 (24)		25 (100)	20 (80)	5 (20)	
IV	6 (100)	2 (33.33)	4 (66.67)		6 (100)	2 (33.33)	4 (66.67)		6 (100)	2 (33.33)	4 (66.67)	
Grupo Sanguineo												
A	6 (100)	3 (50)	3 (50)	0.502*	6 (100)	3 (50)	3 (50)	0.548*	6 (100)	4 (66.67)	2 (33.33)	0.735*
B	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
AB	1 (100)	0 (0.00)	0 (0.00)		1 (100)	0 (0.00)	0 (0.00)		1 (100)	0 (0.00)	0 (0.00)	
O	36 (100)	25 (69.44)	11 (30.56)		36 (100)	26 (72.22)	10 (27.78)		36 (100)	27 (75.00)	9 (25.00)	
Estadios iniciales y finales												
Estadios iniciales (I y II)	19 (100)	13 (68.42)	6 (31.58)	1.0000*	19 (100)	14 (73.68)	5 (26.32)	0.656*	19 (100)	16 (84.21)	3 (15.79)	0.332*
Estadios finales (III y IV)	31 (100)	21 (67.74)	10 (32.26)		31 (100)	21 (67.74)	10 (32.26)		31 (100)	22 (70.97)	9 (29.03)	
Receptor de Estrógeno (ER)												
Negativo	15 (100)	7 (46.67)	8 (53.33)	0.04*	15 (100)	7 (46.67)	8 (53.33)	0.022*	15 (100)	8 (53.33)	7 (46.67)	0.016*
Positivo	34 (100)	26 (76.47)	8 (23.53)		34 (100)	27 (79.41)	7 (20.59)		34 (100)	29 (85.29)	5 (14.71)	
Desconocido	2				2				2			
Receptor de Progesterona (PR)												
Negativo	23 (100)	13 (56.52)	10 (43.48)	0.1290	23 (100)	13 (56.52)	10 (43.48)	0.0660	23 (100)	14 (60.87)	9 (39.13)	0.044*
Positivo	26 (100)	20 (76.92)	6 (23.08)		26 (100)	21 (80.77)	5 (19.23)		26 (100)	23 (88.46)	3 (11.54)	
Desconocido	2				2				2			
HER2												
Negativo	35 (100)	23 (65.71)	12 (34.29)	1.0000*	35 (100)	24 (68.57)	11 (31.43)	1.0000*	35 (100)	27 (77.14)	9 (69.23)	0.710*
Positivo	13 (100)	9 (69.23)	4 (30.77)		13 (100)	9 (69.23)	4 (30.77)		13 (100)	8 (22.86)	4 (30.77)	
Desconocido	3				3				3			

El P-valor fue obtenido con la prueba χ^2 y la exacta de Fisher*

Se determinó la especificidad y sensibilidad de los genes estudiados, como se muestra en la Tabla 17. La sensibilidad más alta la obtuvo la combinación de ambos genes como panel (*RARβ2* + *GSTP1*) con 33.3% y una especificidad de 90.2%. Los valores de especificidad superan el 90% para los genes *RARβ2* + *GSTP1*.

Tabla 17. Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos para la presencia de promotor metilado (PMR) de los genes *RARB2*, *GSTP1* y en conjunto (*RARB2*+*GSTP1*)

	Pacientes (n=51)	Controles (n=51)	Sensibilidad (%)**	IC 95%	Especificidad (%)**	IC 95%	VPP (%)°	VPN (%)°
PMR <i>RARB2</i>								
Metilado	11	4	21.57	[9.3 - 33.84]	92.16	[83.8 - 100]	0.16	99.95
No Metilado	40	47						
PMR <i>GSTP1</i>								
Metilado	6	1	11.76	[1.94 - 21.59]	98.04	[93.25 - 100]	0.36	99.95
No Metilado	45	50						
PMR <i>RARB2</i> + <i>GSTP1</i>								
Metilado	17	5	33.3	[19.42 - 47.25]	90.2	[81.05 - 99.34]	0.2	99.96
No Metilado	34	46						

Sólo se consideró el riesgo de los genes *RARB2* y *GSTP1* debido a que SFRP1 no amplificó en ningún caso. **Calculado con Epidat -Prueba Diagnóstica simple °VPP: Valor predictivo Positivo, VPN: Valor predictivo Negativo calculados con **Medcalc** Prevalencia del Cáncer de Mama en el Perú al 2018 =0.0006, prevalencia de todas las edades en un periodo de 5 años
Globocan 2018

CAPITULO V: DISCUSIÓN

La hipermetilación del promotor de un gen supresor de tumores, uno de los cambios epigenéticos más resaltantes de las células tumorales, ocurre durante una etapa asintomática, por lo que se le ha llamado el "sonido del silencio". Este "sonido" hace referencia a la posibilidad de identificar este patrón epigenético, discriminando una célula sana de una tumoral. Su posible uso como herramienta diagnóstica hace de la hipermetilación del promotor un promisorio biomarcador de tumores mamarios^(5,12).

Se estudiaron los patrones de metilación de los genes *SFRP1*, *RARβ2* y *GSTP1* obtenidos a partir de ADN libre circulante (*cfDNA*) del plasma sanguíneo de 51 pacientes de cáncer de mama y 51 controles sanos pareados por edad, todas mujeres mayores de 40 años de la red Oncosalud-AUNA.

Cuando se estudia directamente el ADN tumoral a partir de una biopsia quirúrgica, se obtienen porcentajes de metilación muy altos para los genes *GSTP1* y *RARβ2* (Alrededor de 98% en todos los tumores de cáncer de mama).(7) Se debe añadir que, incluso en la biopsia quirúrgica, la metilación de *SFRP1* es variable (25% a 85% de tumores mamarios)^(14,67).

La amplificación de estos genes en el presente estudio resultó en una frecuencia de 21,6% de pacientes metilados para *RARβ2* y de 11,8% de pacientes metilados para *GSTP1*. En contraste, el gen *SFRP1* no fue hallado metilado en la muestra estudiada. Este hallazgo concuerda con la afirmación de que se obtienen resultados variables en la metilación de estos genes cuando son estudiados a partir de biopsias líquidas⁽⁶⁸⁾.

El resultado obtenido se asemeja al de Brooks et al. donde se analizó la metilación del ADN libre circulante proveniente de suero sanguíneo utilizando la técnica MethyLight. Esperaban obtener al menos 26% de pacientes con metilación de *GSTP1* y sólo obtuvieron 4%. Similar fue el caso de *RARβ2*, donde esperaban 26% de pacientes metilados y obtuvieron sólo 6,7%⁽⁶⁹⁾.

La explicación para estas frecuencias por debajo del esperado, si se considera la hipermetilación de estos genes en los tumores mamarios, estaría en la presencia de resultados falsos negativos dada la menor cantidad de ADN tumoral en el *cfDNA* proveniente de plasma⁽⁶⁹⁾.

Esta limitación de la calidad del ADN plantilla puede explicar la ausencia de amplificación del promotor de *SFRP1*, debido a que el grado de fragmentación y degradación del ADN convertido por bisulfito puede haber destruido el sitio de unión de la sonda o los cebadores, ello sumado a la variabilidad intrínseca de la presencia de este gen metilado en los tumores mamarios⁽⁶⁹⁾.

Por otra parte, el tamaño del amplicón podría ser una fuente de variación a considerar: los amplicones utilizados para los genes *RARβ2*, *GSTP1* y *COL2A1* no superan las 105pb. En contraste, el amplicón diseñado para *SFRP1* es de 148pb, tamaño que pudo haber reducido la probabilidad de encontrar ADN metilado íntegro dentro de las 100 copias promedio de ADN libre circulante plantilla disponible en el ensayo MethyLight realizado en esta investigación, pero que si amplificó para el ADN control comercial 100% metilado⁽⁴⁾.

Por lo tanto, la falta de amplificación de *SFRP1* puede ser explicada por el error tipo beta (falta de sensibilidad) y se propone la presencia de falsos negativos. Sin embargo, es necesario evaluar la integridad del ADN libre circulante para aportar más evidencia a esta afirmación, además de confirmar la presencia del promotor metilado de este gen en los tumores disponibles de los pacientes estudiados.

Seguidamente, al realizarse el análisis de las variables estudio, se observó el éxito del pareamiento por edad entre grupos debido a la ausencia de diferencias significativas. Asimismo, el estado hormonal, una variable que no pudo ser controlada durante el reclutamiento, no mostró diferencias entre los grupos, a pesar de que el grupo control mostró una mayor frecuencia de mujeres premenopáusicas.

Las características generales como cantidad de masa de ADN inicial (ng) que se utilizó para la conversión por bisulfito y la concentración de *COL2A1* (ng/reax) entre los grupos de pacientes y controles fueron similares para ambos grupos, lo cual es indicador de una buena reproducibilidad de la técnica del ensayo MethyLight realizado⁽⁷⁰⁾.

Respecto a las diferencias entre grupos para los genes de estudio, el porcentaje de promotor metilado (PMR) del gen *RARβ2* no evidenció diferencias significativas entre controles y pacientes de cáncer de mama cuando se analizó de forma cuantitativa. Solo cuando se transformó el PMR a una variable cualitativa y se realizó un análisis pareado, se pudo asociar la metilación de este gen a la presencia de cáncer de mama ($p=0.048$).

El metanálisis de Fang et al. concluyó que existe asociación entre *RARβ2* y la presencia de la enfermedad (OR=7 y significativo), sin embargo, la mayoría de los estudios empleados utilizaron muestras de ADN que provienen de sangre total que fueron analizados mediante la técnica MethyLight⁽¹⁵⁾.

En la presente investigación se obtuvo un OR menor (OR=5.06 - IC95% [1.01-25.31]). Este hallazgo podría deberse al tipo de muestra de origen en el estudio: al utilizar plasma sanguíneo se extrae solo el ADN libre circulante, en cambio, con la sangre total se extrae el ADN linfocitario y el cfDNA proveniente del tumor⁽²⁸⁾.

Esta mayor concentración de ADN puede mostrar metilación constitutiva (propia de los linfocitos) que no era el objetivo de este estudio. El OR superior al valor 1 obtenido en la presente investigación aporta evidencia que la metilación de este promotor está significativamente incrementada en el ADN libre circulante de pacientes con cáncer de mama a comparación de los controles, lo cual sugiere su uso potencial como biomarcador.

Adicionalmente, Fang et al. reportaron la razón de momios de la metilación de *RARβ2* entre pacientes y controles de poblaciones caucásicas (OR=3.88) y no caucásicas (OR=13.6). El valor de OR muestra diferencias, aunque permanece como un factor de riesgo y refuerza la recomendación de utilizar este gen como biomarcador en diferentes poblaciones⁽¹⁵⁾.

Curiosamente, el OR obtenido en nuestro estudio es más cercano al de poblaciones caucásicas, como no se esperaría de la población peruana, mayoritariamente nativa americana⁽⁷¹⁾. Esto podría deberse al sesgo intrínseco de utilizar muestras provenientes de una red clínica privada (ONCOSALUD-AUNA), que no representa adecuadamente a la población peruana y prioriza a mujeres de Lima de estratos socioeconómicos medios y altos con una mayor probabilidad de tener ascendencia de poblaciones europeas.

La asociación del promotor de *RARβ2* metilado al cáncer de mama estaría explicada en el mecanismo de acción de la metilación de dicho promotor: La expresión de este gen está inducida por el ácido retinoico, que tiene propiedades que inducen a la apoptosis celular y son anti proliferativas, por lo cual, el silenciamiento de este gen condicionaría un ambiente favorable para la progresión del cáncer⁽¹⁵⁾.

De forma similar, el porcentaje de metilación del promotor del gen *GSTP1* no estuvo asociado de forma significativa con los pacientes de cáncer de mama cuando se analizó de forma cuantitativa. Solo cuando se transformó el PMR a una variable cualitativa y se realizó un análisis pareado, se evidenció una significancia marginal para asociar este gen a la presencia de cáncer de mama ($p=0.057$). El metaanálisis de Fang et al. sugiere una fuerte asociación del promotor metilado de *GSTP1* con la presencia del cáncer de mama (OR=7.85 IC95% [5.12-12.01]), sin embargo, los estudios incluidos en el análisis utilizaron muestras de ADN que provienen de sangre total y de tejido⁽⁷²⁾.

De forma similar, utilizar una fuente de ADN más concentrada como la sangre total y el tejido tumoral favorece la amplificación del promotor metilado de *GSTP1* por ensayo Methylight, con el riesgo de reportar la metilación linfocitaria⁽²⁸⁾.

Por ello, se explica el haber obtenido en nuestro estudio un OR menor al esperado y no significativo (OR= 6 - IC95% [0.72-49.8]). Este hallazgo podría deberse a limitaciones en la sensibilidad del ensayo MethyLight hecho por PCR en tiempo real para detectar la metilación de este gen en ADN circulante. Es probable que utilizando un mayor volumen de plasma para la extracción de cfDNA (más de 1ml) se pueda obtener resultados comparables con los de sangre total.

La asociación marginal del promotor metilado del gen *GSTP1* con los pacientes de cáncer de mama reportada en nuestro estudio es controversial: este gen codifica para una enzima involucrada en la detoxificación celular, que a su vez puede interactuar con quinasas reguladoras y así dirigir vías relacionadas a la diferenciación, proliferación y muerte celular. Por este motivo, participa en la proliferación del cáncer y la apoptosis. Curiosamente, *GSTP1* ha sido encontrado sin metilar y sobreexpresado en cáncer de pulmón y mama, por lo que se ha planteado un doble rol para este gen que dependería del tipo de cáncer⁽¹⁶⁾.

Este aparente doble rol podría deberse a la heterogeneidad de la metilación en las islas *CpG* que es propia y documentada del promotor de *GSTP1*⁽⁷³⁾. Esta heterogeneidad de metilación debería ser tomada en cuenta en el diseño del estudio, pues podría contribuir a la variabilidad de los resultados obtenidos en la metilación de *GSTP1* de los diferentes estudios revisados para esta tesis^(16,72).

Evaluar esta heterogeneidad necesitaría de otro enfoque en la técnica y será motivo de investigaciones posteriores. Aún no se ha reportado heterogeneidad para otros marcadores, como *RARβ2*, por ejemplo, pero es un precedente a tener en cuenta para la técnica MethyLight ante la posibilidad de mostrar una representación menor de la metilación reportada en controles y pacientes.

Respecto a la amplificación del promotor metilado de estos genes en los controles, se puede comparar los resultados obtenidos en nuestra investigación con los de Fujita et al. por haberse realizado la amplificación con los mismos cebadores que ese estudio. En dicha investigación, el promotor metilado de

GSTP1 amplificó para dos controles y *RARβ2* fue el que mantuvo la sensibilidad más alta, sin amplificar en el grupo control⁽⁵⁾.

Sin embargo, es común encontrar un bajo grado de metilación en los controles para *RARβ2* y *GSTP1*, como se ha visto en estudios anteriores.(15,73) Esto sería indicativo de niveles de metilación normal en las células debido a factores ambientales⁽⁵⁾.

Por otra parte, el trabajo de Brooks et al. reporta la presencia de falsos positivos en la metilación de los controles⁽⁶⁹⁾. Estos fueron confirmados como normales al realizarse el secuenciamiento Sanger de estos amplicones, obteniéndose secuencias sin metilar. Puede que este efecto sea propio de la sensibilidad de la técnica Sanger para discriminar la presencia de una mutación que esté por debajo del 25% en la muestra, a diferencia de la PCR en tiempo real que tiene una sensibilidad mayor (10%)⁽⁷⁴⁾.

En la presente investigación no se realizó el secuenciamiento de los amplicones obtenidos en los controles debido a la escasa disponibilidad del ADN convertido por bisulfito y porque estas amplificaciones mostraron curvas robustas y Ct (ciclo en el que se cruza el umbral) por debajo de los 45 ciclos de PCR. Debido a que la mayoría de estudios incluyen pocos controles, los patrones normales de metilación de las mujeres sanas han sido poco estudiados⁽³⁴⁾. De forma interesante, en el presente estudio se observó una asociación en el límite de la significancia entre la metilación del promotor de *RARβ2* (cuantitativo y cualitativo) y el estado hormonal pre menopáusico ($p=0.05$) de los controles. Este grupo de mujeres pre menopáusicas con metilación de *RARβ2* podría haber estado expuestas a hormonas como el estradiol, común en los anticonceptivos hormonales⁽⁷⁵⁾.

Esta posibilidad se suma a los factores del desarrollo hormonal de cada participante (edad de menarquia, edad de embarazo exitoso, lactancia materna) que no fueron considerados como criterios de inclusión al momento de enrolarse en el estudio y podrían explicar en parte la presencia de *RARβ2* metilado⁽⁷⁶⁾. La evidencia presentada en el metaanálisis de *RARβ2*⁽¹⁵⁾, unida a los resultados obtenidos en el presente trabajo en el OR ajustado para este marcador, llevarían

a pensar que estas mujeres del grupo control pueden tener un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama después de la menopausia.

Por otra parte, el promotor metilado del gen *GSTP1* no fue asociado a ninguna característica evaluada en los controles, considerando el PMR en su versión cuantitativa y cualitativa. Además, podría esperarse encontrar la metilación de *GSTP1* en controles por exposición a infecciones virales, inflamación y exposición a químicos⁽¹⁶⁾, aspectos que suelen ser más probables con la edad y el tipo de actividades de las personas evaluadas. Estos aspectos no fueron tomados en cuenta en el diseño del estudio y podrían contribuir como factores de confusión.

Seguidamente se estudió la asociación de las características clínicas de los pacientes con el PMR de los genes *RARβ2* y *GSTP1* en valores cualitativos. De acuerdo a la bibliografía, el PMR posee una distribución bimodal que puede analizarse con puntos de corte de 4% y 10% para establecer una metilación biológicamente significativa (pérdida de función del gen)^(59,77).

No se encontró asociación entre el valor PMR de *RARβ2* y las variables clínico-patológicas de los pacientes. Este hallazgo es acorde al metaanálisis de Fang et al. donde se señala que no hay asociación entre *RARβ2* metilado y el estadio del cáncer inicial y tardío (I y II vs III y IV)⁽¹⁵⁾.

Esto se debe a que la metilación del promotor de *RARβ2*, al ser una modificación inicial en la carcinogénesis, ocurre en una etapa muy temprana del cáncer de mama y no durante su desarrollo⁽¹⁵⁾. Los hallazgos del presente estudio confirmarían esta característica, al no encontrarse asociación de *RARβ2* metilado con los estadios del cáncer. Tampoco se obtuvieron diferencias entre la presencia de metilación de *RARβ2* y las variables patológicas como ER, PR y HER2, en concordancia con estudios anteriores^(5,68).

De forma similar, no se encontró asociación entre la metilación del promotor de *GSTP1* y las variables clínico-patológicas de los pacientes. La ausencia de asociación entre la metilación de *GSTP1* y los estadios tumorales se explica debido a que la hipermetilación de *GSTP1* es un evento temprano en el

desarrollo del cáncer de mama y se mantiene con la progresión de la enfermedad, por lo tanto, no hay un número mayor de pacientes metilados en los estadios iniciales con respecto a los finales⁽¹⁶⁾. Aunque se ha reportado asociación entre *GSTP1* metilado y tumores *HER2* positivos en muestras provenientes de suero⁽⁷⁸⁾, no se encontró la misma asociación en este caso ni con los otros receptores como ER y PR.

A pesar que no se obtuvo amplificación del promotor metilado de *SFRP1*, se ha reportado que la metilación de este gen es un factor predictivo de tumores mamarios ER negativos⁽⁷⁵⁾. Es interesante plantear a futuro la búsqueda de este promotor metilado en biopsias de tejido mamario disponible de las pacientes ER negativo para corroborar la asociación descrita en la muestra estudiada.

Al considerar como una sola variable a la amplificación en conjunto de los promotores de los genes *RARβ2* + *GSTP1*, se encontró asociación significativa entre la metilación de los genes en conjunto y la presencia de cáncer de mama ($p=0.0081$). Comparando estos resultados con el trabajo de *Fujita et al.*⁽⁵⁾, de donde se obtuvieron los cebadores empleados, al combinar la metilación de *GSTP1* y *RARβ2* se obtenía una cobertura del 10% de las muestras estudiadas.

A pesar de las limitaciones de cantidad de ADN disponible, en el presente estudio se encontró el 33,3% de pacientes metilados para ambos promotores (*RARβ2* + *GSTP1*). Es posible que las diferencias en la frecuencias de los genes metilados se deban al origen del ADN plantilla y la técnica utilizada (ADN de suero y técnica OS-MSP en el caso de *Fujita et al.*)⁽⁷⁾.

El porcentaje de metilación encontrado para ambos biomarcadores (*RARβ2+GSTP1*) es consistente con lo que reporta la bibliografía respecto al empleo del promotor metilado de *GSTP1*, que demuestra una alta especificidad como marcador pero una baja sensibilidad al ser evaluado en pacientes y controles, por lo que se recomienda su uso en combinación con otros marcadores⁽¹⁶⁾.

Seguidamente, al considerarse metilación positiva a la amplificación en conjunto de *RARβ2* y *GSTP1* para calcular la razón de momios, se obtuvieron valores de OR significativos en todos los escenarios: Las pacientes con cáncer de mama tuvieron una probabilidad cinco veces mayor de haber sido expuestas a la metilación de *RARβ2* y *GSTP1* que las controles. Este riesgo es 6.60 veces mayor si se ajusta para los efectos de la edad y el estado hormonal. Esta tendencia se mantiene en el punto de corte de 4% y de 10% de metilación.

Todavía no se conoce si las alteraciones epigenéticas encontradas en tumores son producto de fenómenos al azar que se acumulan con la edad y se seleccionan positivamente durante el desarrollo del cáncer o si los cambios que originan el cáncer se dan por la desregulación de los mecanismos epigenéticos de la célula tumoral⁽¹³⁾.

Se ha demostrado la plasticidad del epigenoma al observar variaciones atribuidas a la edad de la persona y en ausencia de cáncer. Los cambios propios de la edad que influyen en la metilación podrían resultar en el desarrollo de la enfermedad y además perpetuar el proceso de envejecimiento del tejido mamario al silenciar la expresión y actividad de proteínas importantes⁽⁷⁹⁾.

En el grupo control, es interesante que se mantenga la asociación encontrada entre el estado hormonal pre menopáusico y la metilación del promotor (*RARβ2+GSTP1*). La metilación de estos genes no ha sido bien estudiada en la población control, por lo cual se plantea que estas mujeres metiladas hayan estado expuestas a anticonceptivos hormonales, factores del desarrollo hormonal (edad de menarquia, edad de embarazo exitoso, lactancia materna), infecciones virales, inflamación y exposición a químicos⁽¹⁶⁾. En suma, factores ambientales que podrían influir en la metilación de los genes estudiados y con el tiempo, aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama en el futuro.

El efecto cualitativo sinérgico de ambos genes (*RARβ2+GSTP1*) intensifica la asociación en los controles con la edad menor a 50 años ($p= 0,0140$). La edad es el factor de riesgo demográfico más importante para padecer cáncer de mama. La metilación del ADN aberrante es un evento temprano en el desarrollo

de esta enfermedad y estaría relacionado al riesgo mayor de tener cáncer de mama al envejecer, pero esta asociación no está bien caracterizada⁽⁷⁹⁾.

Se evidenció una asociación significativa de una mayor metilación de estos genes y la edad avanzada en las pacientes ($p=0,0496$). Esta asociación se mantuvo al utilizar el PMR cualitativo para los tres puntos de corte considerando a las pacientes con cáncer de mama, mayores de 55 años. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que los cambios en la metilación y la expresión genética propios de la edad podrían explicar, en parte, el hecho que la edad avanzada sea un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama⁽⁸⁰⁾.

Asimismo, se conoce que las mujeres sanas en el grupo etario con riesgo más alto de tener cáncer de mama exhiben también hipermetilación en el tejido mamario sano en los genes supresores de tumores como *RAR β 2*, a comparación de las mujeres con bajo riesgo de desarrollar la enfermedad⁽⁷⁹⁾. En el presente estudio, se encontró esta asociación con las mujeres sanas en el grupo de 40 a 55 años.

De forma interesante, se ha visto que las islas *CpG* metiladas por el envejecimiento son las mismas que están hipermetiladas en el cáncer de mama, aunque en porcentaje moderado, lo cual sugiere que la metilación por la edad precede el desarrollo del cáncer o es un fuerte indicador de riesgo para la carcinogénesis de estas células⁽⁸⁰⁾. Esta metilación intermedia puede reflejar un incremento en la población de células que adquieren la predisposición para la transformación neoplásica en el tejido normal. Estos cambios en el tejido mamario sano contribuirían a aumentar el riesgo de cáncer de mama con el paso de los años⁽⁷⁹⁾.

Se desconoce hasta qué punto los cambios de la metilación son los propios de un tejido sano y cuáles cambios llevan al desarrollo del cáncer, sin embargo, la hipermetilación de diferentes promotores es una señal característica de este cambio⁽⁸⁰⁾.

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan evidencia para proponer el seguimiento de las mujeres del grupo control que presentaron metilación en *RARβ2* y/o *GSTP1* como siguiente paso para los próximos estudios, con el fin de entender el mecanismo de esta asociación.

Existen métodos para estimar la edad celular a partir de sus patrones de metilación, que son responsables en parte del incremento de la tasa de errores en el ADN cuando las células proliferan. Las células de tumores mamarios tienen una edad epigenética acelerada y este avance es mucho mayor en los tumores ER y PR positivos comparados con los tumores ER y PR negativos⁽³²⁾. En contraste, en el grupo de las pacientes se encontró asociación significativa entre la metilación de *GSTP1+RARβ2* y el receptor de estrógeno negativo. Esta asociación se mantuvo en los tres puntos de corte.

Al comparar este resultado con el estudio de Fujita et al.⁽⁵⁾, de donde se obtuvieron los cebadores y la sonda para *GSTP1* y *RARβ2*, fue la metilación de *GSTP1* la asociada con tumores ER negativos. Es probable que el efecto aditivo de *GSTP1+RARβ2* haya potenciado esta asociación en nuestro estudio al reunir más pacientes metilados. El promotor metilado de *GSTP1* ha sido asociado anteriormente con tumores ER positivos⁽⁸¹⁾.

Existe la posibilidad que los tumores ER negativos liberen *cfDNA* tumoral al torrente sanguíneo en mayor cantidad que los ER positivos, aunque el mecanismo de este proceso aún no se haya descrito⁽⁵⁾. Se ha reportado que los tumores ER negativos tienen una tasa de respuesta al tratamiento menor cuando se encuentran metilado el promotor de *GSTP1*⁽⁸²⁾.

Adicionalmente, se encontró que la metilación en conjunto de *GSTP1+RARβ2* metilado está asociado al receptor de progesterona negativo en las pacientes. El PR es el producto final de la acción del estrógeno y su pérdida significa un receptor de estrógeno no funcional. Adicionalmente, la señalización aberrante de los factores de crecimiento resulta en una reducción en la expresión de PR. En combinación, la pérdida de expresión de PR está asociada con características malignas de consideración que conllevan a un pronóstico pobre⁽⁸³⁾.

Encontrar el receptor de progesterona negativo en nuestro estudio podría interpretarse como es una señal de riesgo más alto de recurrencia, de tal forma que la expresión de PR se comporta más como un factor pronóstico, pero no predictivo⁽⁸³⁾.

Es la primera vez que se reporta una asociación de este tipo en nuestra población y hace falta aún describir un mecanismo por el cual sea posible explicar la asociación de estos marcadores, pero por el momento, el receptor de progesterona negativo y la metilación de al menos uno de estos genes compartirían las características de mal pronóstico y riesgo de recurrencia⁽⁸³⁾.

En lo concerniente a la utilidad de estos biomarcadores en la práctica clínica, se debe considerar primero el criterio de sensibilidad. El promotor metilado de *RARβ2* presento una sensibilidad de 21,57%, mayor que la del promotor metilado de *GSTP1*. En conjunto, lograron la mayor sensibilidad (33.3%). Estos valores evidencian las dificultades del ensayo MethyLight para clasificar correctamente a las pacientes con cáncer de mama a partir de ADN libre circulante convertido por bisulfito, situación que podría mejorarse con un mayor volumen de plasma inicial.

Esto se explica por el límite de la detección de la metilación para el ensayo MethyLight que fue determinado por Pedersen et al, donde se realizó una PCR que cubría seis islas CpG. El valor mínimo detectado en el ensayo fue de 1 a 2 copias de secuencia de ADN metilado. Estos resultados fueron obtenidos gracias a la curva de calibración de un ADN control 100% metilado donde se obtuvo una buena linealidad en 20pg de ADN y una sensibilidad de hasta 5pg de ADN metilado en la reacción⁽⁸⁴⁾.

De forma similar, en el presente estudio, el menor valor de masa de ADN detectado para la amplificación de *COL2A1* fue de 10pg por reacción, suficiente para detectar un mínimo de 1 a 2 copias genómicas de ADN metilado por ensayo. Es importante mencionar este límite porque el ensayo MethyLight en PCR tiempo real puede resolver sin problemas el ADN metilado proveniente de tumor, pero cuando este ADN proviene de plasma sanguíneo la probabilidad de encontrar

estas copias de interés disminuye considerablemente, en particular debido al grado de fragmentación del *cfDNA* de origen tumoral-apoptótico, que se encuentra en longitudes de 180-360pb⁽⁴⁾.

Respecto a la especificidad del ensayo MethyLight, el promotor metilado de *GSTP1* fue el que obtuvo una especificidad más alta (98.04%), seguido del promotor metilado de *RARβ2* (92.16%) y ambos genes combinados (90.2%). Estos resultados indican que la prueba puede confirmar a los individuos enfermos. Sin embargo, como la metilación fue encontrada en controles, no sería exclusiva de la célula tumoral y esto perjudica la especificidad de la prueba. Referente a la validez del ensayo MethyLight como prueba diagnóstica, el valor predictivo positivo (VPP) es muy bajo.

La probabilidad de encontrar una persona que sufre la enfermedad en caso de un resultado positivo es de 0.0036 debido a la baja prevalencia de la enfermedad, siendo *GSTP1* el de mayor VPP. En el caso del valor predictivo negativo, la proporción de los resultados negativos que corresponden a las personas sanas es superior al 99% para *RARβ2*, *GSTP1* y ambos genes.

Considerando la prevalencia del cáncer de mama en el Perú en 0.0006 en un periodo de 5 años (GLOBOCAN 2018), la obtención de un resultado negativo en el ensayo MethyLight no permitiría descartar con seguridad la metilación asociada a la enfermedad, mientras que un resultado positivo no será suficiente para confirmar el diagnóstico, pero podrá ser usado como un indicio para pruebas adicionales. Esto último es válido para *RARβ2* y *GSTP1*, siendo los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos comparables con las revisiones consultadas^(15,16,72).

CONCLUSIONES

Se estableció el nivel de metilación del promotor (PMR) de los genes *RARβ2*, *SFRP1* y *GSTP1* a partir de *cfDNA* obtenido de plasma sanguíneo, observándose diferencias marginalmente significativas entre controles y pacientes para el promotor metilado de los genes *RARβ2* y *GSTP1*. No se encontró el promotor metilado de *SFRP1* en la muestra.

Se encontró asociación significativa marginal entre la presencia del promotor metilado de *RARβ2* con el estado hormonal pre menopáusico del grupo control. No se encontró asociación entre el nivel de metilación del promotor de los genes estudiados y las demás características clínico-patológicas de los pacientes, debido a que la metilación es un evento temprano del desarrollo tumoral.

Los niveles de metilación combinado de los promotores de los genes *GSTP1* y *RARβ2*, estudiado como PMR cualitativo y cuantitativo, tuvo asociación significativa con la presencia del cáncer de mama, mostrándose como un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad.

El nivel de metilación combinado de los promotores de los genes *GSTP1* y *RARβ2* fue asociado con el estado hormonal pre menopáusico en controles, así como a la edad menor de 50 años, característica que podría aumentar el riesgo de estas mujeres a padecer cáncer de mama en el futuro. En el caso de las pacientes, el PMR combinado de estos genes fue asociado a una edad mayor de 55 años, al estado hormonal postmenopáusico y a tener receptor de estrógeno (ER) y progesterona (PR) negativo. Este hallazgo aporta a la evidencia que la metilación del promotor de estos genes es un indicador de mal pronóstico.

A pesar de su baja sensibilidad, se podría emplear el análisis del promotor metilado de *GSTP1+RARβ2* como biomarcadores de biopsia líquida, a manera de test de diagnóstico en estadios tempranos y como criterio de recomendación para pruebas adicionales en mujeres asintomáticas debido a su alta especificidad.

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar el estado de metilación del promotor (PMR) de los genes de *SFRP1*, *GSTP* y *RARβ2* en las muestras de tumores disponibles de los pacientes analizados para descartar la presencia de error tipo beta.

El ensayo MethyLight ha sido exitosamente estandarizado con el uso de la PCR tiempo real y está listo para ser trasladado al ensayo con PCR digital, que por su sensibilidad es el ideal para establecer el PMR en *cfDNA* proveniente de plasma sanguíneo.

La implementación de la detección de metilación del promotor por sonda MethyLight en un laboratorio de una universidad peruana abre la posibilidad de continuar con esta línea de investigación y realizar estudios de tipo cohorte para determinar la variación de los genes *GSTP1* y *RARβ2* en grupos de mujeres con riesgo alto de desarrollar cáncer de mama, para evaluar su idoneidad como biomarcadores de diagnóstico o recurrencia de la enfermedad.

El uso de las técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS) para estudiar el epigenoma abre la posibilidad de responder a preguntas de investigación básica necesarias para así diseñar la mejor estrategia de diagnóstico por biopsia líquida. Se recomienda estudiar la metilación por NGS e incluir una mayor concentración de ADN libre circulante con el fin de encontrar los biomarcadores más adecuados en la población peruana.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. MINISTERIO DE SALUD DEL PERU. Analisis de la situacion del cancer en el Peru, 2013. Lima: Ministerio de Salud; 2013.
2. Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Bürki N, Diesch C, et al. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood- based test in breast cancer. PLoS One. 2011;6(1).
3. Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. Br J Cancer. 2013 Jun;108(11):2205–40.
4. Warton K, Samimi G. Methylation of cell-free circulating DNA in the diagnosis of cancer. Front Mol Biosci [Internet]. 2015;2(April):13. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4428375&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Fujita N, Nakayama T, Yamamoto N, Kim SJ, Shimazu K, Shimomura A, et al. Methylated DNA and total DNA in serum detected by one-step methylation-specific pcr is predictive of poor prognosis for breast cancer patients. Oncol. 2012;83(5):273–82.
6. Szyf M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. Genome Med [Internet]. 2012;4(3):26. Available from:
<http://genomemedicine.com/content/4/3/26>
7. Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M, Miyake T, Iwamoto T, Kim SJ, et al. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR??2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. Breast Cancer Res Treat. 2012;132(1):165–73.
8. Dong X, He H, Zhang W, Yu D, Wang X, Chen Y. Combination of serum RASSF1A methylation and AFP is a promising non-invasive biomarker for HCC patient with chronic HBV infection. Diagn Pathol. 2015 Aug;10.

9. Agostini M, Enzo M V., Bedin C, Belardinelli V, Goldin E, Del Bianco P, et al. Circulating cell-free DNA: A promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients. *Cancer Biomarkers*. 2012;11(2–3):89–98.
10. Dallol A, Al-ali W, Al-shaibani A, Al-mulla F. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues. 2011;724(1). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-055-3>
11. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2000 Apr;28(8):e32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.8.e32>
12. Esteller M. DNA Methylation, Epigenetics and Metastasis. In: *DNAMethylation, Epigenetics and Metastasis*. 2005. p. 2.
13. Laird PW. Cancer epigenetics. *Handb Epigenetics*. 2005;14(1):521–34.
14. Jeong YJ, Jeong HY, Bong JG, Park SH, Oh HK. Low methylation levels of the SFRP1 gene are associated with the basal-like subtype of breast cancer. *Oncol Rep*. 2013;29(5):1946–54.
15. Fang C, Jian ZY, Shen XF, Wei XM, Yu GZ, Zeng XT. Promoter methylation of the retinoic acid receptor beta2 (RAR β 2) is associated with increased risk of breast cancer: A prisma compliant meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(10):1–14.
16. Gurioli G, Martignano F, Salvi S, Costantini M, Gunelli R, Casadio V. GSTP1 methylation in cancer: A liquid biopsy biomarker? *Clin Chem Lab Med*. 2018;1–16.
17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell [Internet]*. 2000;100(1):57–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
18. Widschwendter M, Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*. 2002 Aug;21(35):5462–82.
19. Kaminska M, Ciszewski T, Lopacka-Szatan K, Miotla P, Staroslawska E.

- Breast cancer risk factors. *Prz menopauzalny = Menopause Rev.* 2015;14(3):196–202.
20. Zelle SG, Vidaurre T, Abugattas JE, Manrique JE, Sarria G, Jeronimo J, et al. Cost-effectiveness analysis of breast cancer control interventions in Peru. *PLoS One.* 2013;8(12).
 21. Aravanis AM, Lee M, Klausner RD. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell* [Internet]. 2017;168(4):571–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.030>
 22. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26(Supplement 5):v8–30.
 23. Knutson TP, Lange CA. Tracking Progesterone Receptor-Mediated Actions in Breast Cancer. 2013;31(9):1713–23.
 24. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* (80-) [Internet]. 2001 Aug;293(0036–8075 (Print)):1068–70. Available from: <file:///u/Literature/Articles/jones2001.pdf>
 25. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999;99(3):247–57.
 26. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000;24(2):132–138.
 27. Soares J, Pinto AE, Cunha C V., André S, Barão I, Sousa JM, et al. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer.* 1999 Jan;85(1):112–8.
 28. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008;March(358):1148–59.
 29. Witte T, Plass C, Gerhauser C. Pan-cancer patterns of DNA methylation.

- Genome Med [Internet]. 2014;6(8):66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4254427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(2):157–162.
 31. Khakpour G, Pooladi A, Izadi P, Noruzinia M, Tavakkoly Bazzaz J. DNA methylation as a promising landscape: A simple blood test for breast cancer prediction. *Tumor Biol*. 2015;36(7):4905–12.
 32. Langevin SM, Pinney SM, Leung Y-K, Ho S-M. Does epigenetic drift contribute to age-related increases in breast cancer risk? *Epigenomics* [Internet]. 2014;6(4):367–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4235676&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 33. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. From The Cover: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2005;102(30):10604–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500398102>
 34. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(6):1187–97.
 35. De Groot JS, Pan X, Meeldijk J, Van Der Wall E, Van Diest PJ, Moelans CB. Validation of DNA promoter hypermethylation biomarkers in breast cancer - A short report. *Cell Oncol*. 2014;37(4):297–303.
 36. Receptors, Retinoic Acid - MeSH - NCBI.
 37. Sharma G, Mirza S, Parshad R, Srivastava A, Datta S. Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci* [Internet]. 2010;87(3–4):83–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.05.001>
 38. Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R. Detection of RASSF1A and RAR?? hypermethylation in serum DNA from breast

- cancer patients. *Epigenetics*. 2006;1(2):88–93.
39. Esteller M. *Epigenetics in Biology and Medicine*. 2009. 312 p.
 40. Shen X, Wang J, Yan X, Ren X, Wang F, Chen X, et al. Predictive value of GSTP1 Ile105Val polymorphism in clinical outcomes of chemotherapy in gastric and colorectal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Jun;77(6):1285–302.
 41. Klajic J, Fleischer T, Dejeux E, Edvardsen H, Warnberg F, Bukholm I, et al. Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer* [Internet]. 2013;13:456. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3819713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 42. Huang J, Tan P-H, Thiyagarajan J, Bay B-H. Prognostic Significance of Glutathione S-Transferase-Pi in Invasive Breast Cancer. *Mod Pathol*. 2003 Jun;16(6):558–65.
 43. Harada T, Yamamoto E, Yamano HO, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, et al. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. *Cancer Prev Res*. 2014;7(10):1002–10.
 44. Park SY, Kwon HJ, Lee HE, Ryu HS, Kim SW, Kim JH, et al. Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression. *Virchows Arch*. 2011;458(1):73–84.
 45. Loke SY, Lee ASG. The future of blood-based biomarkers for the early detection of breast cancer. *Eur J Cancer* [Internet]. 2018;92:54–68. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.12.025>
 46. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *Comptes Rendus des Seances la Soc Biol ses Fil*. 1948;(142):241–3.
 47. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(6):426–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3066>

48. Sheridan C. Grail to pour \$1 billion into blood test to detect early cancer. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2017;35(2):101–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0217-101>
49. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner GJ, Spiegelman D, et al. Precision and Performance Characteristics of Bisulfite Conversion and Real-Time PCR (MethyLight) for Quantitative DNA Methylation Analysis. *J Mol Diagnostics*. 2006;8(2):209–17.
50. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2353–64.
51. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1992;89(5):1827–31. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.5.1827>
52. QIAGEN. EpiTect® Bisulfite Handbook. 2006.
53. Holmes EE, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, et al. Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine. *PLoS One*. 2014;9(4).
54. Li L-C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002;18(11):1427–31.
55. Eads CA. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000;28(8):e32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.8.e32>
56. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
57. COL2A1 Symbol Report | HUGO Gene Nomenclature Committee.
58. Barat-Houari M, Sarrabay G, Gatinois V, Fabre A, Dumont B, Genevieve D, et al. Mutation Update for *COL2A1* Gene Variants Associated with Type II Collagenopathies: HUMAN MUTATION. *Hum Mutat*. 2016 Jan;37(1):7–

- 15.
59. Dallool A, Al-Ali W, Al-Shaibani A, Al-Mulla F. Analysis of DNA Methylation in FFPE Tissues Using the MethyLight Technology. In: Al-Mulla F, editor. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 191–204.
60. Widschwendter M, Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, Fiegl H, Marth C, et al. Association of Breast Cancer DNA Methylation Profiles with Hormone Receptor Status and Response to Tamoxifen. *Cancer Res* [Internet]. 2004;64(11):3807–13. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-03-3852>
61. Thermo Fisher Scientific Inc. Nanodrop Lite quick reference Guide. 2011.
62. MethyLight E, Rox PCR, Kit V. April 2008 EpiTect ® MethyLight PCR Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. 2008;(December 2005).
63. Kuulasmaa T. Oligo Analyzer. Kuopio, Finland; 2002.
64. Qiagen. Rotor Gene Q Pure Detection Series Software.
65. Microsoft Corp. Excel 2013. 2013.
66. StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP.
67. Buhmeida A, Merdad A, El-Maghrabi J, Al-Thobaiti F, Ata M, Bugis A, et al. RASSF1A methylation is predictive of poor prognosis in female breast cancer in a background of overall low methylation frequency. *Anticancer Res*. 2011;31(9):2975–81.
68. Fujita N, Kagara N, Yamamoto N, Shimazu K, Shimomura A, Shimoda M, et al. Methylated DNA and high total DNA levels in the serum of patients with breast cancer following neoadjuvant chemotherapy are predictive of a poor prognosis. *Oncol Lett*. 2014;8(1):397–403.
69. Brooks J, Cairns P, Shore RE, Klein CB, Wirgin I, Afanasyeva Y, et al.

- Cancer Cases : Results of a Nested Case-Control Study. 2010;34(6):717–23.
70. Pharo HD, Honne H, Vedeld HM, Dahl C, Andresen K, Liestøl K, et al. Experimental factors affecting the robustness of DNA methylation analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep33936>
 71. Sandoval JR, Salazar-Granara A, Acosta O, Castillo-Herrera W, Fujita R, Pena SDJ, et al. Tracing the genomic ancestry of Peruvians reveals a major legacy of pre-Columbian ancestors. *J Hum Genet* [Internet]. 2013;58(9):627–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2013.73>
 72. Fang C, Wei X-M, Zeng X-T, Wang F-B, Weng H, Long X. Aberrant GSTP1 promoter methylation is associated with increased risk and advanced stage of breast cancer: a meta-analysis of 19 case-control studies. *BMC Cancer* [Internet]. 2015;15(1):920. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1926-1>
 73. Grenaker Alnaes GI, Ronneberg JA, Kristensen VN, Tost J. Heterogeneous DNA methylation patterns in the GSTP1 promoter lead to discordant results between assay technologies and impede its implementation as epigenetic biomarkers in breast cancer. *Genes (Basel)*. 2015;6(3):878–900.
 74. Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: Searching for the ideal method - Commentary on Hoshi et al., p. 4974. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):4954–5.
 75. Widschwendter M, Apostolidou S, Raum E, Rothenbacher D, Fiegl H, Menon U, et al. Epigenotyping in peripheral blood cell DNA and breast cancer risk: A proof of principle study. *PLoS One*. 2008;3(7):1–9.
 76. Xu Z, Bolick SCE, Deroo LA, Weinberg CR, Sandler DP, Taylor JA. Epigenome-wide association study of breast cancer using prospectively collected sister study samples. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(10):694–700.
 77. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Cantor M, Kirkner GJ, Spiegelman D, et al. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion

- and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J Mol Diagnostics*. 2006;8(2):209–17.
78. Matuschek C, Bölke E, Lammering G, Gerber PA, Peiper M, Budach W, et al. Methylated APC and GSTP1 genes in serum DNA correlate with the presence of circulating blood tumor cells and are associated with a more aggressive and advanced breast cancer disease. *Eur J Med Res [Internet]*. 2010;15:277–86. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3351951&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
79. Johnson KC, Koestler DC, Cheng C, Christensen BC. Age-related DNA methylation in normal breast tissue and its relationship with invasive breast tumor methylation. *Epigenetics*. 2014;9(2):268–75.
80. Song M-A, Brasky TM, Weng DY, McElroy JP, Marian C, Higgins MJ, et al. Landscape of genome-wide age-related DNA methylation in breast tissue. *Oncotarget*. 2017;8(70):114648–62.
81. Sunami E, Shinozaki M, Sim MS, Nguyen SL, Vu AT, Giuliano AE, et al. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Res*. 2008;10(3):1–11.
82. Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, Kim SJ, et al. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci*. 2012;103(5):913–20.
83. Ono M, Tsuda H, Yoshida M, Shimizu C, Kinoshita T, Tamura K. Prognostic Significance of Progesterone Receptor Expression in Estrogen-Receptor Positive, HER2-Negative, Node-Negative Invasive Breast Cancer With a Low Ki-67 Labeling Index. *Clin Breast Cancer [Internet]*. 2017;17(1):41–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2016.06.012>
84. Pedersen SK, Mitchell SM, Graham LD, McEvoy A, Thomas ML, Baker RT, et al. CAHM, a long non-coding RNA gene hypermethylated in colorectal neoplasia. *Epigenetics*. 2014;9(8):1071–82.

ANEXOS

1. Instrumentos de recolección de datos

Rotor Gene Q 5plex Platform, cat. No. 9001570 cuenta con la validación del ENFSI (The European Network of Forensic Science Institutes) y el SWGDAM (The Revised Validation Guidelines of the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods). Además, el software que analiza los datos brutos obtenidos de la PCR en tiempo real genera los informes de resultados con información sobre la validez o la invalidez del ensayo y de muestras individuales.

2. Tablas suplementarias

Tabla S1. Ubicación y extensión de las islas CpG de los genes estudiados

Gen	Ubicación de la isla CpG	Extensión de la Isla CpG
<i>GSTP1</i>	GRCh37.p13 Cromosoma11	[67350833 - 67351740]
<i>RARβ2</i>	GRCh37.p13 Cromosoma 3	[25465000 - 25480000]
<i>SFRP1</i>	GRCh37.p13 Cromosoma 8	[41165663 - 41167627]

Tabla S2. Cebadores y sondas usadas para amplificar el promotor metilado de los genes RARB2, GSTP1 y SFRP1 en el ensayo Methylight

GEN	SONDA	FORWARD 5'->3'	FORWARD 5'->3'	AMPLICON ESPECIFICO	TAMAÑO
COL2A1	CCTTCATTCTAACCCCAATACCTATCCACACCTCTAAA	GGGAAGATGGGATAGGATAGAAGGGAATAT	TCTAACAAATTATAAACTCCAACCACCAA	GGGAAGATGGGATAGAAGGGAATATATTTTAGGGT GGGATAGGATTTGGGTTAGAA TGAAAGTTTGGTGTT GGAGTTTATAA TTGTAGA	92
GSTP1	ATAAGGTTCCGAGGTCGCGAGGTTTCGT	CGTCGTGATTTAGTATTGGGGC	CTAATAACGAAAACTACGACGACGAAA	CGTCGTATTTAGTATTGGGGGGA GCGGGCGGGAT TATTTTTATAAGGTCGGAGGTCGCGAGGTTTCGTTG GAGTTTCGTGTCGTA GTTTTTCGTATTAG	105
RARB2	AGGCGTAAAGGAGAGAA GTTG GTTTA	GAATATCGTTTTTTAAGTTAAGTCGTC	GAAACGCTACTCCTAACTCACC	GAATATCGTTTTTTAAGTTAAGTCGCTAATAAAA GGCGTAAAGGAGAGAA GTTTCGTGTTTAAACGTGAGTT AGGAGTAGCGTTTC	89
SFRP1	CGTGGTAAACGAGTGCG	CGTGATAGTATGCGAGTAA TTTGG	AATAAAACTACCTCCTCCCA CGTA	CGTGATAGTATGCGAGTAA TTTTCGGGTTTTTA GTTTTT AGTATCGGGA TTTTAGCGCGGGCGGGCGTA GGGTGG CGCGGGTTTTTTTGTAGTTTCGTCGGGGGATGGAGGG GGCGGTTTCGCGTA CGTGGGA GGA GGTA GTTTTTT	148

Primers diseñados para ADN convertido con Bisulfito. Los primers metilados en negrita son los diseñados en Fujita, 2011 (16). El resto fueron diseñados para este estudio.

Tabla S3. Condiciones de amplificación para el ensayo Methylight

Reactivo	Concentración	Volumen (ul)
Agua libre de nucleasas	-	4
Epitect Mehtylight Qiagen	2X	10
Primer Probe Mix	10X	2
ADN convertido por bisulfito	-	4

Paso	Temperatura	Tiempo
Hold	95°C	5 minutos
Denaturación	95°C	15 segundos
Anillamiento	60°C	30 segundos
Extensión	72°C	30 segundos
Número de ciclos		50 ciclos
Adquisición		Durante extensión

Tabla S4. Muestra repetidas en el Ensayo Methylight

Muestra	N°Ensayo	Fecha	N° Ensayo repetición	Fecha
C89	8	04/12/2017	11	06/02/2018
C97	9	04/12/2017	11	06/02/2018
C98	9	04/12/2017	11	06/02/2018
C112	15	05/09/2018	16	05/09/2018

3. Figuras suplementarias

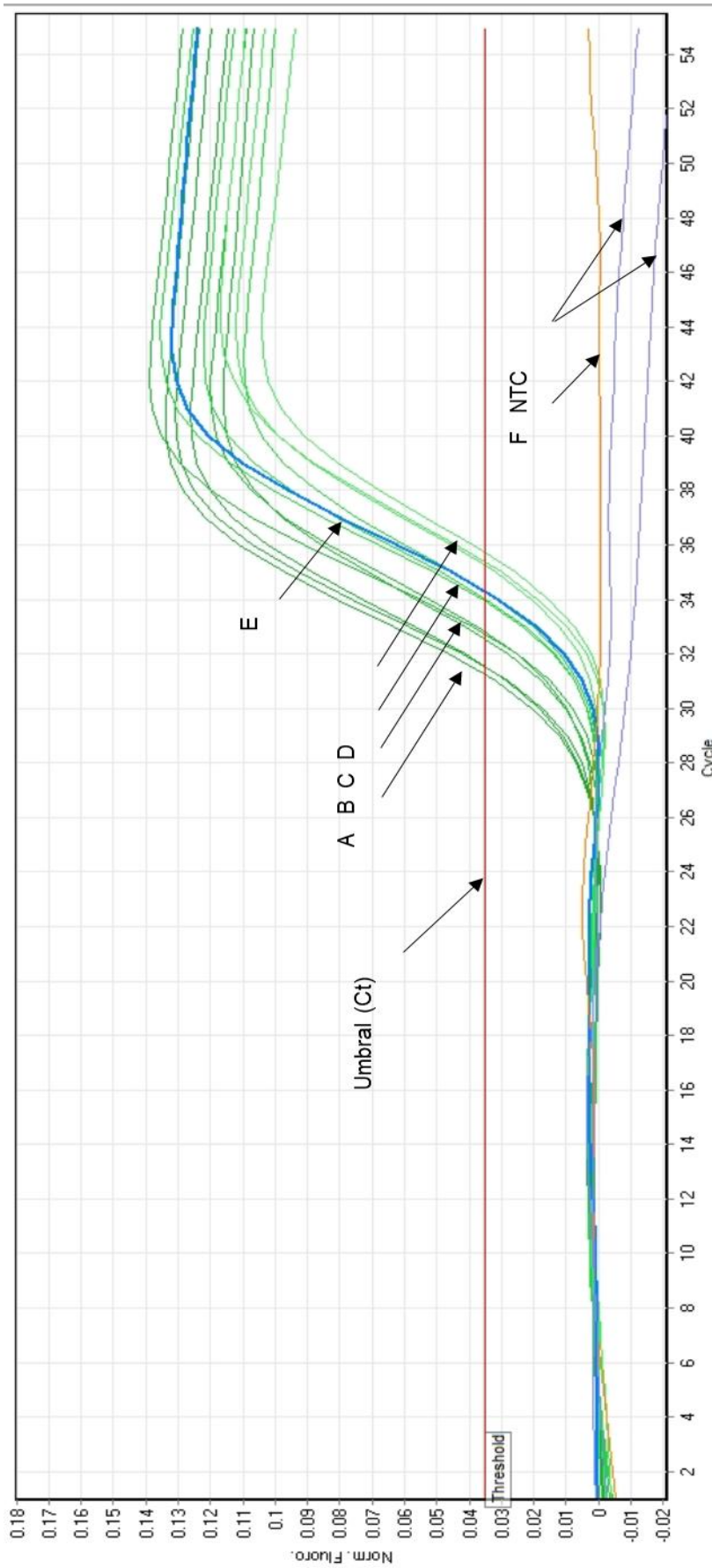


Figura S1. Ejemplo de ensayo MethyLight modelo para curva estándar del gen de referencia COL2A1

La amplificación de la curva estándar COL2A1 y los controles de reacción y las muestras se muestran como curvas coloreadas en la imagen. A: 8ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde; B: 4ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde; C: 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde; D: 1 ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito por triplicado en verde; E: 2 ng/reax de ADN 100% NO metilado convertido por bisulfito en anaranjado. F: 2 ng/reax de ADN 100% NO metilado NO convertido por bisulfito en anaranjado. F: 2 ng/reax de ADN 100% NO metilado NO convertido por bisulfito en anaranjado. NTC: control sin ADN en gris; Ct: ciclo umbral determinado por la curva estándar en el que las amplificaciones negativas deben romper en un solo punto antes de los 50 ciclos de reacción.

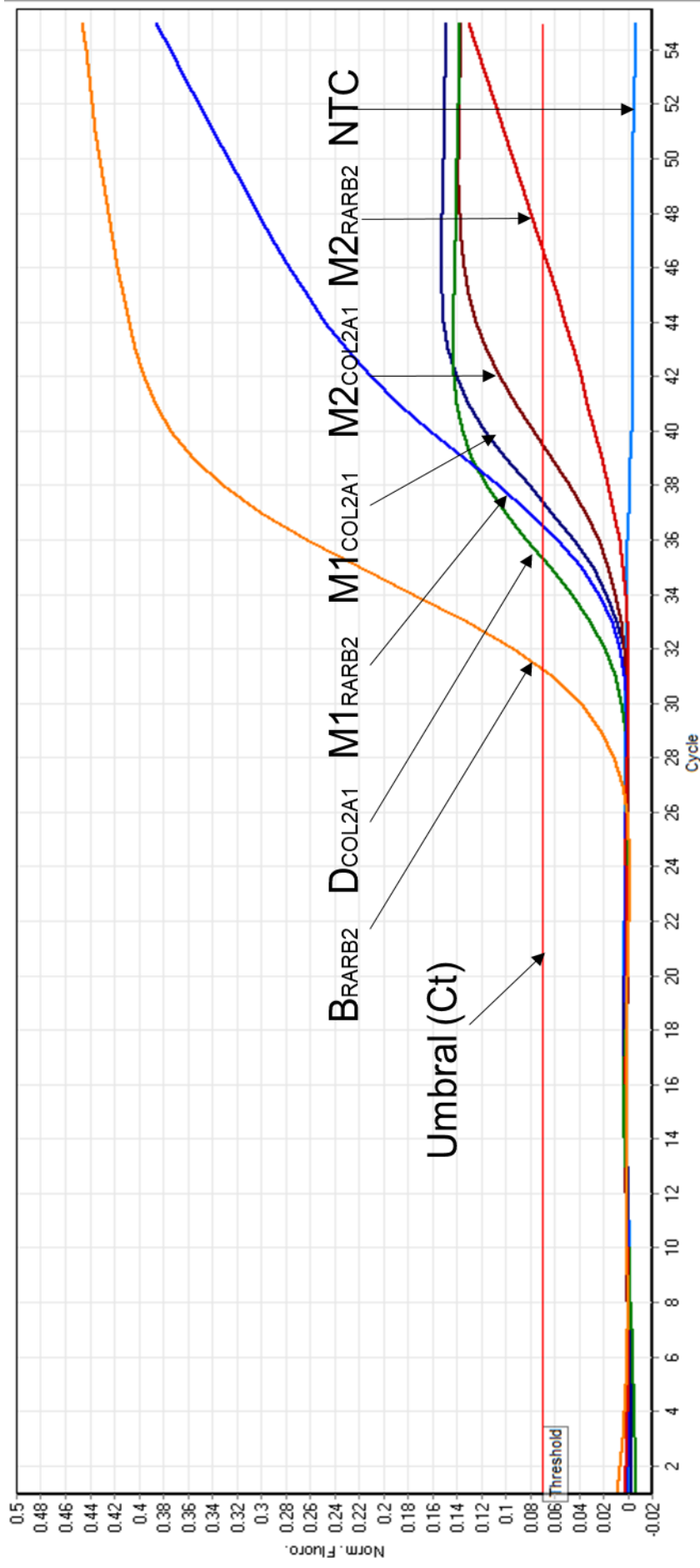


Figura S2. Ejemplo de ensayo MethyLight modelo para promotor metilado de gen RARB2

La amplificación de dos muestras para el gen de estudio RARB2 y el gen de referencia COL2A1, se muestran como curvas coloreadas en la imagen. M1 RARB2: Amplificación positiva para RARB2 de la muestra M1 en azulino; M2 RARB2: Amplificación negativa mayor de 45 ciclos para RARB2 de la muestra M2 en rojo claro; B RARB2: 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen RARB2 en naranja; M1 COL2A1: Amplificación positiva para COL2A1 de la muestra M1 en azul marino; M2 COL2A1: Amplificación positiva para COL2A1 de la muestra M2 en rojo oscuro; D COL2A1: 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen COL2A1 en verde; NTC: control sin ADN en gris; Ct: ciclo umbral determinado por la curva estándar en el que las amplificaciones negativas deben romper en un solo punto antes de los 50 ciclos de reacción.

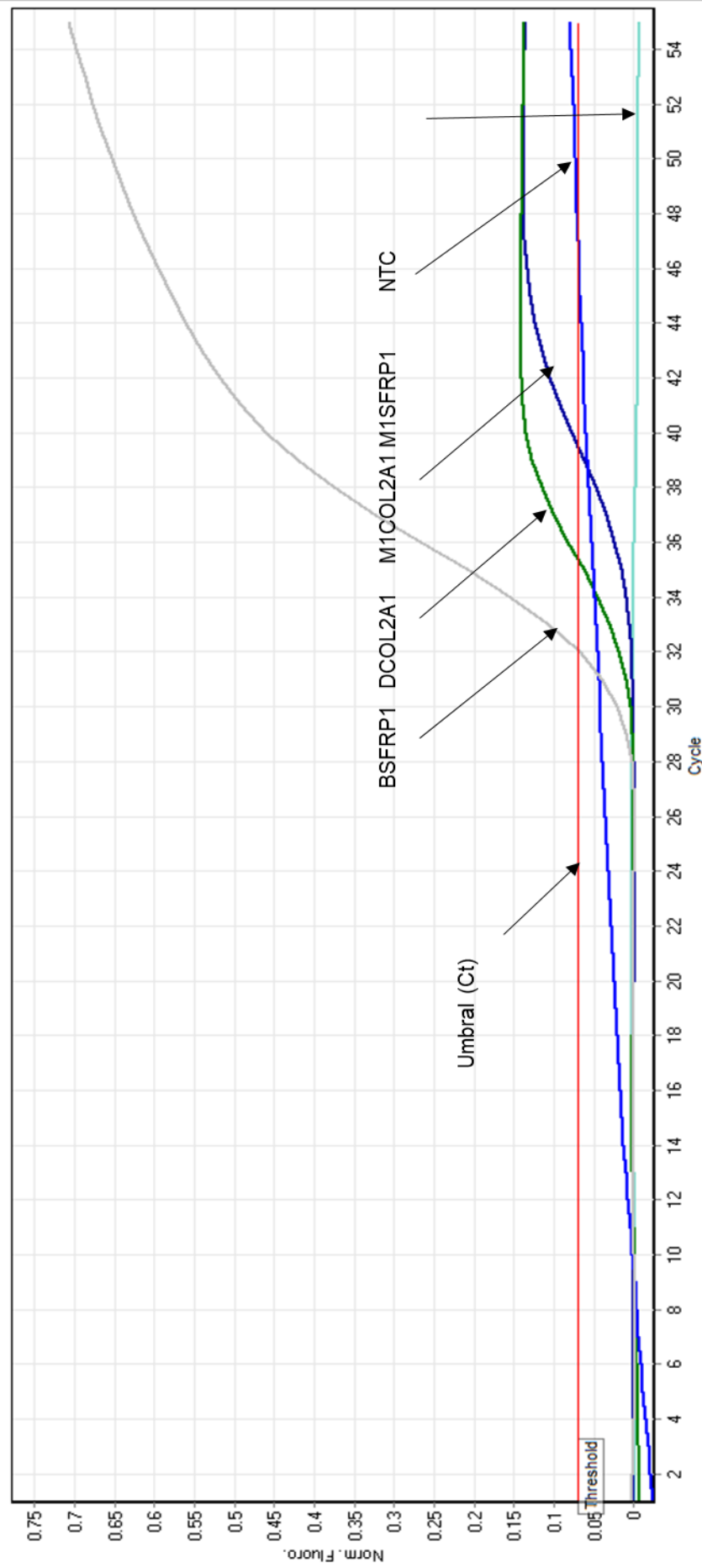


Figura S3. Ejemplo de ensayo MethyLight modelo para promotor metilado de gen SFRP1

La amplificación de una muestra para el gen de estudio SFRP1 y el gen de referencia COL2A1 se muestra como curvas coloreadas en la imagen. M1 SFRP1: Amplificación negativa mayor de 45 ciclos para SFRP1 de la muestra M1 en azulino; B SFRP1: 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen SFRP1 en gris; M1 COL2A1: Amplificación positiva para COL2A1 de la muestra M1 en azul marino; D COL2A1: 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen COL2A1 en verde; NTC: control sin ADN en gris; Ct: ciclo umbral determinado por la curva estándar en el que las amplificaciones negativas deben romper en un solo punto antes de los 50 ciclos de reacción.

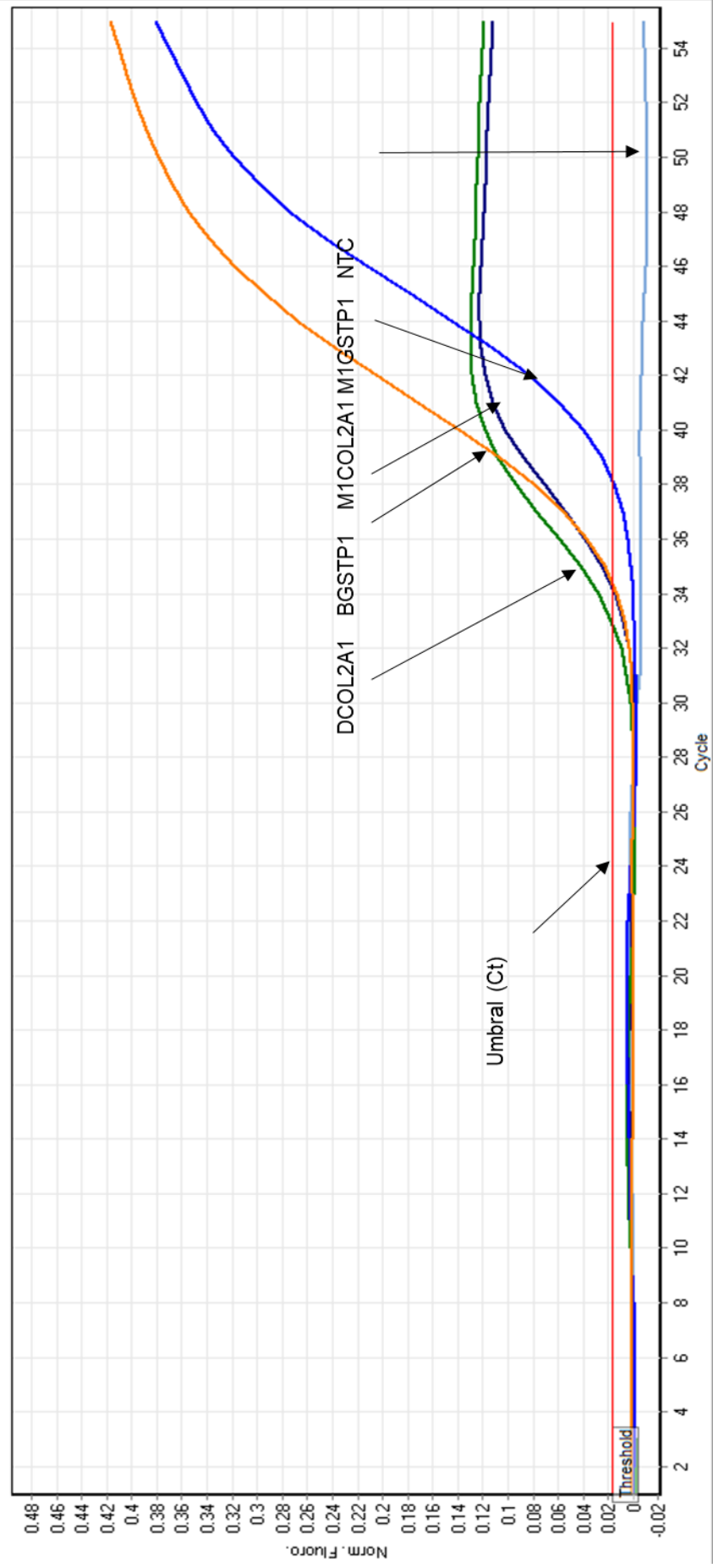


Figura S4. Ejemplo de ensayo MethyLight modelo para promotor metilado de gen GSTP1

La amplificación de una muestra para el gen de estudio GSTP1 y el gen de referencia COL2A1 se muestra como curvas coloreadas en la imagen. M1 GSTP1: Amplificación positiva para GSTP1 de la muestra M1 en azulino; B GSTP1: 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen GSTP1 en naranja; M1 COL2A1: Amplificación positiva para COL2A1 de la muestra M1 en azul marino; D COL2A1: 2ng/reax de ADN 100% metilado convertido por bisulfito para el gen COL2A1 en verde; NTC: control sin ADN en gris; Ct: ciclo umbral determinado por la curva estándar en el que las amplificaciones negativas deben romper en un solo punto antes de los 50 ciclos de reacción.

4. Consentimiento informado



La Molina, 23 de junio de 2015

Oficio No. 826 - 2015 - CIEI-USMP-CCM

Señor Doctor
José Luis Buleje Sono
Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Facultad de Medicina Humana - USMP
Presente

Ref. Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulares (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."


De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente en materia de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la sesión del 22 de junio evaluó y aprobó los siguientes documentos:

- Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulares (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."
- Hoja Informativa para el Paciente

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que correspondan.

Atentamente,



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética e Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CodoM

AVG/ABZ/ad
Adjunto (2) documentos sellados

HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE

Nombre del estudio:

TEST GENÉTICO - EPIGENÉTICO NO INVASIVO PARA CÁNCER DE MAMA UTILIZANDO ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES (cfNAs) COMO BIOMARCADORES, PREDICTORES DE PRONÓSTICO Y RESPUESTA A TRATAMIENTO.

Patrocinadores del estudio: Universidad de San Martín de Porres, Oncosalud-AUNA.

Investigador principal: José Luis Buleje Sono

Investigador responsable en la USMP: Ricardo Miguel Fujita Alarcón

Investigador responsable en Oncosalud-AUNA: Alfredo Aguilar Cartagena

Sedes de estudio: Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Facultad de Medicina Humana. Universidad de San Martín de Porres; Unidad de Mama, Oncosalud-AUNA

Estimado Señor(a):

Estamos realizando un trabajo científico que servirá en el futuro para el mejor tratamiento de cáncer y queremos invitarlo a participar. Este documento conocido como *Consentimiento Informado*, sirve para informarle de los alcances y detalles de nuestro proyecto y le ayudará en su decisión de participar en el estudio. Lea cuidadosamente el presente documento y haga las preguntas a los médicos y miembros del equipo para realizar un estudio genético. Ud. debe firmar solo si ha entendido toda la información.

Los patrocinadores del estudio son Universidad de San Martín de Porres y Oncosalud-AUNA, que tienen como algunas de sus metas, la investigación científica en las poblaciones peruanas, así como y la extensión universitaria a la sociedad en colaboración con Oncosalud-AUNA.

Acerca del estudio

La información científica indica que en el cáncer es una enfermedad donde se encuentran involucrados una serie de genes. Los genes portan las características que recibimos de nuestros padres, abuelos y otros ancestros y que transmitimos a nuestros hijos como es el caso de los rasgos físicos, el color de la piel, de los ojos, del tipo de cabello y otros como el funcionamiento normal de las células. En muchos tipos de cáncer las células sufren cambios de la información genética (mutaciones y alteraciones epigenéticas) y hacen que se expresen de manera anormal y proliferen sin control. Estos cambios pueden ser detectados por las técnicas usadas en esta investigación y esa información puede servir para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del cáncer. El ADN de las células del cuerpo pueden ser detectadas en el plasma sanguíneo y eso ocurre también para las células tumorales.

Este proyecto involucra el estudio de pacientes con cáncer de mama (n=100) y sus respectivos controles sanos (n=100) y tiene una duración de 30 meses; siendo los criterios de inclusión y exclusión los siguientes:

Criterios de Inclusión

Pacientes recientemente diagnosticados con cáncer de mama. Mayores de 18 años y sin tratamiento previo. Firma de consentimiento informado. Controles: Pacientes sin cáncer de mama.



Dr. Ampoor Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación



Crterios de Exclusión

Paciente con tratamiento previo; no aceptación de consentimiento informado.

Le invitamos a participar porque nos ayudará a conocer las variantes genéticas asociadas con cáncer de mama en nuestra población. Este es un trabajo de investigación científica y su participación va a ser importante, por ahora no obtendrá un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores genéticos relacionados con la forma cómo las células cancerosas escapan del control de la proliferación, será de suma importancia. Además, permitirá establecer el pronóstico de la enfermedad de acuerdo a los tipos de alteraciones encontradas. Esto podría beneficiar en un futuro a otros pacientes porque permitirá identificar a la enfermedad antes que se pueda detectar clínicamente. Ello también contribuirá a un mejor conocimiento y tratamiento del cáncer de mama en las mujeres peruanas.

¿Por qué hacer el estudio?

En un futuro próximo, conociendo las variantes genéticas de los tumores se les podrán detectar oportunamente y escoger desde un principio el mejor medicamento de acuerdo a su constitución genética.

El estudio se realizará en el laboratorio mediante el análisis de la molécula de ADN. Dichos análisis buscan determinar la presencia de variaciones en el ADN que puedan ser causales de la enfermedad y/o ser susceptibles a tratamiento.

¿Qué se me pedirá?

Si usted decide participar se le solicitará 10 ml de sangre obtenido por venopunción y una muestra de tumor fresco y/o tumor conservado en parafina (lo que no influirá en el estudio patológico de su enfermedad). Usted puede donar el sobrante de su muestra para que en lugar de ser destruido, sea utilizado en investigación relacionada con el cáncer.

Su participación en este estudio es voluntaria. Por otra parte, la realización del estudio genético será gratuita, y no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación. Si decide no participar en este estudio, esto no cambiará la calidad de la atención recibida.

¿Qué riesgos de salud implica este estudio?

La muestra será de sangre intravenosa por lo que las dificultades son el pinchazo y algunas veces se forma hematomas.

Se le pedirá su consentimiento para que con su muestra se haga:

1.- Estudio de genes específicos de este proyecto (HER2, PIK3CA, TP53, RASSF1A, MAL, SFRP1, GSTP1, RARB2 y varios miRNAs, etc.) que pueden estar involucrados en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad que usted padece. Si usted lo solicita, su muestra solo servirá para este proyecto y una vez finalizado el estudio, será destruida.

2.- Autorizar al Investigador a almacenar su muestra de ADN para futuros estudios que asocien otros genes relacionados con el desarrollo y tratamiento de cáncer, puedan ser procesados.

¿Qué se harán con los resultados del estudio?



Dr. Amador Vargas Guerra

Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres, Lima - Perú



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ESTUDIO GENÉTICO:

Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.

Nombre:
Fecha: Edad:
DNI:..... Teléfono: No de Registro:
Médico tratante:
Hospital Referencia:

He recibido información de forma verbal y escrita sobre el proyecto Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.

De acuerdo a esta información he entendido que:

- 1.- Se me va a extraer una muestra de sangre periférica para realizar un estudio genético.
- 2.- El objetivo de dicho estudio es analizar los genes que están implicados en el cáncer, su respuesta a tratamiento y pronóstico.
- 3.- Los resultados del estudio no influirán en el manejo de la enfermedad.
- 4.- Se guardará la confidencialidad de los resultados del estudio, pudiéndose utilizar los datos de forma anónima para estudios epidemiológicos.
- 5.- Si creo conveniente, puedo anular el consentimiento así como solicitar que se destruyan las muestras extraídas.

Leído el documento CONSIENTO que se me extraiga una muestra para realizar el estudio genético.

Lima, _____ de _____ del 201_

Firma del paciente

Firma del Investigador



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica Capa™



5. Oficio No. 872-2017-CIEI-USMP-CCM



La Molina, 17 de octubre de 2017

Oficio No. 872 - 2017 - CIEI-USMP-CCM

Señorita Bachiller
Pierina Danós Díaz
Presente.-

Ref: Proyecto de Investigación Titulado: "Asociación entre los niveles de metilación de tres genes en ADN libre circulante (biopsia líquida) y cáncer de mama en mujeres de Lima en el periodo 2016-2017."

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente en materia de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la sesión del 16 de octubre evaluó y aprobó el siguiente documento:

- Proyecto de Investigación Titulado: "Asociación entre los niveles de metilación de tres genes en ADN libre circulante (biopsia líquida) y cáncer de mama en mujeres de Lima en el periodo 2016-2017."

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que correspondan.

Atentamente,



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CadaMujer

AVG/ADZ/na

Facultad de Medicina Humana
Alameda del Corregidor N° 1531 Urb. Los Sirius
III Etapa - La Molina
Telf: 365-2300
medicina@usmp.pe
www.medicina.usmp.edu.pe