

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**



**"ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO *MTHFR* C677T CON CÁNCER DE  
MAMA EN MUJERES PRE Y POSTMENOPAÚSICAS DEL ESTADO DE  
JALISCO"**

**TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**RAZIEL OMAR TAPIA LLANOS**

**Las Agujas, Zapopan Jal, Septiembre del 2012**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*  
**COORD-BIO-036/2012**

**C. RAZIEL OMAR TAPIA LLANOS**  
**PRESENTE**

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: **TESIS** con el título: **"ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO MTHFR C677T CON CANCER DE MAMA EN MUJERES PRE Y POSTMENOPAUSICAS DEL ESTADO DE JALISCO"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la **Dra. Susan Andrea Gutiérrez Rubio**, y como asesor/a **Dra. Luz Patricia Castro Félix..**

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 16 de febrero, del 2012.

**DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**M.C. GLORIA PARADA BARRERA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: "ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO *MTHFR* C677T CON CÁNCER DE MAMA EN MUJERES PRE Y POSTMENOPAUSICAS DEL ESTADO DE JALISCO" que realizó el/la pasante RAZIEL OMAR TAPIA LLANOS con número de código 300415987 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

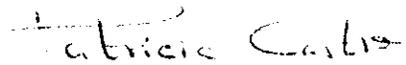
Atentamente

Las Agujas, Zapopan, Jal., 06 de Junio, del 2012



Susan Andrea Gutiérrez Rubio

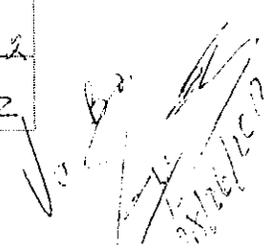
Director/a del trabajo



Dra. Luz Patricia Castro Félix

Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Jorge Peregrina Sandoval		6/ Junio/12
Dra. Josefina Casas Solis		6/ Junio /12
Dra. María del Rosario Huizar López		6/ Junio /12
Supl. Dr. Edgardo Flores Torales		7/ Junio /12.



**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO *MTHFR* C677T CON CÁNCER DE MAMA  
EN MUJERES PRE Y POSTMENOPAÚSICAS DEL ESTADO DE JALISCO**

**LUGAR DE REALIZACIÓN**

Laboratorio de Inmunología, Departamento de Fisiología, Centro Universitario  
de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

**Instituciones participantes:**

Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional de Occidente (CMNO)  
del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Guadalajara, Jalisco, México

Hospital de Gineco-Obstetricia del Centro Médico Nacional de Occidente  
(CMNO) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Guadalajara, Jalisco,  
México

Instituto Jalisciense de Cancerología, Guadalajara, Jalisco, México

**Directora: Dra. en C. SUSAN ANDREA GUTIERREZ RUBIO**

**Asesora: Dra. en C. LUZ PATRICIA CASTRO FÉLIX**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento otorgado por la Fundación AVON, Arizona Cancer Center Core Grant del Instituto Nacional de cáncer (NCI) de Estados Unidos y el programa especializado de investigación en excelencia en cáncer de mama del MD Anderson Cancer Center para el Proyecto Binacional de Cáncer de mama México-EEUU (ELLA).

## DEDICATORIAS

Esta tesis, se la dedico principalmente a mis padres, que gracias a su cuidado, apoyo y educación, me inculcaron los valores más importantes de la vida: el amor, respeto y dedicación. Simplemente no tengo palabras para expresar mi gratitud y orgullo hacia mis padres y solo espero seguir por el camino que ellos me han marcado.

A mis hermanos, con los que pasé momentos inolvidables de mi vida y que a pesar de las diferencias, sepan que los quiero mucho y siempre veo por su bienestar. A toda mi familia, en especial a mis abuelos; Baudelio y Soledad, a quienes les guardo un sentimiento muy especial.

A mis compañeros y amigos, que he conocido a lo largo de mi vida, aquellos que en algún momento me han escuchado, con los que he reído, con los que he llorado o simplemente con los que he hablado, gracias por haber sido parte de mi vida. Quiero hacer una mención especial a la persona con la que he compartido gran parte de los mejores momentos de mi vida y por la cual he dado lo mejor de mí, gracias por todo 5 2 1.

Al Laboratorio de Inmunología del CUCS, encabezado por el Dr. Adrian Daneri Navarro, excelente investigador y visionario, que junto la Dra. Alicia del Toro Arreola, me dieron la oportunidad de participar en su excelente equipo de trabajo con los que he crecido profesionalmente. A mi directora de tesis, la Dra: Susan Andrea Gutiérrez Rubio, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, agradezco mucho su paciencia y sabiduría que me han hecho una mejor persona. A todos mis compañeros y compañeras del laboratorio con quienes he compartido el aprendizaje

Por último, a todos los maestros y profesores que sembraron en mí, el deseo del aprendizaje y conocimiento así como el desarrollo de mi vocación profesional. A todos muchas gracias.....

## RESUMEN

En México, el cáncer de mama representa la primera causa de muerte por tumor maligno entre las mujeres; el Estado de Jalisco ocupa uno de los primeros lugares en muertes por este tumor. Existen diversos factores de riesgo asociados a esta patología, entre los que destacan: estilos de vida (tabaquismo, alcoholismo, obesidad) así como factores hormonales y genéticos. La enzima Metilen tetrahidratofolato reductasa (MTHFR) participa directamente en el metabolismo de folatos (ácido fólico), convirtiendo a la 5,10 Metilen tetrahidratofolato a 5-Metilen tetrahidratofolato; la forma activa necesaria para la conversión de la homocisteína a metionina. El metabolismo del ácido fólico es muy importante para la síntesis y reparación, así como para la metilación del ADN. El polimorfismo C677T del gen *MTHFR* (*locus* 1p36.3) consiste en el cambio del aminoácido alanina por valina (A222V) lo que induce la síntesis de una enzima termolábil y con una actividad reducida. El objetivo del estudio fue determinar la asociación del polimorfismo *MTHFR* C677T y con el CaMa en mujeres pre y postmenopáusicas del Estado de Jalisco. Para este estudio se captaron 131 mujeres con diagnóstico histopatológico de CaMa, de las cuales 41 se encontraban en estado premenopáusico, 81 en estado postmenopáusico y 9 en estado perimenopáusico, además de 128 individuos de la población general como grupo control. Se extrajo ADN de sangre periférica previa punción venosa, por el método de precipitación de sales de Miller, el ADN obtenido fue sometido a una PCR-RFLP con iniciadores previamente descritos. La población general se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg para el locus *MTHFR*. Los resultados obtenidos no mostraron una asociación entre los individuos portadores del polimorfismo *MTHFR* 677TT y el riesgo a desarrollar CaMa ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los grupos de estudio. Las frecuencias genotípicas y alélicas son similares en el grupo de población general y en el de CaMa.

## CONTENIDO

	Pagina(s)
RESUMEN.....	v
ABREVIATURAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Generalidades del cáncer.....	3
Cáncer de mama.....	4
<b>Estadificación del cáncer de mama.....</b>	6
<b>Clasificación histopatológica del cáncer de mama.....</b>	7
<b>Epidemiología del cáncer de mama.....</b>	9
<b>Factores de riesgo.....</b>	12
Ácido fólico.....	14
<b>Estructura química del ácido fólico.....</b>	15
<b>Metabolismo del ácido fólico.....</b>	15
<b>Deficiencias en el metabolismo del ácido fólico.....</b>	17
Enzima Metilentetrahidratofolato reductasa .....	18
<b>Metabolismo del ácido fólico y variantes genéticas del</b>	19
<b>gen <i>MTHFR</i>.....</b>	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	41
LITERATURA CITADA.....	42
APÉNDICE.....	46
ANEXOS.....	54

## ÍNDICE DE CUADROS

Número	Descripción	Página
1	Progresión y estadio del cáncer de mama en mujeres.....	7
2	Frecuencias genotípicas del gen <i>MTHFR</i> en los grupos PG y CaMa.....	32
3	Frecuencias genotípicas del gen <i>MTHFR</i> en los grupos Pre-M y Post-M.....	33
4	Frecuencias alélicas del gen <i>MTHFR</i> en grupos los PG y CaMa.....	34
5	Frecuencias alélicas del gen <i>MTHFR</i> en grupos los Pre-M y Post-M.....	35
6	Comparaciones genotípicas entre los diferentes grupos de estudio .....	37
7	Frecuencias genotípicas del polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T en diversas poblaciones control.....	39
8	Iniciadores utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	50
9	Programa del polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	50

17	Frecuencias alélicas (%) del gen <i>MTHFR</i> (C677T) en los grupos PG y CaMa.....	35
18	Frecuencias alélicas (%) del gen <i>MTHFR</i> (C677T) en los grupos Pre-M y Post-M.....	36

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CaCr</b>	Cáncer de colon y recto
<b>CaCu</b>	Cáncer cervico uterino
<b>CaEs</b>	Cáncer de estomago
<b>CaHi</b>	Cáncer de hígado
<b>CaMa</b>	Cáncer de mama
<b>CDIS</b>	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
<b>CLIS</b>	Carcinoma lobulillar <i>in situ</i>
<b>CMNO</b>	Centro Médico Nacional de Occidente
<b>CUCS</b>	Centro Universitario de Ciencias de la Salud
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfatados
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EHW</b>	Equilibrio Hardy-Weinberg
<b>g</b>	Gramos
<b>H</b>	Horas
<b>HE</b>	Hospital de especialidades
<b>HGO</b>	Hospital de Gineco-obstetricia
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IJC</b>	Instituto Jalisciense de Cancerología
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>M</b>	Molar
<b>MTHFR</b>	Metilen tetrahidratofolato reductasa
<b>mg</b>	Miligramo

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>min</b>	Minutos
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitos
<b>µM</b>	Micromolar
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Pre-M</b>	Mujeres premenopausicas con cáncer de mama
<b>Post-M</b>	Mujeres postmenopausicas con cáncer de mama
<b>PG</b>	Población general
<b>pmol</b>	Picomoles
<b>s</b>	Segundos
<b>THFA</b>	Ácido tetradrofólico

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades con en la que las células son capaces de multiplicarse sin control alguno. El cáncer es un problema de salud pública que se presenta a nivel mundial y ocasiona millones de defunciones anuales (Silverstein, 2006; Globocan, 2008).

El cáncer de mama (CaMa) es la principal causa de muerte por tumor maligno entre las mujeres, a nivel mundial se registraron 458,400 defunciones por CaMa en el 2008. El CaMa es una patología que se presenta principalmente en los ductos y lóbulos de la mama con la capacidad de invadir tejidos adyacentes y distantes del cuerpo (Globocan, 2008; Martínez, 2007).

En México, el CaMa es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, con un total de 4,818 defunciones en el 2008 y una tasa de incidencia de 8.9 por cada 100,000 mujeres. El Estado de Jalisco se encuentra entre los primeros lugares en incidencia por este tipo de cáncer con una frecuencia de 13.2 por cada 100,000 mujeres y un total de 387 defunciones en el 2008 (SINAIS, 2008).

Existen diversos factores asociados al desarrollo de CaMa como lo son: la edad, la exposición prolongada a estrógenos, el uso de anticonceptivos hormonales, la obesidad, el consumo de tabaco y el alcoholismo. Entre los factores genéticos asociados se encuentran mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* (1 de cada 1000 mujeres, aproximadamente), polimorfismos genéticos asociados a la síntesis de estrógenos y el metabolismo de folatos (ácido fólico) (NCI, 2012., Brandan y Villaseñor, 2006).

El metabolismo del ácido fólico es de vital importancia en el organismo debido a que su forma reducida; el ácido tetrahidrofólico (THFA), participa en la metilación de la homocisteína a metionina, además de contribuir en la síntesis de las purinas y las pirimidinas (Pita, 1998; Suárez, 2003).

La enzima metilen tetrahidratofolato reductasa (MTHFR) interviene directamente en el metabolismo monocarbonado y en las reacciones de

metilación, catalizando la transformación del 5,10-Metilentetrahidratofolato a 5-Metilen tetrahidratofolato; un donador de grupo metilo necesario para la conversión a metionina (Campbell *et al*, 2002).

El polimorfismo C677T del gen *MTHFR* (*locus* 1p36.3) consiste en el cambio del nucleótido citosina (C) por timina (T) que se traduce en el cambio del aminoácido 222, alanina (A) por valina (V), lo que induce la síntesis de una enzima termolábil y con una actividad reducida (Chen *et al*, 2005; Martínez-Victoria, 2007).

Diversos estudios muestran una asociación del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* y el desarrollo de CaMa en poblaciones caucásicas (Ericson *et al*, 2009; Maruti *et al*, 2009; Stevens *et al*, 2007). El estudio realizado por Zuñiga-Noriega *et al* 2008 en población mexicana arrojó un alta incidencia de este polimorfismo, por lo que de la misma forma se espera obtener una prevalencia significativa del mismo en la población del Estado de Jalisco y determinar si existe una asociación del polimorfismo *MTHFR* C677T con el CaMa.

## ANTECEDENTES

### Generalidades del cáncer

Cada célula se divide crece y muere de una manera ordenada. La apoptosis o muerte celular programada es uno de los principales mecanismos que mantiene la homeostasis celular, las células capaces de inhibirla pueden llegar a transformarse en células cancerígenas (Cooper y Geoffrey, 2000).

Las células cancerosas poseen en su estructura algún cambio o mutación que les permite dividirse acelerada y descontroladamente, escapando así de la apoptosis (Figura 1). La división continua de las células cancerosas puede dar origen a la formación de tumores malignos con la capacidad de invadir otros tejidos (Brandan y Villaseñor, 2006).

El cáncer es considerado un grupo de enfermedades causado por anomalías en el material genético o ácido desoxirribonucleico (ADN). Las causas de estos cambios pueden ser hereditarias y/o inducidas por agentes externos como la exposición a sustancias carcinógenas como la radiación (rayos X, UV), la exposición a productos químicos, el alto consumo de alcohol y tabaco así como la exposición a agentes infecciosos como virus y bacterias (Silverstein, 2006; NCI, 2012).

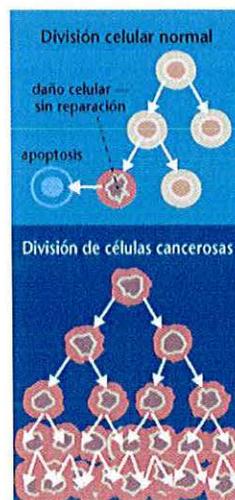


Figura 1. Carcinogénesis, (NIH, 2010).

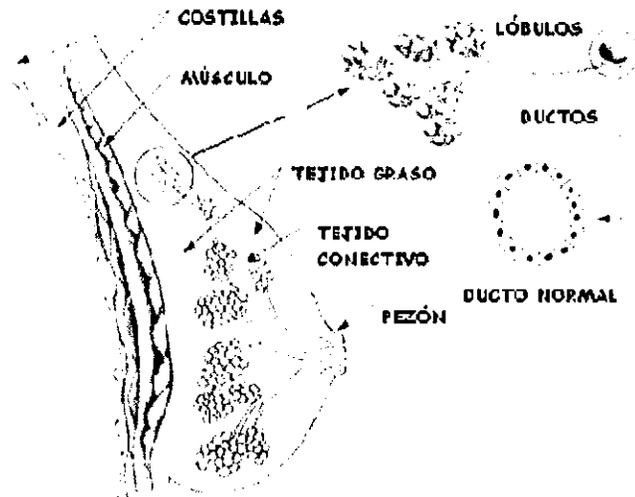
## Cáncer de mama

El CaMa consiste en la proliferación descontrolada de células en el epitelio glandular. Es una patología casi exclusiva de las mujeres (99% de los casos) y se presenta, principalmente en los ductos y lobulillos mamarios. Los tumores originados en la mama pueden llegar a transformarse en tumores malignos e invadir tejidos circundantes y distantes del cuerpo (Martínez-Victoria, 2007; NCI, 2012).

La mayoría de las masas tumorales que llegan a presentarse en la mama son benignas. En su mayoría se deben a formaciones fibroquísticas originadas justo antes del inicio del periodo menstrual. Otras formaciones anormales son los fibroadenomas o papilomas intraductales. Cabe destacar que la presencia de estas formaciones tumorales confiere, en las mujeres un mayor riesgo de padecer CaMa en alguna etapa de su vida(ACS, 2012).

Los senos o mamas son una pareja de órganos glandulares características de los mamíferos, internamente son glándulas sudoríparas, modificadas para producir leche. La glándula mamaria consta de dos elementos fundamentales (Figura 2):

- a) Los acinos o lóbulos glandulares, donde se encuentran las células productoras de leche.
- b) Los ductos, un conjunto de estructuras tubulares que confluyen en canalículos que culminan en los conductos galactóforos, dilataciones ductales a modo de reservorios, situados inmediatamente después del pezón, formados por epitelio escamoso. Estos conductos son los encargados de llevar la leche desde los lóbulos glandulares hasta el pezón, situado en el centro del área oscura llamada areola (López y González, 2010).



**Figura 2.** Estructura morfológica de la mama (López y González, 2010).

En la base del complejo areola-pezón, se encuentran las células mioepiteliales rodeadas de fibras musculares radiales que permiten la salida de leche ante ciertos estímulos.

El resto del seno está conformado por tejido conjuntivo (colágeno y elastina) y tejido adiposo (grasa), además de nervios y vasos arteriales y venosos. Los vasos linfáticos en la mama desembocan en los ganglios linfáticos axilares (Figura 3), órganos redondos y pequeños que tienen como función la protección contra bacterias, células tumorales, entre otras sustancias nocivas (López y González, 2010).

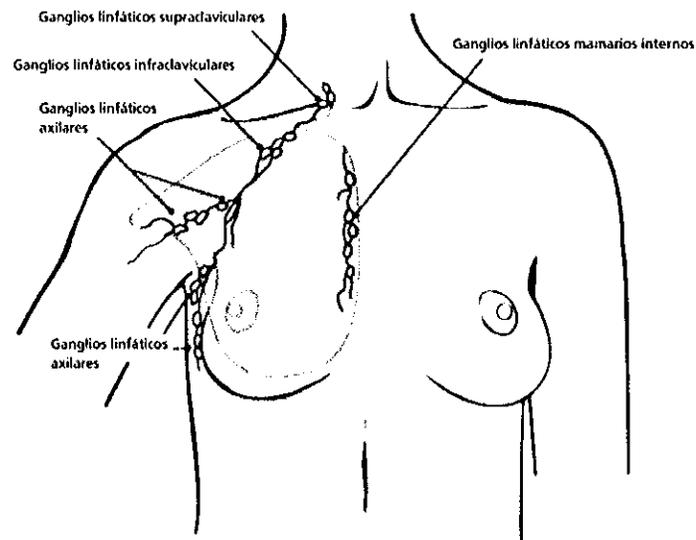


Figura 3. Localización de los ganglios linfáticos (NCI, 2011).

### Estadificación del cáncer de mama

El CaMa, es clasificado de acuerdo al tamaño y al grado en el que se ven afectados los ganglios linfáticos circundantes (invasión) por las células tumorales. En el cuadro 1 se muestra los estadios y la sobrevida a 5 años en pacientes diagnosticadas con CaMa.

La determinación del estadio en que se encuentra el paciente suma importancia para el plan de tratamiento que reciba el paciente (NCI, 2012).

**Cuadro 1:** Progresión y estadio del cáncer de mama en mujeres (NCI, 2011; ACS, 2011).

Estadio	Descripción	Progresión	Sobrevida a 5 años
0	No invasivo	Células anormales presentes (CDIS, CLIS).	100%
I	Invasivo	< 2cm, ganglios linfáticos no afectados.	100%
II A	Invasivo	De 2-2.5 cm, ganglios linfáticos pueden estar afectados.	92%
II B	Invasivo	De 2-5 cm, ganglios linfáticos pueden estar afectados.	81%
III A	Invasivo	>5 cm, ganglios linfáticos afectados.	67%
III B	Invasivo	Cualquier tamaño, ganglios afectados y diseminación a tejidos circundantes	54%
IV	Metastásico	Cualquier tamaño, ganglios afectados e invasión a tejidos distantes.	20%

CDIS: Carcinoma ductal *in situ*, CLIS: Carcinoma lobulillar *in situ*.

### Clasificación histopatológica del cáncer de mama

Dentro de la clasificación del CaMa existen varios tipos, los cuales se determinan de acuerdo a la histopatología que presentan. El carcinoma ductal infiltrante o invasor es el tipo histológico más frecuente y está presente entre el 70 y 80% de todos los casos seguido por el carcinoma lobulillar infiltrante con el 10 y 15% (AJCC, 2002).

## Ductal

### ***No infiltrante***

- Intraductal (*in situ*)

### ***Infiltrante***

- Invasor con el componente intraductal predominante
- Invasor
- Comedón
- Inflamatorio
- Medular con linfocítico infiltrante
- Mucinoso (coloide)
- Papilar
- Sirroso
- Tubular
- Otro

## Lobulillar

### ***No infiltrante***

- Intralobulillar (*In situ*)

### ***Infiltrante***

- Invasor con componente *in situ* predominante
- Invasor

## Pezón

- Enfermedad de Paget
- Enfermedad de Paget con carcinoma intraductal

- Enfermedad de Paget con carcinoma ductal invasor

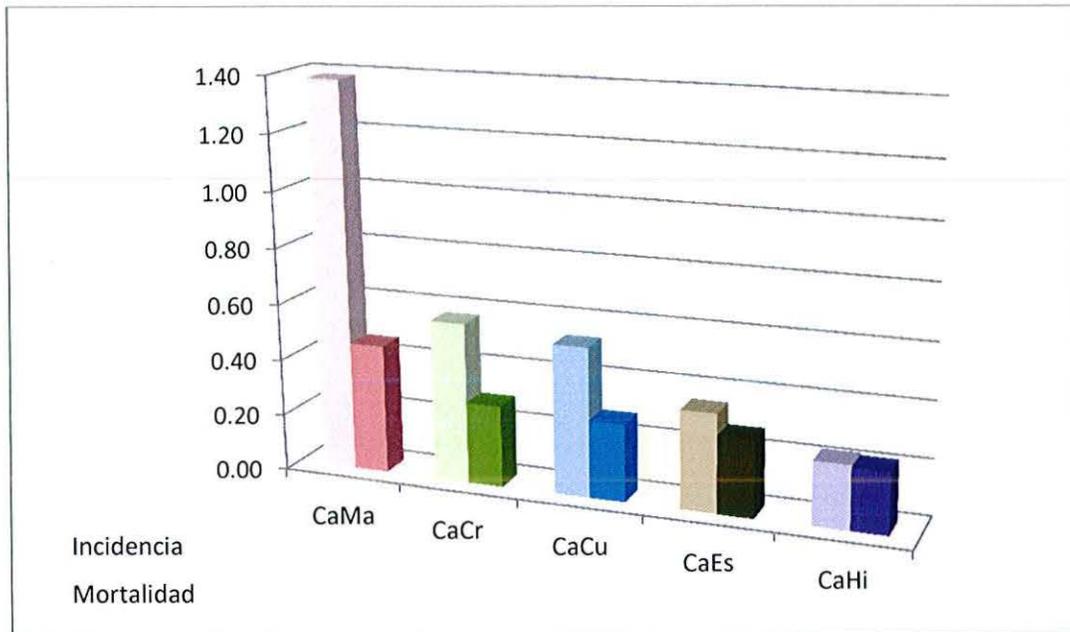
### **Epidemiología del cáncer de mama**

Se reporta al cáncer como la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa en países en vías de desarrollo. En el 2008 se reportaron cerca de 12.7 millones de casos y 7.6 millones de muertes fueron reportadas en el 2008 a nivel mundial; de estos, 44% de nuevos casos y 36% de las muertes, ocurrieron en países en vías de desarrollo (Globocan, 2008).

Entre las mujeres, el CaMa es considerado el de mayor incidencia y mortalidad (Figura 4), con un 23% (1.38 millones) de nuevos casos y 14% (458,400) de defunciones. En general existe un alta incidencia en Europa, Oceanía y Norte América; intermedia en Sudamérica y el Norte de África y baja en el resto de África y Asia (Globocan, 2008).

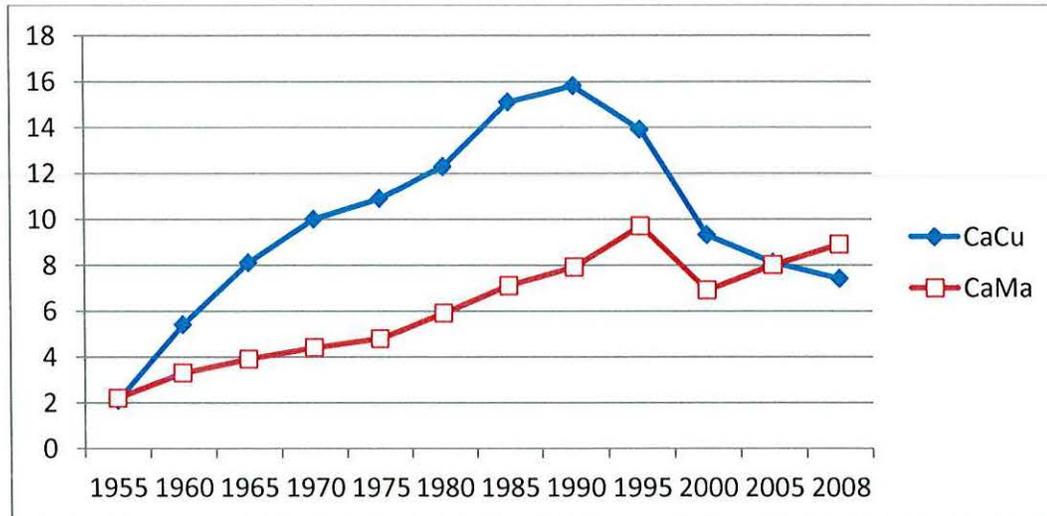
Se describe una mayor susceptibilidad en mujeres caucásicas a desarrollar CaMa que las mujeres Áfrico-Americanas, sin embargo, estas últimas poseen una mayor mortalidad en el rango de edad de 36-69 años de edad que cualquier otra etnia (Globocan, 2008)

El CaMa en hombres se presenta de manera muy rara (<1% de todos los casos), presentan en general, un pronóstico más desalentador que las mujeres, debido principalmente al estado avanzado del tumor. La edad promedio de diagnóstico en hombres es de 58-62 años (Lake, 2007).



**Figura 4.** Incidencia (color claro) y mortalidad (color oscuro) de los principales tipos de cáncer en mujeres a nivel mundial (Millones de personas). (Globcan, 2008).Cáncer de mama (CaMa), Cáncer de colon y recto (CaCr), Cáncer cérvico uterino (CaCu), Cáncer de estomago (CaEs) y Cáncer de hígado (CaHi).

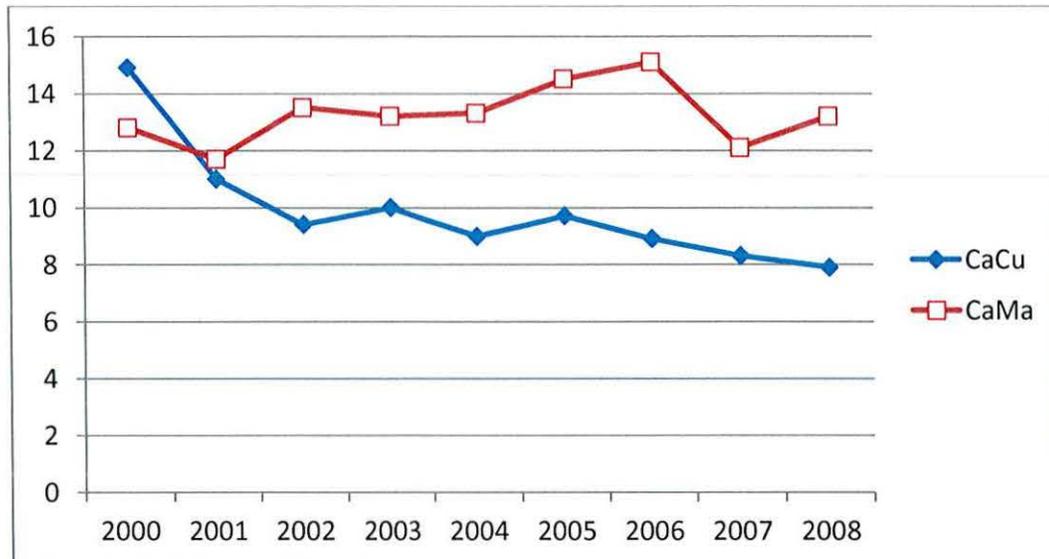
En México, entre los años 1955 y 1960 la tasa de mortalidad por CaMa fue de 2-4 por cada 100,000.00 mujeres, desde entonces y hasta la década de los 90 el número de casos fue en aumento, alcanzando una cifra cercana a los 9 casos por cada 100,000.00 mujeres. Desde el año 2006, el CaMa desplazó al cáncer cérvico uterino como la principal causa de muerte en mujeres por tumor maligno (INEGI, 2011) como se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Índice de mortalidad por cáncer de mama (CaMa) y cáncer cérvico uterino (CaCu) a nivel nacional 1955-2008. Tasa por cada 100,00 mujeres (Knaul, 2009)

En el 2008 se presentaron un total de 4,818 defunciones con una tasa de incidencia de 8.9 casos por cada 100,000 mujeres. El rango de edad con mayor presencia de CaMa en mujeres mexicanas, es de 40-49 años de edad (Brandan y Villaseñor, 2006; SINAIS, 2008; Knaul *et al*, 2009).

El Estado de Jalisco es uno de los estados con mayor incidencia y mortalidad por CaMa y desde el año 2001 se encuentra como la primera causa de muerte por tumor maligno en mujeres (Figura 6). La tasa de incidencia en el Estado de Jalisco está por encima de la media del país (8.9) con 13.2 casos por cada 100,000 mujeres y un total de 387 defunciones, que representan el 14.8% del total de muertes a causa de tumores malignos en mujeres (SINAIS, 2008; INEGI 2011).



**Figura 6.** Índice de mortalidad por cáncer de mama (CaMa) y cáncer cervico uterino (CaCu) en el estado de Jalisco 2000-2008. Tasa por cada 100,000 mujeres (SINAIS, 2008).

### Factores de riesgo

El origen del CaMa es multifactorial y cerca del 95% de todos los casos que se presentan se originan de manera esporádica lo que dificulta su pronóstico y un modelo de tratamiento preventivo, sin embargo al igual que otros tipos de cáncer, existen factores que pueden influir de manera directa e indirecta en la susceptibilidad y desarrollo de tumores en la mama (Benítez y Osorio, 2006).

El factor de riesgo más importante para desarrollar CaMa es ser mujer, debido a que la relación existente entre hombres y mujeres es de 1:100, la incidencia aumenta con la edad y se duplica aproximadamente cada 10 años (Brandan y Villaseñor, 2006; INEGI, 2011).

**Cambio de hábitos:** Los cambios en el estilo de vida a nivel mundial influyen directamente en la susceptibilidad para desarrollar tumores mamarios, dentro de estos factores se incluye: el alto consumo de alcohol, tabaco y la inactividad física. Estos factores han aumentado la obesidad y la diabetes, como las principales consecuencias de estos cambios (NCI, 2012).

**Factores endócrinos:** Existen entre las mujeres, factores reproductivos influyentes en la formación de CaMa, como la nuliparidad, historia menstrual prolongada, menarca temprana y/o menopausia tardía así como el uso de anticonceptivos orales, uso de terapia hormonal (estrógenos/progesterona) post-menopáusica (Jemal *et al*, 2011; NCI, 2012; ACS, 2012).

**Factores ambientales:** La exposición prolongada a la radiación, sobre todo antes de los 40 años de edad es el factor ambiental de mayor impacto, además de la exposición a pesticidas y campos electromagnéticos (Lake, 2007).

**Factores genéticos:** Los factores genéticos explican aproximadamente el 5% de nuevos casos de CaMa, por lo que es posible detectar una alta susceptibilidad a través de la historia familiar de la enfermedad, la cual puede afectar a varios miembros de una familia a lo largo de varias generaciones.

La presencia de mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA 1* y *BRCA 2*, aportan la mayor parte de riesgo hereditario, no sólo para desarrollar CaMa sino otros tipos de tumor relacionados con estos genes, como son el cáncer de ovario en mujeres y de próstata en hombres (Benitez y Osorio; 2006; Lake, 2007).

Otras mutaciones menos comunes, se asocian con el desarrollo de CaMa, entre éstas se encuentran:

- a) Mutaciones en el gen *p53*; un supresor tumoral de gran importancia en la apoptosis. Ligadas a estas mutaciones se relaciona la alta incidencia del síndrome de Li-Fraumeni (carcinomas y sarcomas múltiples).

- b) Mutaciones en el cromosoma 10q23 confieren en las mujeres un aumento en el riesgo a presentar tumores en la mama del 30-50%.
- c) Polimorfismos de genes implicados en los ciclos hormonales y metabólicos (Lake, 2007).

En relación al metabolismo del ácido fólico; uno de los polimorfismos más estudiados es el de la enzima Metilen tetrahidratofolato reductasa (MTHFR). Está es importante en el metabolismo del ácido fólico debido a que los portadores de la variante C677T en estado homocigoto presentan una enzima termolábil y con actividad reducida (Chen *et al*, 2005; Martínez-Victoria, 2007).

La deficiencia en el metabolismo del ácido fólico reduce significativamente la capacidad de la síntesis y la reparación del ADN, lo que provoca rupturas en la cadena y por lo tanto, se induce mutagénesis y apoptosis (Chen *et al*, 2005).

### Ácido fólico

El ácido fólico es una vitamina del complejo B relacionada con el metabolismo de este. Es una sustancia amarilla, cristalina perteneciente al grupo de compuestos conocidos como pterinos; este grupo comprende un gran número de compuestos similares químicamente a los cuales se les denomina: folatos.

Dentro de los folatos, se incluyen a la folacina y el pteroilmonoglutamato, sin embargo el conjunto es denominado preferencialmente como folatos y son representados en 150 formas diferentes, la mayoría se encuentran presentes en alimentos en forma reducida, lábiles y de fácil oxidación (Suaréz, 2003).

Las fuentes alimenticias del ácido fólico provienen en su mayoría de: vegetales verdes, champiñones, hígado, frutas cítricas, nueces, legumbres, yema de huevo y cereales.

### Estructura química del ácido fólico

En su estructura química el ácido fólico está compuesto por la 2-amino-4-hidroxi-6-metilpteridina, el ácido p'-aminobenzoico y el ácido glutámico (Figura 7).

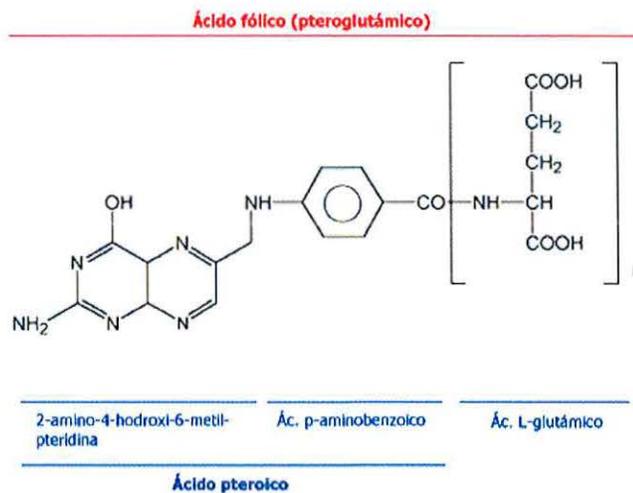


Figura 7. Estructura química de ácido fólico.

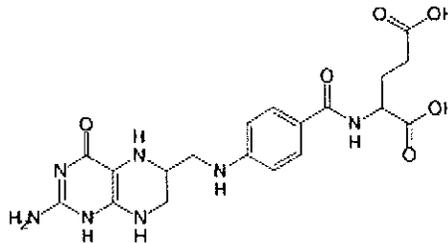
### Metabolismo del ácido fólico

Una vez que el ácido fólico es absorbido (folatos) este es hidrolizado de poliglutamato a monoglutamato por medio de una exopeptidasa (conjugasa intestinal). El transporte activo de los monoglutamatos es a través de las células de la mucosa intestinal en el yeyuno proximal y sigue una cinética de saturación dependiente de pH. La absorción se realiza mediante un mecanismo de cotransporte estimulado por la presencia de glucosa y el sodio.

Cerca del 20-30% del ácido fólico se absorbe mediante difusión pasiva (dosis altas). En sangre, se encuentra preferentemente en forma de 5-metilen tetrahidratofolato (5-MTHF) que se une de forma inespecífica a albúmina, alfa-macroglobulina y transferrina. Antes de ser depositados en los tejidos, los monoglutamatos se conjugan a poliglutamatos por medio de la enzima folipoliglutamato-sintetasa. Después, los poliglutamatos siguen dos caminos: 1)

son almacenados intracelularmente; 2) pasan a ser ácido tetrahidrofólico (THFA), que es la forma coenzimática.

El THFA (Figura 8) funciona como transportador intermediario de unidades de un carbono, captando los grupos hidroximetilo, metileno y formilo o cediéndolos. Los distintos compuestos THFA-C se diferencia por su grado de oxidación y participan en la síntesis de ADN y metabolismo de aminoácidos (Pita, 1998).



**Figura 8.** Estructura química del ácido tetrahidrofólico

El ácido fólico, participa también en el ciclo metabólico de la metionina, lo que le confiere un papel importante en el funcionamiento del sistema nervioso. En la síntesis del ADN, participa en el metabolismo de las pirimidinas (el 5,10 metilen-THFA metila el d-urilato a timidilato) y en el de las purinas (el 10-formil-THF cede dos átomos de carbono en las posiciones C2 y C8 de la cadena anular). Además, participa en el catabolismo de histidina a ácido glutámico y en la interconversión de serina y glicina (Figura 9).



metilación del ADN; en donde un grupo metilo es donado por S-adenosil metionina (SAM), cuya formación a su vez depende de la actividad de la enzima Metilen tetrahidratofolato reductasa. La metilación cumple una función importante en la reparación del ADN así como la regulación en la expresión génica (Stevens *et al*, 2007).

### Enzima Metilen tetrahidratofolato reductasa

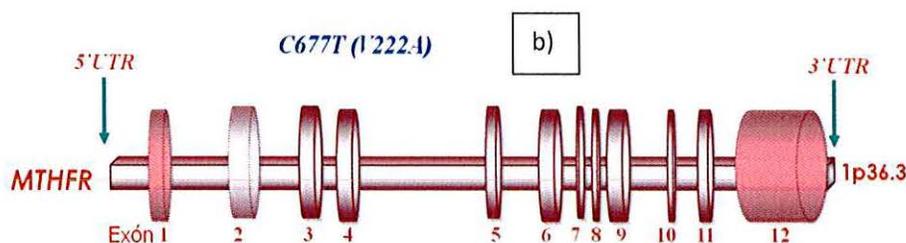
La Metilen tetrahidratofolato reductasa (MTHFR) es una enzima (Figura 10) clave en el ciclo metabólico del ácido fólico, necesaria para la conversión de la homocisteína (aminoácido tóxico en el organismo), a metionina, metabolito esencial en la metilación y síntesis del ADN.



**Figura 10.** Estructura tridimensional de la enzima MTHFR (Yamada, 2005).

La enzima MTHFR es codificada por el gen del mismo nombre (*MTHFR*) el cual se localiza en la posición 1p36.3, tiene un tamaño de 2.2 Kb y está compuesto por 11 exones (103-432 pb), como se observa en la figura 11.





**Figura 11.** Representación gráfica de la ubicación del gen *MTHFR* en el cromosoma 1p36.3 (a) y la estructura del gen (b).

El estudio realizado por Chen *et al*, 2005 mostró un mayor riesgo de desarrollar CaMa en individuos portadores del genotipo 677TT en comparación con aquellos portadores del genotipo silvestre (677CC). En el trabajo realizado por Ericson *et al* (2009) observaron un alto riesgo de desarrollar CaMa en mujeres de la población sueca (Malmö) menores a 55 años de edad, portadoras del alelo 677T. De igual manera, Maruti *et al* (2009) encontraron en su estudio, un incremento del 62%, en el riesgo de desarrollar CaMa, en mujeres postmenopáusicas poseedoras del genotipo 677TT. En población japonesa, Suzuki *et al* (2008) identificaron también una correlación entre el genotipo 677TT y la proliferación de tumores malignos de mama, en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación entre la presencia del genotipo 677TT y el riesgo a desarrollar CaMa (Plateck *et al*, 2009; Vahid *et al*, 2010).

Estudios en México han reportado una alta prevalencia del genotipo 677TT (Zuñiga *et al*, 2008), sobre todo, en habitantes de los diversos grupos étnicos (Dávalos *et al*, 2000). En contraste, la población mestiza mexicana presenta diferencias muy marcadas en las distintas regiones del país; un ejemplo se presenta en el Estado de Yucatán, ubicado al sureste del país, en donde se reportó la frecuencia alélica más alta del alelo mutado (677T) con el 54% (González, 2002), mientras que en el norte del país la frecuencia observada para el mismo alelo en los estados de Chihuahua y Nuevo León fue de 38 y el 35.9% respectivamente (Chávez, 2004; Aguirre-Rodríguez *et al*, 2008).

El CaMa es una enfermedad cuya incidencia y prevalencia se ha visto incrementada alarmantemente en los últimos años, convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial (Globocan, 2008). En México, como en la mayor parte de Latinoamérica la mortalidad por esta enfermedad es muy alta en comparación con países desarrollados.

Los estudios genéticos podrían ser una herramienta clave para la prevención del CaMa. El polimorfismo C677T, del gen *MTHFR*, es considerado como un factor de riesgo en mujeres portadoras del genotipo homocigoto 677TT, debido al papel que desempeña la enzima MTHFR en la reparación y síntesis del ADN (Maruti *et al*, 2009; Ericson *et al*, 2009; Chen *et al*, 2005).

A pesar de que el polimorfismo MTHFR C677T ha sido estudiado, los resultados en cuanto a la asociación que éste pueda tener con el desarrollo de CaMa son muy variables, por lo que el estudio de este polimorfismo en distintas regiones de México brindaría datos más exactos sobre su prevalencia y asociación con el CaMa

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaMa es la malignidad con mayor incidencia en mujeres, con una estimación anual de 1.38 millones de nuevos casos diagnosticados en el mundo y un total de 458,000 defunciones. Aunque la mayor incidencia se presenta en países desarrollados, las defunciones se concentran principalmente en países en vías de desarrollo (Globocan, 2008).

En México y sobre todo en el Estado de Jalisco, los casos de CaMa han incrementado considerablemente, incluso han desplazando al cáncer cérvico-uterino como la principal causa de muerte por tumor maligno en mujeres (INEGI, 2011).

Diversos factores han influido en el incremento en el número de casos de CaMa, como los ambientales, genéticos, el estilo de vida de la población, y los deficientes métodos de prevención en el sector salud entre otros.

A pesar de que el polimorfismo MTHFR C677T ha sido estudiado, los resultados en cuanto a la asociación que éste pueda tener con el desarrollo de CaMa son muy variables. El presente trabajo se centró en la prevalencia de éste polimorfismo en el Estado de Jalisco y la asociación del mismo con CaMa en mujeres pre y postmenopáusicas.

## JUSTIFICACIÓN

Los estudios genéticos abren un nuevo campo de estudio en el pronóstico de enfermedades y padecimientos a los que las personas pueden ser susceptibles tales como el cáncer. El estudio del polimorfismo *MTHFR* C677T en distintas regiones de México aportaría datos más exactos sobre su prevalencia y su asociación con CaMa.

## **HIPÓTESIS**

El alelo T del polimorfismo *MTHFR* C677T se asocia al desarrollo de CaMa en mujeres pre y postmenopáusicas del Estado de Jalisco.

## OBJETIVOS

Determinar si existe asociación entre el polimorfismo *MTHFR* C677T y el cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas del Estado de Jalisco.

Objetivos particulares.

1-Determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo *MTHFR* C677T en mujeres con cáncer de mama del Estado de Jalisco y en un grupo control de referencia.

2-Conocer las frecuencias genotípicas del polimorfismo *MTHFR* C677T en mujeres con cáncer de mama del Estado de Jalisco.

3-Analizar la asociación del polimorfismo *MTHFR* C677T con cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas.

## MATERIALES Y METODOS

**Tipo de estudio:** Transversal analítico

**Sede:** El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inmunología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara. Se contó con la colaboración de los hospitales de Ginecoobstetricia (HGO) y de Especialidades (HE) del Centro Médico Nacional de Occidente (CMNO) y el Instituto Jalisciense de Cancerología (IJC).

**Universo de estudio y tamaño de muestra:**

Se captaron 131 mujeres con diagnóstico inicial de CaMa que acudieron a los Hospitales HGO, HE e IJC, residentes del Estado de Jalisco y que aceptaron participar en el estudio mediante la firma de una carta de consentimiento informado. Se obtuvo un grupo de referencia de 128 individuos (hombres y mujeres) que acudieron al laboratorio de análisis clínicos del HE del CMNO.

**Criterios de inclusión:**

Mujeres mayores de 18 años, residentes del Estado de Jalisco con diagnóstico inicial de cáncer de mama invasor realizado durante los últimos 24 meses sin haber recibido quimioterapia, previa a la toma de sangre.

**Criterios de no inclusión:**

Mujeres extranjeras y/o con antecedente personales o familiares de cáncer de mama.

**Criterios de exclusión:**

Mujeres provenientes de otros estados de la Republica mexicana, en estado perimenopáusico, o con expediente clínico incompleto.

Muestras perdidas involuntariamente durante los procedimientos y/o no genotipificadas

**Definición de variables:**

*Dependiente:*

Cáncer de mama

Premenopáusia

Postmenopáusia

Residentes del Estado de Jalisco

Independiente:

Polimorfismo C677T del gen *MTHFR*.

**Captación de muestras del grupo control:**

Se realizó una punción venosa en individuos que acudieron al laboratorio clínico del Hospital de Especialidades del CMNO. Se colectaron alrededor de 5 mL de sangre completa periférica en un tubo de recolección con EDTA como anticoagulante. Las muestras se rotularon con un número y códigos de barras para mantener la confidencialidad de las pacientes y los individuos reclutados.

**Captación de muestras de pacientes:**

Se acudió a los Hospitales HGO, HE e IJC para realizar la punción venosa en las pacientes candidatas que aceptaron participar. Se colectaron alrededor de 5 mL de sangre completa periférica en un tubo de con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron rotuladas con un número y código de barras para mantener la confidencialidad de las pacientes.

**Aspectos éticos**

A todas las mujeres incluidas en el estudio, se les entregó un consentimiento informado para su participación, en donde se les explicó el objetivo del estudio, los procedimientos a realizar así como los beneficios que se obtendrían para la sociedad que los resultados del estudio.

Los procedimientos realizados para su diagnóstico y el tratamiento de la patología fueron los de rutina en cada institución, con excepción de la toma de sangre para la extracción de ADN. El estudio se consideró con un riesgo mínimo para la salud de las mujeres, de acuerdo al artículo 17 de la Ley General de Salud en Investigación para la Salud.

Todos los miembros que participaron directamente en el proyecto contaron con el certificado "*Protecting Human Research Participants*" expedido por el National Institutes of Health (NIH), para hacer investigación con participantes humanos.

### **Extracción de ADN genómico**

El ADN fue extraído por el método de precipitación de sales de Miller (1988) fue reconstituido en 1 mL de agua inyectable y almacenado a -20 °C (ver apéndice).

### **Cuantificación del ADN**

El ADN obtenido fue analizado por espectrofotometría para determinar su concentración y pureza (ver apéndice). Posteriormente fue homogenizado con agua estéril y separado en alícuotas con una concentración final de 100 ng/μl para ser utilizadas en la PCR.

### **Reacción en cadena de la polimerasa**

Se realizó la amplificación del fragmento de interés con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-Polimerase Chain Reaction) con iniciadores previamente descritos, (Frosst *et al*, 1995) (ver apéndice). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-2000 con las condiciones mostradas en el cuadro 3 (ver apéndice).

### **Polimorfismos en longitud por fragmentos de restricción**

La detección de los genotipos para el gen *MTHFR* se realizó mediante la detección de polimorfismos en longitud por fragmentos de restricción (RFLP) siguiendo las instrucciones de Frosst *et al* (1995) (ver apéndice).

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Los geles fueron preparados con poliacrilamida 29:1 (ver apéndice), el fragmento amplificado correspondió a una banda de 197 pb.

### **Identificación de genotipos**

Los fragmentos obtenidos en las muestras fueron de 198 pb (alelo C) y de 175 pb (alelo T), en el caso de heterocigotos (CT) se presentaron los dos fragmentos; los datos fueron registrados y utilizados para el conteo génico y las pruebas estadísticas.

### Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas en la población general (PG) y el grupo de CaMa, así como los grupos de mujeres pre y postmenopáusicas. El grupo control fue sometido al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). La proporción de genotipos observados se comparó mediante el análisis de Finetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) y pruebas de  $\chi^2$ . Se realizaron pruebas de asociación de riesgo (OR>1) entre los grupos de estudio; con un intervalo de confianza (IC) del 95% (Strom, 2007).

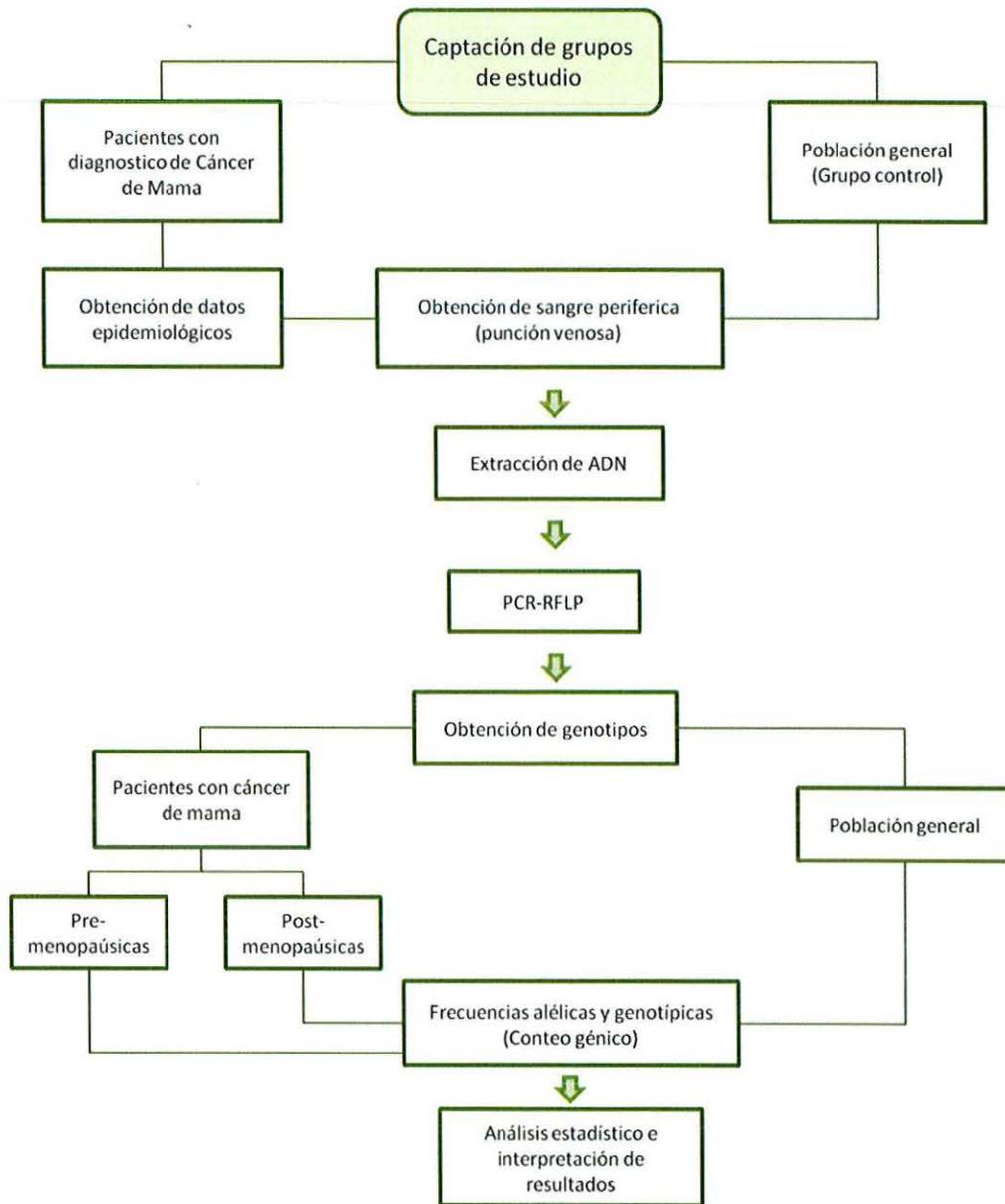
El cálculo de las frecuencias alélicas de los grupos PG y CaMa, fueron determinadas de acuerdo al binomio  $(p+q)^2$  donde:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde:  
p= alelo C  
q= alelo T

p<sup>2</sup>= genotipo CC homocigoto  
2pq= genotipo CT heterocigoto  
q<sup>2</sup>= genotipo TT homocigoto

### Diagrama de flujo



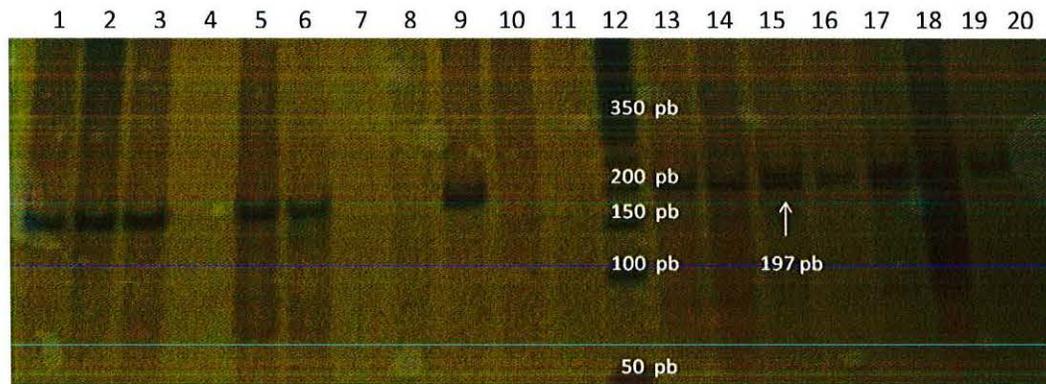
**Figura 12.** Diagrama de flujo de los procedimientos realizados en el trabajo.

## RESULTADOS

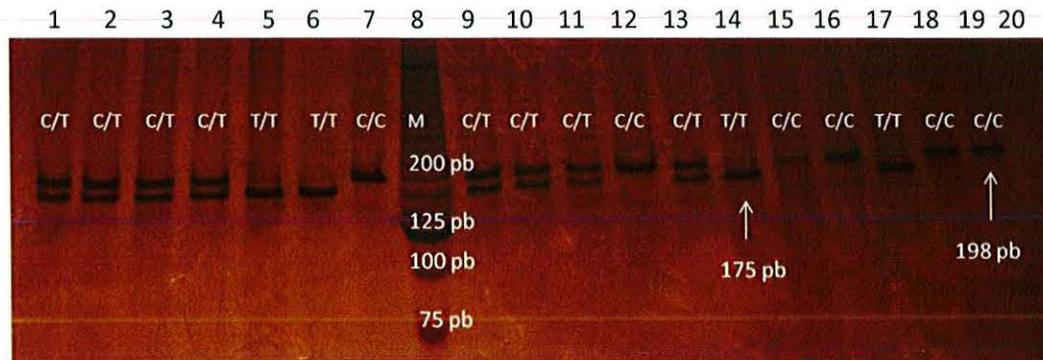
### Tipificación de las muestras

Se determinaron los genotipos de cada una de las muestras (Figura 13 y 14). Las muestras en las que posterior a la digestión tenían un solo fragmento se genotipificaron como homocigotos para el alelo silvestre 677C o para el alelo mutante 677T, mientras muestras que presentaron dos fragmentos (195 y 175 pb) se tipificaron como heterocigotos (677C/677T).

Al finalizar los ensayos experimentales, las muestras se dividieron en dos grupos: el primero fue el del grupo control (PG) constituido por 128 muestras de individuos de ambos sexos de la población general y el segundo pacientes con diagnóstico inicial de CaMa con 131 muestras. Así mismo este último grupo se clasificó de acuerdo al estado menopáusico; el de mujeres premenopáusicas constituido por 41 individuos, el de mujeres postmenopáusicas con 81 individuos y nueve pacientes en estadio perimenopáusico, las cuales fueron excluidas de este estudio.



**Figura 13.** Gel de poliacrilamida (6%) de la PCR, teñido con nitrato de plata. Los carriles 1,2,3,5,6,9,13,14,,15,16,17 y 19 corresponden a muestras con el fragmento amplificado (197 pb). Los carriles 4, 7, 8, 10,11 y 20 corresponden a muestras sin amplificación del fragmento esperado. El carril 4 corresponde al control (blanco). El carril 12 corresponde al Marcador escalera (M) 50 pb.



**Figura 14.** Gel de poliacrilamida (6%) de la digestión de los fragmentos amplificados, teñido con nitrato de plata. Muestras sometidas a incubación con la enzima de restricción. Los carriles 7, 12, 15, 16, 18 y 19 corresponden a homocigotos para el alelo silvestre (677CC). Los carriles 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 y 13 corresponden a heterocigotos (677CT). Las carriles 5, 6, y 17 corresponden a homocigotos para el alelo mutado (677TT). El carril 20 no presentó amplificación de fragmentos. El carril 8 corresponde al Marcador escalera (M) de 25 pb.

## Frecuencias genotípicas y alélicas

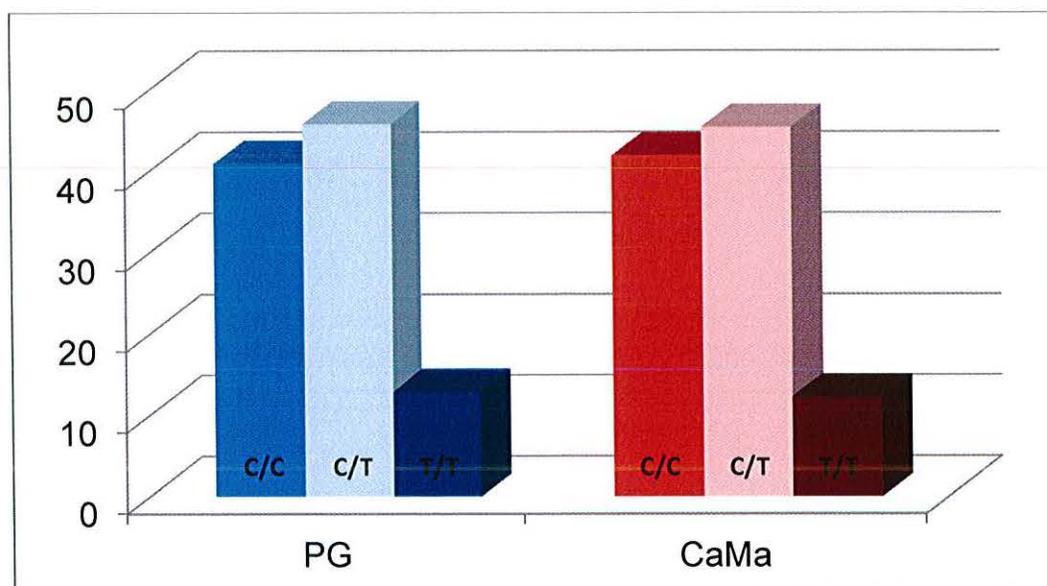
Las frecuencias genotípicas para cada grupo de estudio se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en grupos PG y CaMa.

GRUPO	GENOTIPOS (Frecuencia relativa %)			TOTAL (N)
	CC	CT	TT	
PG	52 (0.411)	60 (0.46)	16 (0.129)	128
CaMa	57 (0.421)	56 (0.456)	18 (0.123)	131

PG: Población general. CaMa: Cáncer de mama.

La representación gráfica de las frecuencias genotípicas de los grupos PG y CaMa, se muestra en la figura 15.



**Figura 15.** Frecuencias genotípicas (%) del gen *MTHFR* 677 en el grupo control (PG); CC: 41.1, CT: 46, TT: 12.9 y en el grupo de Cáncer de mama (CaMa); CC: 42.1, CT: 45.6, TT: 12.3.

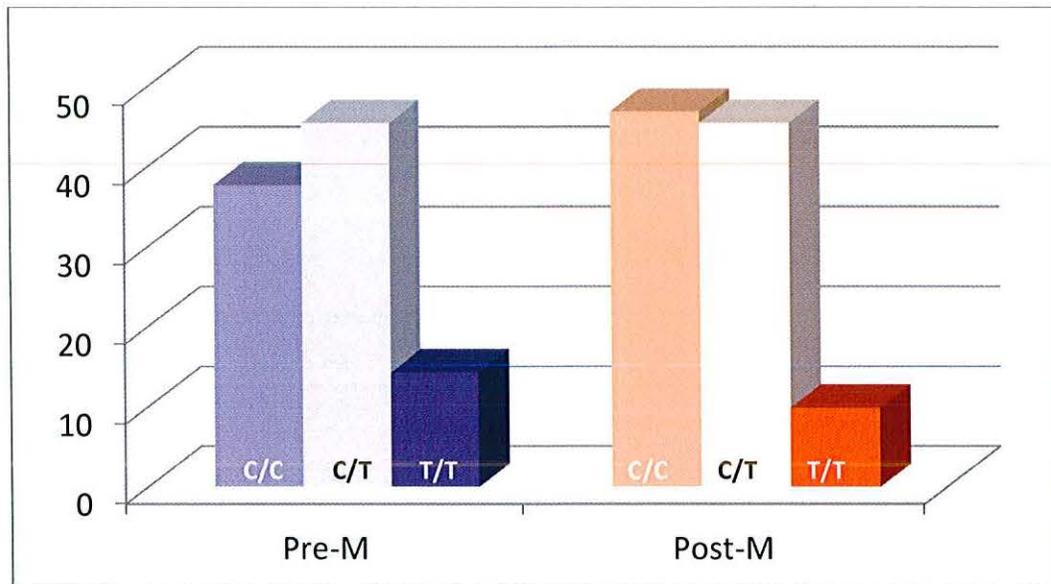
Una vez obtenidos los genotipos de las mujeres con CaMa, se agruparon de acuerdo a su estadio menopáusico (Pre-M y Post-M), los resultados se muestran en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en grupos Pre-M y Post-M.

GRUPO	GENOTIPOS (Frecuencia relativa %)			TOTAL (N)
	CC	CT	TT	
Pre-M	18 (0.378)	15 (0.47)	8 (0.143)	41
Post-M	37 (0.47)	37 (0.432)	7 (0.099)	81

Pre-M: Pre menopáusicas. Post-M: Post menopáusicas.

La representación gráfica de las frecuencias genotípicas de las mujeres pre y post menopáusicas se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** Frecuencia genotípica (%) del gen *MTHFR* 677: Pre-M; CC: 37.8, CT: 47, TT: 14.3. Post-M; CC: 47, CT: 43.2, TT: 9.9.

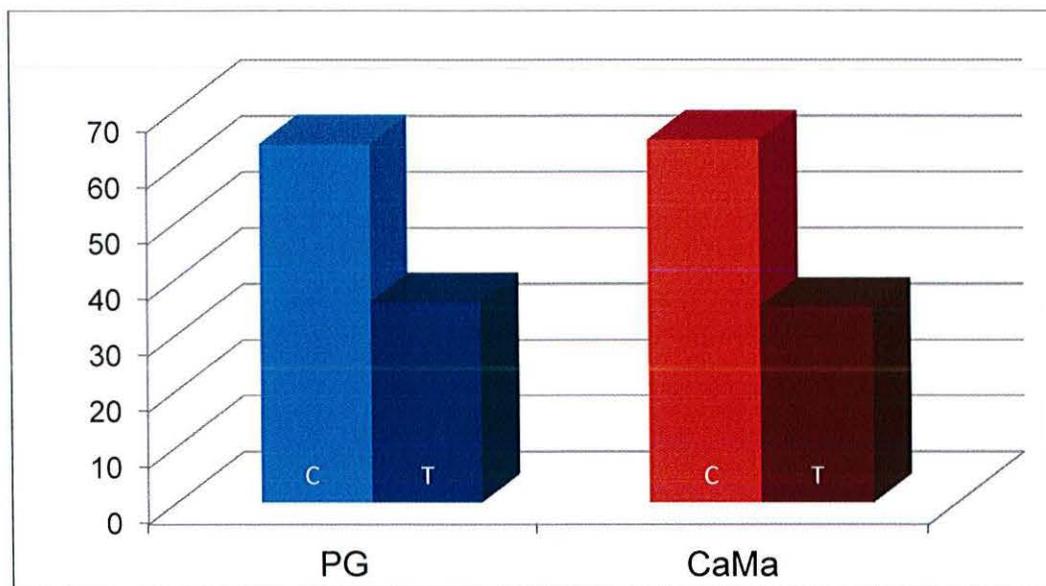
Las ORs del genotipo de riesgo (TT vs CC) para los grupos PG/Post-M y Pre-M/Post-M fueron: 0.615 y 0.426;  $p$ : 0.471 y 0.143 respectivamente, por lo que no representaron un factor riesgo para el desarrollo de CaMa ( $OR = o < 1$ ). Las frecuencias alélicas de los grupos PG y CaMa se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Frecuencias alélicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en grupos PG y CaMa.

GRUPO	ALELOS (Frecuencia relativa %)		TOTAL (N)
	C	T	
PG	164 (0.641)	92 (0.359)	256
CaMa	170 (0.649)	92 (0.351)	262

PG: Población general. CaMa: Cáncer de mama.

La representación gráfica de las frecuencias alélicas de los grupos CaMa y PG se muestra en la figura 17.



**Figura 17.** Frecuencia alélica (%) del gen *MTHFR* 677. PG; C: 64.1, T: 35.9. CaMa; C: 64.9, T: 35.1.

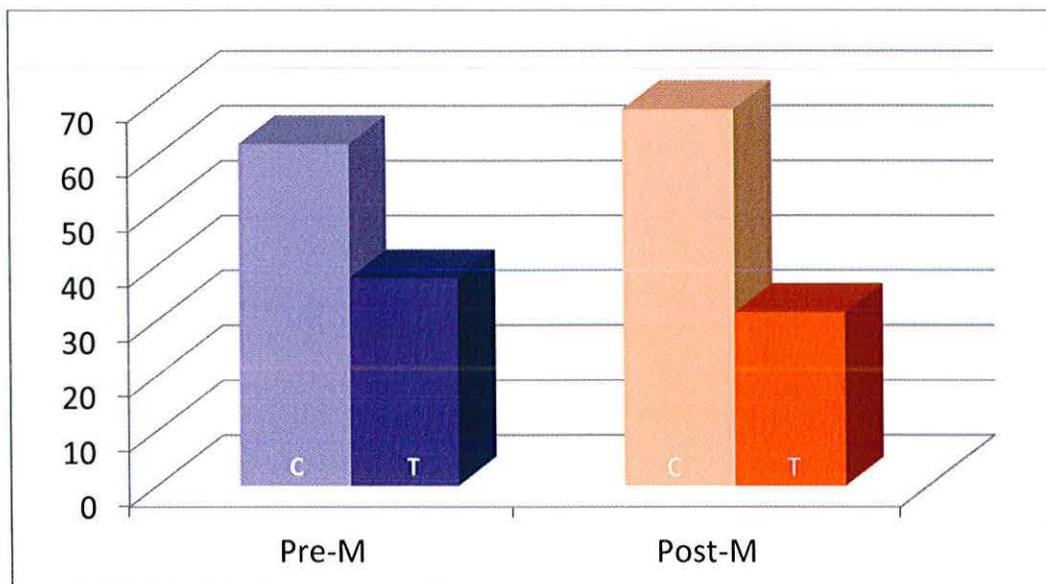
Las frecuencias alélicas del gen *MTHFR* en los grupos de mujeres Pre-M y Post-M se muestra en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Frecuencias alélicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en grupos Pre-M y Post-M.

GRUPO	ALELOS (Frecuencia relativa %)		TOTAL (N)
	C	T	
Pre-M	51 (0.622)	31 (0.378)	82
Post-M	111(0.685)	51 (0.315)	162

Pre-M: Premenopáusicas. Post-M: Postmenopáusicas.

La representación gráfica de las frecuencias alélicas de los grupos Pre-M y Post-M se muestra en la figura 18.



**Figura 18.** Frecuencia alélica (%) del gen *MTHFR* 677. Pre-M; C: 62.2, T: 37.8. Post-M; C: 68.5, T: 31.5.

Para los grupos PG/CaMa, PG/Pre-M y Post-M/Pre-M la OR para el genotipo de riesgo fue: 1.026, 1.444 y 2.349 respectivamente, sin embargo no presentaron una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ );  $p$ : 0.947 y 0.471, 0.143 respectivamente.

### Análisis de resultados

El grupo PG cumplió con el equilibrio Hardy-Weinberg ( $P = 0.83$ ), por lo que puede ser utilizado como grupo control de referencia. Una  $OR = o > 1$  representa un factor de riesgo. Una  $p < 0.05$  representa una diferencia estadísticamente significativa asociada al factor de riesgo. A continuación se muestran las comparaciones estadísticas realizadas entre los grupos (Cuadro 6). Se consideró al alelo T como el alelo de riesgo para realizar las comparaciones.

**Cuadro 6.** Comparaciones genóticas entre los diferentes grupos de estudio.

Genotipos MTHFR C677 ( Al silvestre)<>( Al de riesgo)		Comparación de grupos	OR s (95% IC s)	p
C	T			
		PG/CaMa		
	CC	52/57	1.00 (Ref)	
	CT (11)<>(12)	60/56	0.851 (0.505-1.437)	0.546
	TT (11)<>(22)	16/18	1.026 (0.475-2.219)	0.947
		PG/Pre-M		
	CC	52/18	1.00 (Ref)	
	CT (11)<>(12)	60/15	0.722 (0.331-1.575)	0.412
	TT (11)<>(22)	16/8	1.444 (0.430-1.779)	0.471
		PG/Post-M		
	CC	52/37	1.00 (Ref)	
	CT (11)<>(12)	60/37	0.867 (0.481-1.560)	0.633
	TT (11)<>(22)	16/7	0.615 (0.230-1.643)	0.329
		Pre-M/Post-M		
	CC	18/37	1.00 (Ref)	
	CT (11)<>(12)	15/37	1.200 (0.527-2.733)	0.663
	TT (11)<>(22)	8/7	0.426 (0.133-1.358)	0.143
		Post-M/Pre-M		
	CC	37/18	1.00 (Ref)	
	CT (11)<>(12)	37/15	0.833 (0.366-1.898)	0.663
	TT (11)<>(22)	7/8	2.349 (0.736-7.496)	0.143

11 (CC), 12 (CT), 22 (TT). OR (Odds ratio). IC (Intervalo de confianza).

## DISCUSIÓN

La deficiencia en el metabolismo del ácido fólico, por la presencia del polimorfismo *MTHFR* C677T en individuos homocigotos con el genotipo TT, supone un mayor riesgo a desarrollar CaMa en mujeres (Chen *et al*, 2005; González, *et al*, 2005). En el presente trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas y alélicas de los grupos con CaMa y control ( $p>0.05$ ). Así mismo, no se encontró una asociación entre la presencia del polimorfismo *MTHFR* C677T y el desarrollo de CaMa en mujeres pre y postmenopáusicas del Estado de Jalisco.

Las frecuencias genotípicas obtenidas en el presente estudio fueron: para PG (grupo control): CC=41.1, CT= 46, TT=12.9; para los casos CaMa: CC= 42.1, CT= 45.6, TT=12.3, mientras que para los subgrupos del grupo de CaMa Pre-M y Post-M fue de CC= 37.8, CT= 47, TT= 14.3 y CC= 47, CT= 43.2, TT= 9.9 respectivamente. Estas frecuencias varían en comparación con otros estudios realizados en otras poblaciones. Por ejemplo, en un estudio realizado en Inglaterra (Campbell *et al*, 2002), se obtuvieron frecuencias genotípicas para el grupo control y el grupo con CaMa de: CC= 50.6, CT= 39.5, TT= 9.9 y CC= 41.8, CT= 48.4, TT= 9.8, respectivamente y se observó un riesgo estadísticamente significativo a desarrollar CaMa (OR 1.43, 95% CI 1.02–2.00) en mujeres portadoras del genotipo TT, el cual de acuerdo a sus resultados aumenta en las mujeres >40 años de edad (OR 1.64, 95% CI 1.12–2.41).

Estudios realizados en México; en la región norte del país, específicamente en el Estado de Nuevo León, muestran un alta prevalencia del genotipo TT para el polimorfismo *MTHFR* C677T, 20.5% en un grupo control y 23.5% en un grupo de pacientes con cáncer gástrico (Zuñiga-Noriega *et al*, 2008). En otro estudio realizado en población general del Estado de Nuevo León, con una muestra compuesta por 533 individuos (hombres y mujeres), se obtuvo una frecuencia del 19.7% para el genotipo homocigoto TT (Aguirre-Rodríguez *et al*, 2008).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran una frecuencia para el genotipo 677TT del 12.9% y una frecuencia del alelo mutado 677T del 35.9%. Estos resultados revelan la diferencia que existe en distintas partes del país, respecto a la prevalencia del el genotipo 677TT, demostrando así, la heterogeneidad étnica existente en México.

En el cuadro 7 se comparan las frecuencias genotípicas del polimorfismo *MTHFR* C677T en el Estado de Jalisco y otras poblaciones control de distintos países.

**Cuadro 7.** Frecuencias genotípicas del polimorfismo *MTFRR* C677T en diversas poblaciones control.

PAÍS/REGIÓN	GENOTIPOS		
	CASOS (FRECUENCIA %)		
	CC	CT	TT
USA	301 (46.5)	284 (43.9)	62 (9.6)
IRAN	56 (57.7)	37 (38.1)	4 (4.1)
INDIA	19 (59.3)	12 (36.3)	2 (6.1)
REINO UNIDO	118 (50.6)	92 (39.5)	23 (9.9)
JAPON	338 (37)	425 (47)	146 (16)
MÉXICO (Jalisco)	52 (41.1)	60(46)	16 (12.9)

Es conocida la relación que existe, entre el desarrollo de CaMa y la edad (Ericson *et al*, 2009). En varios estudios se reporta que la mayor cantidad de casos de mujeres con CaMa se presenta en mujeres en estado postmenopáusicas (>55 años de edad). Un ejemplo es el estudio realizado por Maruti *et al* (2009), en el cuál el grupo de mujeres post menopáusicas con el genotipo 677TT presentó un riesgo más alto de desarrollar CaMa, en comparación a los individuos con el genotipo silvestre 677CC (OR: 1.62; 95%; CI: 1.05 – 2.48). De manera similar en el estudio realizado por Suzuki *et al* (2008) se observó que la prevalencia del genotipo homocigoto 677TT, en mujeres en estadio postmenopáusicas aumenta significativamente el riesgo de desarrollar CaMa en comparación a mujeres post menopáusicas con el genotipo 677CC (OR: 1.83, 95%, CI: 1.08 – 3.11).

Aunque en el Estado de Jalisco no se encontraron diferencias significativas en los grupos Pre-M y Post-M, si se observó una mayor prevalencia del genotipo TT en mujeres en Pre-M (14.3%) que en aquellas Post-M (9.9%). Además, se encontró una mayor prevalencia del genotipo CT (47%) en el grupo Pre-M. Comparaciones entre los grupos Pre-M/Post-M y Post-M/Pre-M arrojaron datos, que aunque no fueron estadísticamente significativos, se mostraron cercanos al valor significativo  $p < 0.05$ . La comparación de los grupos Pre-M/Post-M mostró una OR de 2.819 en los portadores del genotipo heterocigoto 677CT con una  $p$  de 0.07 y un IC de 0.868-9.161.

El estudio de otros polimorfismos asociados al desarrollo de CaMa en mujeres, sobre todo de aquellos genes que participan en el metabolismo del ácido fólico como son los polimorfismos 1298 y 1793 en el gen *MTHFR*, aunado al estudio

comparativo de haplotipos entre poblaciones, puede brindar una perspectiva más amplia de la relación que guarda la presencia de los haplotipos y un riesgo más alto a desarrollar la enfermedad.

En la población general del Estado de Jalisco la frecuencia del alelo T fue de 35.9% y de 37.8%, para el grupo Pre-M. Esta frecuencia es mucho menor a la reportada en el estudio realizado en Estado de Yucatán (Sureste del país), en el cual se reporta una frecuencia del 54% para el alelo mutado (Gonzalez *et al* , 2002). No obstante la prevalencia obtenida en el presente trabajo se mantiene por encima de otras poblaciones estudiadas (Vahid, 2010).

Aunque los resultados obtenidos en el presente estudio no muestran una asociación entre el polimorfismo del gen *MTHFR* y el CaMa, los datos generados pueden ser utilizados para complementar otros trabajos y permiten una mejor comprensión del comportamiento y la presencia del polimorfismo *MTHFR* C677T en el Estado de Jalisco y en el país.

Un incremento en el número de muestras analizadas, podría proporcionar en un corto plazo datos más concluyentes de la importancia que juega el polimorfismo *MTHFR* C677T, en la susceptibilidad a desarrollar CaMa en mujeres.

## CONCLUSIONES

- 1) No se observó una asociación del polimorfismo *MTHFR* C677T con cáncer de mama en mujeres del Estado de Jalisco, respecto a la población control de referencia.
- 2) No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *MTHFR* C677T de acuerdo al estadio menopaúsico en mujeres con cáncer de mama del Estado de Jalisco.
- 3) De acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio, no hay asociación entre el polimorfismo *MTHFR* C677T y el desarrollo de cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas del Estado de Jalisco.

## LITERATURA CITADA

Aguirre-Rodríguez, A., L. E. Martínez, M. Velazco, E. Sampallo, E. Esmer, (2008), "Prevalencia del polimorfismo MTHFR 677T en una muestra de la población de Nuevo León, México", *Salud pública de México*. 50, 1.

Ahmedin, J., F. Bray, M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, (2011), "Global Cancer Stastics". *Cancer Journal*.

American Cancer Society (ACS). "Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012". Atlanta: American Cancer Society, Inc.

Benitez, J. y A. Osorio (2006), "Genes de susceptibilidad implicados en el cáncer de mama y ovario hereditario", en J. Días-Faes y A. Ruibal (Comps.), *Cáncer de mama: Avances en diagnóstico, tratamiento e investigación*, España, Sistemas editoriales, pp. 17-32.

Brandan M, y Villaseñor-Navarro, (2006), "Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México", *Cancerología* 1,1pp. 147-162.

Breast. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC. 2010, eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, pp 347-76.

Campbell, G., S. Baxter, D. Eccles, D. Choong, (2002), "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and susceptibility to breast cancer", *Breast cancer research*, 4, 6, pp. 1-4.

Chávez, D., (2004), "Asociación de ácido fólico, MTHFR con DRN y labio hendido con y sin paladar hendido en Chihuahua (tesis)", Chihuahua, Universidad Autónoma de Chihuahua.

Chen, J., D. Gammon, W. Chan, (2005), "One-carbone metabolism, *MTHFR* polymorphisms, and risk of breast cancer", *Cancer research*, 65, 4, pp. 1606-1614.

Cooper, M. y Geoffrey, (2000), *The cell a molecular approach*. Boston University. Sunderland (MA).

Curtin, K., J. Bigler, M. L. Slattery, B. Caan, J. D. Potter, C. M. Ulrich, (2004), "MTHFR C677T and A1298C Polymorphisms: Diet, Estrogen, and Risk of Colon Cancer", *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 13, pp. 285-292.

Dávalos, I.P., N. Olivares, M.T. Castillo, J.M. Cantú, B. Ibarra, L. Sandoval, (2000), "The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in mexican mestizo and native populations". *Ann Gen*, 43. pp. 89-92.

Ericson, U., E. Sonestedt, M. L. Ivarsson,(2009), "Folate intake, Methylentetrahydrofolate reductase polymorphisms, and breast cancer risk in woman from the malmö diet and cancer cohort". *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention*, 18, 1, pp. 1101-1110.

Frosst, P, H. J. Blom, R. Milos, P. Goyette, C. A. Sheppard, R. P. Matthews, G. J. Boers, M. den Heijer, L. A. Kluijtmans, L. P. van den Heuvel, (1995), "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase", *Nat Genet*. May; 10 1, pp. 111-3.

González, L., G. García, I. Castillo, J. Canto, L. Orozco, (2002), "Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the state of Yucatán, Mexico", *Clin Genet*; 62, pp. 394-398.

González, M., B. Pérez, C. S. Puente, L.R. Desviat., M. Ugarte, M.L. Pérez, A. Pardo-Vigo, M. Maties, (2005), "Estudio del polimorfismo C677T del gen MTHFR y las concentraciones plasmáticas de homocisteína", *Química clínica*. 24, 1, pp. 41-45.

Globocan, (2008), International Agency for Research on Cancer. IARC,150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon, France. Revisado: 05 de Octubre del 2011 <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp#MORTALITY>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), (2011) Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer, 2011.

Knaul, F., G. Nigenda, R. Lozano, H. Arreola-Ornelas, A. Langer, J. Frenk, (2009), "Cáncer de mama en México: Una prioridad apremiante" *Reproductive Health Matters* ; 51, 2, pp. s335-s344.

Lake, D, (2007), Dx/Rx: Breast Cancer. Library of Congress Cataloging in Publication Data. ISBN 968-7620-93-5.

López, M ., A. González, (2010), Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), (2011), Revisado 26 de Diciembre de 2011. Disponible en [http://www.seom.org/seomcms/index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=125&Itemid=404](http://www.seom.org/seomcms/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=125&Itemid=404)

Martínez-Victoria, E. (2007) "Genómica nutricional". *La nueva nutrición. Nutrición clínica en medicina*, 1, 2, pp. 73-86.

Maruti, S., C. Ulrich, E. Jupe, E. White, (2009), "MTHFR and postmenopausal breast cancer risk by intakes of one-carbone metabolism nutrients: a nested case-control study", *Breast cancer research*, 11 6.

Miller, S, A., D.D. Dykes, H. F. Polesky, (1988), "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells", *Nucleic Acids Research*, 16, 3, pp. 1215.

Miyaki, K., (2010), "Genetic Polymorphisms in Homocysteine Metabolism and Response to Folate Intake: A Comprehensive Strategy to Elucidate Useful Genetic Information", *J Epidemiol* ; 20, 4, pp. 266-270.

National Cancer Institute (NCI), (2011), Revisado: 03 de Octubre del 2011. <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/seno/page4>

Pita-Rodríguez, G, (1998), "Ácido fólico y vitamina B12 en la nutrición humana", *Revista cubana aliment nutr*, 12, 2, pp. 107-119.

Platek, M. E., P. G. Shields, C. Marian, S. E. McCann, M. R. Bonner, J. Nie, C. B. Ambrosone, A. E. Millen, H. M. Ochs-Balcom, S. K. Quick, M. Trevisan, M. Russell, T. H. Nochajski, S. B. Edge, J. L. Freudenheim, (2009), "Alcohol consumption and genetic variation in *MTHFR* and *MTR* in relation to breast cancer risk", *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 18, 9, pp. 2453–2459.

Sambrook, J., D. W. Russell, (2001) "In vitro amplification of DNA by the polymerasechain reaction", *Molecular cloning: A laboratory manual*", Cold Spring Harbor, New York, CSH press, pp: 8.1-8.23.

Sanguinetti, C.J., E. Dias-Neto, E. Simpson, (1999) "Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*", 17, 5: pp. 914-21.

Siilverstein, V., (2006), *Cancer. Twenty-first Century Books*. ISBN-10 0-7613-2833-5. pp: 8-17.

Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), (2008). Revisado: 03 de Octubre del 2011. Disponible en: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index>

Suárez, M., (2003) "Ácido fólico: Nutriente redescubierto", *Acta médica costarricense*, 45, 1 pp. 5-9.

Stevens, V., M. Mc-Cullugh, A. Pavluck, (2007), "Association of polymorphisms in one-carbone metabolism genes and postmenopausal breast cancer incidence", *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention*, 16, pp. 1140-1147.

Strom, T. M., (2007) "Unmatched case-control studies: testing." FINETTI Revisado 15 de Octubre de 2011. Disponible en: from <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

Suzuki, T., K. Matsuo, K. Hirose, K. Hiraki, T. Kawase, M. Watanabe, T. Yamashita, H. Iwata, K. Tajima, (2008), "One-carbone metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer" *Carcinogenesis*, 29, 2, pp. 356-362.

Ulrich, C. M., K. Robien, H. L. McLeod, (2003) "Cancer Pharmacogenetics: Polymorphisms, Pathways and Beyond: The Biological-Pathway Approach. Fred Hutchinson". Cancer Research Center, Cancer Prevention Research, 3, 12, pp. 912-920.

Vahid, P., R. Farnaz, F. Zaker, A. Farzaneh, R. Parisa, (2010), "Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Risk of Myeloid Leukemia" *Lab medicine*; 41, 8, pp. 490-494.

Yamada, K., R. G. Matthews, (2005), "Biochemical Characterization of Human Methylenetetrahydrofolate Reductase and Its Common Variants. *MTHFR* Polymorphisms and disease". ISBN: 1-58706-217-8.

Zuñiga-Noriega, J. M., M. Velazco-Campos, A. Aguirre-Rodríguez, L. Martínez-Villarreal, E. Garza-González, H. J. Maldonado-Garza, F.J. Bosques-Padilla, (2008), "Polimorfismo C677T del gen MTHFR y el riesgo al desarrollo de cáncer gástrico distal en una población mexicana", *Rev Gastroenterol Mex*, 72, 4, pp.355-358.

## APÉNDICE

### TÉCNICAS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### Lista de reactivos

Ácido acético	$C_2H_4O_2$	
Ácido bórico	$H_3BO_3$	
Acrilamida	$C_3H_5NO$	
Bicarbonato de amonio	$NH_4HCO_3$	Caledon
Bis-acrilamida	$C_7H_{10}N_2O_2$	
Cloruro de amonio	$NH_4C$	Fisher
Cloruro de sodio	$NaCl$	Research organic
Etanol	$C_2H_6O$	
EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Invitrogen
Formaldehido	$H_3COH$	
Glicerol	$C_3H_8O_3$	
Hidróxido de sodio	$NaOH$	
Isopropanol	$C_3H_8O$	
Nitrato de plata	$AgNO_3$	
Persulfato de amonio	$K_2S_2O_8$	
SDS (Dodecilsulfato de sodio)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Invitrogen
TEMED(Tetrametiletilendiamina)	$C_6H_{16}N_2$	
Tris	$C_9H_{15}Br_6O_4P$	Invitrogen

#### Extracción de ADN método de precipitación con sales de Miller (Miller et al, 1988).

Fundamento: la extracción de ADN utilizada, se basa en la obtención del ADN a partir de leucocitos en sangre periférica, en donde las membranas celulares y nucleares son degradadas para la liberación del ADN.

Materiales: Muestra de sangre (5mL), Tubo de tapa morada  $K_2$  EDTA (BD Vacutainer), Tubos cónicos estériles de 50 y 10 mL, micropipeta y puntas estériles de 1000  $\mu$ L, microtubos de 2 mL, campana de flujo laminar, centrifuga refrigerada, microcentrífuga y vortex.

Reactivos y soluciones:

#### Solución amortiguadora de lisis de eritrocitos (1000mL)

Cloruro de amonio	0.144 M	7.702 g
Bicarbonato de amonio	0.01 M	0.158 g

Mezclar las dos soluciones quedando en una proporción 10:1.

**Solución amortiguadora de lisis de leucocitos (100mL)**

Tris	10 mM	0.1211 g
Cloruro de sodio	400 mM	2.3376 g
EDTA	2 mM	0.0744 g

Ajustar a un pH de 8.2 y aforar a 100 mL con agua desionizada.

**Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%**

SDS	10 g
-----	------

Aforar a 100 mL con agua desionizada.

**Solución de proteinasa k**

Proteinasa K	25 mg
SDS	0.25 g
EDTA	2 mM

Aforar a 25 mL con agua desionizada estéril.

**Solución de cloruro de sodio 6M**

Cloruro de sodio	6 M	17.532 g
------------------	-----	----------

Aforar a 50 mL con agua desionizada.

**Solución amortiguadora TE**

Tris	10 Mm	0.0605 g
EDTA	2 Mm	0.0037 g

Ajustar un pH de 2.5 y aforar a 5 mL con agua desionizada.

Procedimiento:

1-Vaciar el contenido del tubo de sangre, a un tubo cónico de 50 ml, aforando a 35 mL con buffer de lisis de eritrocitos 10:1.

2-Agitar vigorosamente por 1 min y refrigerar durante 20 min.

3- Agitar por 30s y centrifugar a 1,500rpm durante 20min a 4° C.

4-Decantar el sobrenadante y lavar el botón con la misma solución buffer de lisis de eritrocitos.

5-Repetir los pasos 3 y 4, hasta que el botón de leucocitos se observe limpio (2-3 veces).

6-Una vez limpio, agregar 3 ml de solución buffer de lisis de leucocitos, 200 µl de SDS (10%) y 500 µL de proteinasa K.

- 7-Agitar la solución en el vórtex hasta que el botón se disuelva.
- 8-Incubar el tubo a 37°C durante 48 h.
- 9-Adicionar 1 ml de cloruro de sodio (6M) y agitar vigorosamente durante 1 min.
- 10-Centrifugar a 2,000 rpm durante 15 min.
- 11-Transferir el sobrenadante (ADN) a un tubo cónico de 15 mL y adicionar dos volúmenes de Isopropanol frío.
- 12-Agitar por inversión hasta que se observen las hebras de ADN.
- 13-Transferir el ADN a un microtubo (2mL) y centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
- 14- Decantar el sobrenadante y adicionar 1mL de etanol (70%).
- 15-Repetir el paso 14 dos veces.
- 16-Ventilar el tubo con el ADN durante 24 h.
- 19-Agregar 1mL de agua inyectable y resuspender.
- 20-Colocar el microtubo a 37°C, hasta la disolución total del ADN (24-36 h).
- 21-Almacenar a 4 °C.

### **Cuantificación de ADN por Espectrofotometría (Sambrook y Russel, 2001)**

Fundamento: los métodos espectroscópicos se basan en la capacidad de las sustancias de absorber o emitir radiación electromagnética. Estos se pueden emplear para determinar la concentración de un reactivo o producto durante una reacción. El ADN absorbe una longitud de onda de 260 nm, mientras que las cadenas sencillas de ADN y ARN la absorben a 280 nm. Los carbohidratos y otros compuestos absorben a 230 nm.

Materiales y equipo: Micropipetas y puntas estériles de 1-10 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L, celdilla de cuarzo y espectrofotómetro.

Procedimiento:

- 1-Ajustar el espectrofotómetro a la longitud de onda de 260 y 280 nm para medición de ADN.

2- Colocar en la celdilla 501µL de agua inyectable como blanco y colocarlo en el espectrofotometro.

3-Colocar 500 µl de agua inyectable y depositarla la celdilla, adicionar 1 µL de muestra de ADN y mezclar.

4-Colocar la celdilla en el espectrofotómetro y obtener la densidad óptica (DO) a 260 nm para determinar la concentración de ADN y a 280 nm para determinar la concentración de proteínas.

5-Calcular la concentración y pureza del ADN a partir de los datos obtenidos.

La concentración de ADN se calcula tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar de 50 ng/mL de ADN, que tiene la máxima absorbancia de 1.0 unidad de DO a 260 nm y cuyo valor es 50 y la dilución usada. Para ello se utiliza la siguiente fórmula:

Conc. ADN ng/µL = DO 260 nm \* factor de dilución (501µl/1µl) \* 50 (valor constante).

6-Determinar la pureza del ADN con la siguiente fórmula:

Pureza del ADN = DO 260 nm/ DO 280 nm.

El valor mínimo de pureza debe de ser mayor a 1.4 para reacciones estándar de PCR.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Fundamento: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método *in vitro* para la síntesis de fragmentos específicos de ADN. Estos fragmentos son delimitados por secuencias cortas (cebadores), las cuales reconocen un sitio del ADN molde. Una vez delimitado, la amplificación del fragmento es realizada por la acción de una ADN polimerasa termoestable, la cual es sometida a varios ciclos, periodos y temperaturas, lo cual permite la amplificación exponencial del fragmento específico (Sambrook y Russel, 2001).

Reactivos y soluciones:

#### PCR (1 X)

Buffer	1X	1 µL
Cloruro de magnesio	2.5 mM	0.5 µL
dNTPs	200 µM	0.2 µL

Iniciador-1	5 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Iniciador-2	5 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
<i>Taq pol</i>	0.250 ng/ $\mu$ L	0.05 $\mu$ L
ADN	200 ng/ $\mu$ L	2 $\mu$ L

Aforar a 10  $\mu$ L con agua estéril.

En el cuadro 8 y 9 se muestran las secuencias de iniciadores y el programa del polimorfismo MTHFR C677T.

**Cuadro 8.** Iniciadores utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del polimorfismo MTHFR C677T (Curtin *et al*, 2004).

GEN	Secuencia de iniciadores	Longitud del fragmento amplificado (pb)
MTHFR 677	5 CCGAAGCAGGGAGCTTTG 3 (Forward)	197
	5 CGGTGCATGCCTTCACAA 3 (Reverse)	

.....pb: Pares de bases

**Cuadro 9.** Programa de amplificación del gen *MTHFR* por PCR.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. de ciclos	Descripción
1	94	5 min	1	Desnaturalización inicial
2	94	30 s	1	Desnaturalización
3	65	30 s	1	Alineamiento
4	72	30 s	1	Extensión
5	Pasos 2-4	Pasos 2-4	30 del paso 2-4	Pasos 2-4
6	72	10 min	1	Extensión final
7	4	$\infty$	-	Mantenimiento

### Polimorfismos en longitud por fragmentos de restricción

Fundamento: El método de tipificación, basado en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP-Restriction fragment length polymorphism) se utiliza en la identificación de subcadenas o fragmentos específicos conocidos (generalmente de 4-6 pb de longitud) mediante una enzima de restricción, la cual corta el sitio de reconocimiento. Esta técnica es ampliamente utilizada para identificar fragmentos de distintas longitudes.

Reactivos y soluciones:

### RFLP (1X)

Buffer (NEB 4)	1 $\mu$ L
<i>Hinf</i> 1	0.1 $\mu$ L
ADN (amplificado)	5 $\mu$ L
Agregar 3 mL de agua destilada.	

Se utilizó la endonucleasa de restricción *Hinf* 1 (*Haemophilus influenzae*) (Frosst *et al*, 1995). Un total de 5  $\mu$ L de producto amplificado fueron sometidos a una unidad de endonucleasa, incubado a 37°C durante 16 h.

### Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (29:1)

Fundamento: La electroforesis en geles de poliacrilamida utiliza matrices neutras eléctricamente para separar fragmentos de ADN bicatenarios de acuerdo a su tamaño y monocatenarios de acuerdo a su tamaño y conformación (Sanguinetti, 1994; Sambrook y Russel, 2001).

Materiales y equipo: Micropipetas y puntas estériles, cristales, base para el montaje de cristales, cámara de electroforesis, fuente de poder.

Reactivos y soluciones:

#### Solución amortiguadora TBE 10X

Tris	0.89 M	107.81 g
EDTA	0.025 M	9.306 g
Ácido bórico	0.89 M	55.025 g
Disolver en este orden y aforar a 1000 mL con agua destilada.		

#### Solución amortiguadora TBE 0.5X (1000mL)

Amortiguador TBE	10X	50 mL
Aforar a 1000 mL con agua desionizada.		

#### Poliacrilamida 29:1

Acrilamida	290 g
Bis-acrilamida	10 g
Aforar a 1000 mL con agua destilada.	

#### Poliacrilamida 6% (29:1) en TBE 0.5% (500 mL)

Poliacrilamida	29:1	100 mL
----------------	------	--------

Etanol	10%	100 mL
Ácido acético	0.05%	5 mL
Aforar a 1000 mL con agua destilada.		

**Solución de tinción**

Etanol	10%	100 mL
Ácido acético	0.05%	5 mL
Nitrato de plata	0.2%	2g
Aforar a 1000 mL con agua destilada.		

**Solución reveladora**

Hidróxido de sodio	3%	30g
*Formaldehido	37%	5 mL
Aforar a 1000 mL con agua destilada.		

\* Adicionar al momento de preparar la solución reveladora.

**Procedimiento:**

1-En un recipiente, agregar 35 mL de solución fijadora por cada gel durante 10 min.

2-Decantar la solución fijadora y agregar solución de tinción dejándolo reposarlo durante 10 min.

3-Retirar la solución de tinción y lavar con agua destilada dos veces.

4-Adicionar 35 mL de solución reveladora y 1 mL de formaldehido al 37 %, se deja reposar hasta la aparición de las bandas y lavar con agua corriente.

TBE	10 X	25 mL
Aforar a 500 mL con agua desinizada.		

**Jugo azul**

Azul de bromofenol	0.25%	0.025 mg
Xilencianol	0.25%	0.025 mg
Glicerol	30%	3 mL
Aforar a 10 mL con agua estéril.		

**Persulfato de Amonio (10 %)**

Persulfato de amonio	10%	1 g
Aforar a 10 mL con agua destilada.		

**Marcadores de peso molecular (110 µl)**

Marcador	7.5 µL
Agua inyectable	82.5 µL
Jugo azul	20 µL
Mezclar con un vortex.	

**Procedimiento:**

- 1-Limpiar y montar los cristales en la base donde será agregada la poliacrilamida.
- 2-En un recipiente, mezclar 35 mL de poliacrilamida 29:1 (6%), 400 µl de persulfato de amonio (10%) y 50 µL de TEMED, agitar levemente y vaciar en los cristales montados en la base.
- 3-Una vez polimerizada la poliacrilamida, colocar los cristales en la cámara de electroforesis y adicionar buffer de corrimiento TBE 0.5X.
- 3-Aplicar las muestras mezcladas (5µL) con jugo azul y un marcador de peso molecular de 50 pb.
- 4-Programar la fuente de poder a 180 V durante 40 min.
- 5-Desmontar los geles.

**Tinción con Nitrato de Plata**

Reactivos y soluciones:

**Solución fijadora**

## ANEXOS

I. Carta de consentimiento informado.

II. Los resultados preliminares de este trabajo fueron presentados en el XIII Congreso Internacional Avances en Medicina Hospital Civil de Guadalajara. Con el título: "Asociación de polimorfismos en los genes *MTHFR* y *TS* con el desarrollo de cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas" del 24 al 26 de Febrero del 2010. Guadalajara, Jal, México.

APPROBADO POR EL IRB DE LA UNIVERSIDAD DE ARIZONA. ESTE SELLO DEBE APARECER EN TODOS LOS DOCUMENTOS USADOS PARA OBTENER EL CONSENTIMIENTO DE LOS PACIENTES.  
FECHA: 07-30-09 VENCIMIENTO: 10-22-09

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE

Participante#: \_\_\_\_\_

BSC: 06-0856-02

TÍTULO: Estudio Comparativo de Cánceres del Seno y sus Factores de Riesgo en Mujeres Mexicanas en México y en los Estados Unidos de Norteamérica.

**Se me solicita leer el siguiente documento para garantizar que este informado acerca de la naturaleza de este estudio de investigación y de cómo será mi participación en él; en el caso de dar mi consentimiento para participar. Firmando este documento indicaré que he sido informado y que doy mi consentimiento. Disposiciones federales requieren un consentimiento informado por escrito antes de participar en dicho estudio de investigación y así de esta manera que yo conozca la naturaleza y los riesgos de mi participación y pueda decidir libre e informadamente si quiero participar o no.**

**Propósito**

He sido invitada a participar voluntariamente en el proyecto de investigación con título mencionado. El propósito de esta investigación es entender los factores de riesgo del cáncer del seno en mujeres con herencia mexicana. El estudio es conducido en el Centro del Cáncer de Arizona de la Universidad de Arizona. Se me ha pedido ser parte de éste estudio por que he sido diagnosticada con cáncer del seno y soy de descendencia mexicana.

El propósito de este estudio es entender los factores de riesgo que pudieran explicar el cáncer del seno en las mujeres con herencia mexicana. El estudio buscará los diferentes factores de riesgo del estilo de vida, genética y del medio ambiente entre mujeres con herencia mexicana diagnosticadas con cáncer del seno residentes en México y en los EEUU. Además, éste estudio comparará las características clínicas (edad de diagnóstico, etapa del tumor, tamaño del tumor, etc.) de tumores en el seno en mujeres con herencia mexicana en los EEUU con las mujeres viviendo en México.

En éste estudio, yo seré parte de un estudio binacional (EEUU y México) de cáncer del seno conducido por investigadores de las siguientes instituciones: El Centro del Cáncer de Arizona de la Universidad de Arizona, El Centro del Cáncer de M.D. Anderson de la Universidad de Texas, la Universidad de Guadalajara, la Universidad de Sonora y el Instituto Tecnológico de Sonora. Yo soy una persona elegible ha participar por que he sido diagnosticada con cáncer del seno.

**Criteria de Selección:**

Yo he sido invitada a participar en éste estudio por que:

- 1) Yo he sido recientemente diagnosticada con cáncer invasivo del seno durante los últimos 24 meses.
- 2) Yo soy de descendencia mexicana.
- 3) Yo tengo 18 años de edad o más.

Yo no calificaré si:

- 1) Soy un varón.
- 2) Previamente he tenido un diagnostico de cáncer de seno, incluyendo carcinoma ductal in situ.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE

BSC: 06-0856-02

---

---

3) Yo no estoy dispuesta a proveer el consentimiento para la colección del tejido cánceroso de mi seno.

4) Por razones de salud, no puedo dar mi consentimiento informado o no puedo responder a las preguntas en el cuestionario del estudio.

Un total de 1275 individuos participarán en éste estudio. 200 casos vendrán de Hermosillo, Sonora, 225 casos de Ciudad Obregón, Sonora y hasta 250 casos de Guadalajara, Jalisco. En los Estados Unidos, 250 casos vendrán de Tucson y Phoenix, Arizona, y 350 casos de Houston, Tejas. Se reclutarán a los participantes en el estudio durante un periodo de dos años. Mi participación en el estudio será nada mas de una visita.

### **Procedimiento:**

Si deseo participar en éste estudio, se me harán preguntas por un entrevistador calificado. Los temas incluirán datos demográficos (edad), historial de menstruación, historial de embarazos, uso oral de anticonceptivos y reemplazo de terapia hormonal, datos del historial médico, historial de cáncer en la familia, y factores del estilo de vida como actividades físicas y uso del alcohol. Me van a medir la cintura y la cadera. Todos estos procedimientos van a tomar de 40 minutos a una hora para completar el cuestionario. Datos clínicos como la información relacionada al diagnóstico y tratamiento se obtendrán también para éste estudio.

Con mi permiso, se obtendrán dos cucharadas de mi sangre (o una muestra de saliva que se escupe adentro de un frasquito/recipiente en el evento de que no se me pueda extraer la sangre). El material genético (ADN) va a ser extraído de la muestra de sangre o de la muestra de saliva.

El ADN recolectado en este estudio se utilizará para medir la cantidad hereditaria de tipo Europeo, Africano y Nativo Americano que heredó de sus padres. Solamente los investigadores de este estudio utilizarán su ADN.

### **Estudios futuros con los genes:**

Cualquier parte que sobre de la muestra de este estudio se guardará para el uso en el futuro. Cuando se haga posible, se harán pruebas con el ADN restante para encontrar nuevos genes relacionados al riesgo de cáncer de seno. Ni a usted ni a su doctor se les dará información acerca de los resultados. Estas pruebas son solamente para la investigación.

Los resultados de este estudio pudieran llegar a convertirse en nuevas invenciones o descubrimientos que pudieran tener valor comercial. No tendrían ni usted ni su familia derechos al material y no compartirían en ningún dinero u otro beneficio que pudiera resultar de estos estudios.

Al firmar este formulario está dando consentimiento para que se hagan estudios futuros, con genes, que pudieran realizarse en el laboratorio. En algunos casos una porción del ADN se pudiera mandar a otros laboratorios en la Universidad de Arizona o en otra institución que identifiquemos como colaborador de la investigación. Para proteger su privacidad ninguna información acerca de usted se incluirá con las muestras. Estas muestras se mandarán al laboratorio sin información que diga quién es usted. Etiquetamos las muestras con números que el laboratorio no puede trazar para llegar a usted o a su información.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE

BSC: 06-0856-02

---

---

\*\*\*Manejo de los resultados del estudio:

Éste es un estudio de investigación y su intención no es proveer información que se conozca que afecte a su cuidado médico. Si encontramos información que pudiera ser útil para su cuidado médico nos pondremos en contacto con usted o con su doctor si no la podemos contactar a usted. Si esto ocurre, el costo de haber visitado a su doctor y haberle hecho pruebas, que no sean pruebas de la investigación, será responsabilidad suya.

Yo daré mi consentimiento para que se entregue parte de mi tejido del seno después de la cirugía o después de la biopsia pre-operativa. Este tejido del tumor de la cirugía servirá para evaluar estándares clínicos y nuevos marcadores que sirvan para predecir el comportamiento del tumor con el tiempo y la respuesta al tratamiento

**Procedimiento Opcional:** Si estoy de acuerdo, mis muestras serán almacenadas en un banco de sangre y/o en un banco de tejido. Antes de que éstas muestras se puedan utilizar serán cuidadosamente revisadas y aprobadas por el Comité de Protección de Participantes Humanos de la Universidad de Arizona. (Usted no tiene que aceptar participar en este procedimiento opcional para poder participar en este estudio).

Ni los participantes ni los doctores recibirán reportes individuales de esta investigación. Los resultados no serán incluidos en el expediente de salud del participante. Toda esta información será confidencial y utilizada solamente para la investigación.

### **Riesgos:**

Mi participación en este estudio involucra algunos riesgos. Yo podría tener dolor, sangrado o moretones al obtener la muestra de sangre. Los participantes podrían desmayarse o desarrollar una infección rojiza e irritación de las venas en el lugar de obtención de la muestra de sangre.

Algunas preguntas en el cuestionario pueden resultar incómodas. Los participantes pueden oponerse a contestar cualquier pregunta que los haga sentirse incómodos. Usualmente el contestar el cuestionario no ocasiona ninguna ansiedad o preocupación a los participantes. Los participantes quienes tengan alguna duda después de contestar el cuestionario tienen el derecho de comunicarse con su médico o al investigador principal del estudio, Dra. María Elena Martínez, Ph.D. al (520) 626-8130.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE

BSC: 06-0856-02

---

### **Beneficios:**

Yo no recibiré ningún beneficio al participar en este estudio. Sin embargo, mi participación ayudará a los investigadores a entender mejor si ciertos factores de riesgo o las características de los tumores difieren entre las mujeres que viven en México y las mujeres México-Americanas viviendo en los EE.UU. Esta información podrá ayudar en estudios futuros a identificar mujeres con herencia mexicana quienes pudieran tener un alto riesgo para desarrollar el cáncer del seno. El estudio también podría ayudar a identificar tratamientos específicos necesarios para mujeres con herencia mexicana.

### **Confidencialidad:**

Mi información médica, personal y de mi salud recolectada en este estudio por la Dra. María Elena Martínez, Ph.D. (Investigador Principal), sus asociados y por el personal del estudio tal como las enfermeras y empleados de la clínica se mantendrá en manera confidencial.

Mis registros serán confidenciales. No seré identificada en ningunos reportes ni publicaciones que resulten del estudio. Es posible que quieran venir los representantes del patrocinador que apoya al estudio de investigación a la Universidad de Arizona a repasar mi información. Los representantes de las agencias regulatorias (los cuales incluyen el Programa de Protección de Participantes Humanos en la Universidad de Arizona) pueden acceder mis registros. Si esto ocurre se le pudiera proveer una copia de la información a ellos pero mi nombre será removido antes de soltar la información.

La sangre, la muestra de saliva, y las muestras de tejido recolectados durante este estudio serán identificadas solamente por medio de códigos. Mi nombre ni alguna información de identificación no serán utilizados en ninguno de los reportes.

Todos los estudios adicionales llevados a cabo utilizando mis muestras de sangre, saliva, y/o tejido serán revisadas cuidadosamente y aprobadas por el Comité de Protección de Participantes Humanos de la Universidad de Arizona. Si en cualquier momento decido que mi sangre o tejido no se almacenen para futura examinación, debo comunicarme con el Investigador Principal, Dra. María Elena Martínez, Ph.D. al (520) 626-8130 o al personal designado al (520) 626-9292 y pedir que mi sangre y/o tejidos ya no sean almacenados y entonces las muestras serán destruidas.

### **Costo de Participación y Compensación para el participante:**

No seré responsable por el costo de ninguna cita clínica o prueba de laboratorio relacionada a mi participación en este estudio. No se me compensará de forma financiera por mi participación en el estudio ni por viajar de y a la clínica. Podría recibir una Tarjeta de Regalo de Walmart con valor de \$20 dólares. También podría recibir una bolsa de lona con materiales y recursos de la organización "BAG IT". La organización BAG IT es una organización local sin fines de lucro cuya meta es ayudar a hacerles más fácil de obtener y disponible la información y los recursos a los pacientes y a las familias.

### **Responsabilidad:**

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE

BSC: 06-0856-02

---

Efectos secundarios o daños pueden ocurrir en cualquier programa de investigación a pesar de los altos estándares de cuidado médico, sin ser mi culpa o la del investigador involucrado. Efectos secundarios conocidos ya se describieron en este consentimiento. Sin embargo, algún daño pudiera ocurrir y que requiera cuidado. Firmando este consentimiento yo no renuncio a mis derechos legales. En el evento en el que se me cobre por un cuidado médico que yo piense este relacionado con la investigación, yo debo de comunicarme con el investigador principal (Dra. María Elena Martínez, Ph.D.) al (520) 626-8130. Si yo tengo alguna pregunta relacionada a mis derechos como individuo participando en la investigación, yo puedo comunicarme con la Oficina del Programa de Protección de Participantes Humanos al (520) 626-6721.

Yo puedo obtener mas información relacionada al estudio de investigación o expresar mis dudas o quejas llamando al investigador principal, Dra. María Elena Martínez, Ph.D. al (520) 626-8130. Si yo tengo preguntas relacionadas a mis derechos como participante, tengo preguntas en general, conciernes o quejas, o deseo dar aportación acerca de la investigación y no puedo comunicarme con el equipo de investigación o quisiera hablar con otra persona que no fuera del equipo de investigación puedo llamar al Programa de Protección de Participantes Humanos de la Universidad de Arizona al (520) 626-6721. Si me encuentro fuera del estado puedo llamar al teléfono de llamada gratuita (866) 278-1455., o si deseo comunicarme con el Programa de Protección de Participantes Humanos via web, yo puedo utilizar la siguiente dirección de web: <http://www.irb.arizona.edu/contact/>.

**CONSENTIMIENTO/AUTORIZACIÓN PARA TRATAMIENTO Y PARA PROCEDIMIENTOS OPCIONALES**

(Marque con una "X" la respuesta que escoga)

Yo elijo \_\_\_ o no \_\_\_ como procedimiento opcional que mis muestras de sangre o saliva sean almacenadas y utilizadas para una futura investigación de cáncer.

Iniciales del participante \_\_\_\_\_

Yo elijo \_\_\_ o no \_\_\_ como procedimiento opcional que mis muestras de tejido sean almacenadas y utilizadas en una futura investigación para aprender acerca de, prevenir o tratar otros problemas de salud

Iniciales del participante \_\_\_\_\_

XII

*Resúmenes del X Concurso de Trabajos Libres en Cartel*

# Congreso Internacional Avances *en* Medicina

*Guadalajara, Jalisco, México  
24-26 de Febrero de 2011*



### EFICACIA ANESTÉSICA PARA PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS EN RATAS WISTAR CON ANESTÉSICOS DISOCIATIVOS

#### AUTORES

Ramírez-Plascencia Lilia Esther, Velasco-Lozano Ezequiel, Aguirre-Espinosa Ana Cristina, Aceves-Cueva Patricia, Galván-Palomera Edelmira, Díaz-Esquivel Pedro, Camacho Domínguez David

#### INSTITUCIÓN

Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca", Guadalajara, México

**INTRODUCCIÓN.** La anestesia para modelos biológicos debe producir inconsciencia, analgesia y relajación muscular. En esta investigación se usó zolazepam (benzodiazepina), clorhidrato de tiletamina (anestésico disociativo) y xilazina (agonistas  $\alpha$ -2 adrenergicos).

**OBJETIVOS.** Describir una técnica anestésica eficaz para el manejo de ratas Wistar en investigación quirúrgica.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Se realizó un estudio experimental, en el Bioterio del CUCS. Se evaluó la técnica anestésica en ratas Wistar. Se premedicó con atropina a 0.05mg/kg. Se administró Zoletil® (zolazepam y clorhidrato de tiletamina) a 15mg/kg intraperitoneal y a los 5 minutos se administró xilazina a 13mg/kg intramuscular. Al terminar se administró ketorolaco a 1mg/kg intramuscular.

**RESULTADOS.** Se anestesiaron 50 ratas Wistar con peso promedio 287 g. Se realizaron 20 apendicetomías, 20 entero-entero-anastomosis y 10 laparotomías. El tiempo quirúrgico promedio fue 48 minutos. Se presentaron 3 complicaciones, una durante la inducción con muerte de la rata, una depresión respiratoria tras dosis adicional de anestésico y una muerte por hemorragia. Se requirió administrar dosis adicionales de Zoletil® en 9 ratas por prolongación del tiempo quirúrgico.

**CONCLUSIONES.** Solo se presentaron complicaciones anestésicas en un 4% de los casos. Con una mortalidad de 2% por el evento anestésico.

### NIVELES SÉRICOS DE OSTEOCALCINA EN POBLACIÓN SANA DEL OCCIDENTE DE MÉXICO

#### AUTORES

Nieto-Flores Jesus, Villafán-Bernal Jose Rafael, Franco-de la Torre Lorenzo, Hernández-Romero José Guadalupe, Llamas-Covarrubias Iris, Sánchez-Enriquez Sergio

#### INSTITUCIÓN

Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Universidad de Guadalajara

**INTRODUCCIÓN.** La osteocalcina es un marcador de formación ósea y modulador del metabolismo energético. Las concentraciones séricas de osteocalcina son diferentes entre poblaciones y en México se desconocen, es importante determinar sus valores de referencia.

**OBJETIVOS.** Cuantificar la concentración sérica de la osteocalcina en adultos sanos del occidente de México utilizando anticuerpos monoclonales.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Estudio descriptivo, donde se cuantificaron las concentraciones séricas de OCnc y OCc por ELISA en 100 individuos adultos clínicamente sanos del occidente de México. Se compararon las concentraciones de OCc con las encontradas en otras poblaciones y finalmente se correlacionaron las concentraciones séricas de la OCc con variables bioquímicas y antropométricas.

**RESULTADOS.** La media de la OCc fue de 7.40  $\pm$  5.11 ng/mL. Además del método, las variaciones en la OCc parecen deberse también a factores genéticos. La OCc se correlacionó negativamente con marcadores de adiposidad e inflamación.

**CONCLUSIONES.** Existe variación en las concentraciones séricas de osteocalcina entre poblaciones al parecer debidas a factores genéticos y al método de cuantificación. Además, la OCc se correlacionó negativamente con marcadores de adiposidad e inflamación.

### EXPRESIÓN DE Slc11a1 e iNOS EN PACIENTES CON LEpra LEPRMATOSA

Alvarado-Navarro Anaquel María, Hernández-Torres María del Guillén-Vargas Cecilia Magaña Patricia

#### INSTITUCIÓN

Departamento de Fisiología, CUCS, Universidad de Guadalajara Jalisco México, Dermatológico de Jalisco "Dr. José Barba Rubio", SSA Jalisco México

**INTRODUCCIÓN.** La lepra lepromatosa es una infección granulomatosa causada por *Mycobacterium leprae*. Slc11a1 e iNOS participan en la respuesta inmune contra las micobacterias, al limitar su crecimiento, sin embargo se desconoce esta patología.

**OBJETIVOS.** Analizar la expresión de Slc11a1, iNOS y macrófagos en pacientes con lepra lepromatosa.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Mediante inmunohistoquímica detectamos la expresión de Slc11a1 e iNOS en piel de tejidos incluidos en parafina de pacientes con lepra lepromatosa y sujetos clínicamente sanos.

**RESULTADOS.** Observamos un fuerte inmunomarcaje contra Slc11a1 e iNOS en lesiones de pacientes con lepra lepromatosa comparado con los controles. Aproximadamente en el 60% de las muestras de pacientes con lepra lepromatosa la intensidad del marcaje con Slc11a1 e iNOS fue muy alta. Además observamos abundantes gránulos de Slc11a1 e iNOS tanto intracitoplasmáticos como extracitoplasmáticos de las vacuolas en los macrófagos.

**CONCLUSIONES.** Nuestras observaciones sugieren que la infección por *M. leprae* mueve la coexpresión de Slc11a1 e iNOS y estas moléculas pueden estar involucradas en la defensa del hospedero en lepra, sin embargo la coexpresión de estas moléculas no parece ser suficiente para eliminar el parásito.

### ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES MTHFR C677T Y MTHFR A66G CON EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS

Tapia-Llanos Raziell, Gutiérrez-Rubio Susan, Quintero-Ramos Antonia Del Toro, Franco-Topete Ramón, Jiménez-Pérez Margarita González Castro-Cervantes Juan Daniel

#### INSTITUCIÓN

Laboratorio de Inmunología, CUCS-UDG; Laboratorio de Anatomía Patológica; Departamento de Epidemiología del Cáncer Nuevo Hospital Civil Centro Médico Occidente, IMSS, Guadalajara, México

**INTRODUCCIÓN.** En México, el cáncer de mama (CM) es la primera causa de muerte oncológica entre las mujeres. Factores genéticos pueden estar involucrados en la síntesis del ADN como la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR* C677T) y la metililato sintasa (TS 1494 del 6 pb).

**OBJETIVOS.** Determinar la asociación de los polimorfismos *MTHFR* C677T y *MTHFR* A66G con el desarrollo del cáncer de mama en mujeres pre y postmenopausadas del Estado de Jalisco.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Un total de 110 mujeres con diagnóstico histológico de cáncer de mama, captadas del CMNO-IMSS e IJC y 162 personas de la población control (PG). Todas firmaron su carta de consentimiento informado y se les extrajo el ADN. El ADN fue extraído por el método de Miller y se llevó a cabo la amplificación mediante PCR y PCR-RFLP y se realizó electroforesis en geles de agarosa con tinción con plata.

**RESULTADOS.** Las frecuencias para el genotipo CC, CT y TT en las mujeres postmenopausadas y PG fueron 32.5, 37.8 y 29.7; 46, 44.4 y 9.6% respectivamente. Se obtuvo una  $P=0.02$  al comparar el grupo de pacientes con el de PG.

**CONCLUSIONES.** El alelo *MTHFR* 677C fue asociado con CM, por lo que representa un riesgo para el desarrollo de CM en mujeres Mexicanas postmenopausadas.

