

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**“Modulación de la metilación de genes en células de
cáncer de mama por (-)-Epicatequina y (+)-Catequina de
Theobroma Cacao”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN FARMACOLOGÍA
PRESENTA:**

Q.F.B MELISSA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

DIRECTORES DE TESIS

DR. JOSÉ RUBÉN GARCÍA SÁNCHEZ

DRA. IVONNE MARÍA OLIVARES CORICHI

MÉXICO D.F

JUNIO 2011.



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 24 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ESM para examinar la tesis titulada:

“Modulación de la metilación de genes en células de cáncer de mama por (-)-Epicatequina y (+)-Catequina de *Theobroma Cacao*”

Presentada por el alumno:

Hernández
Apellido paterno

Martínez
Apellido materno

Melissa
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	7	9	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

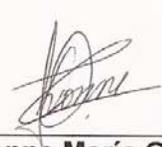
Maestría en Ciencias en Farmacología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

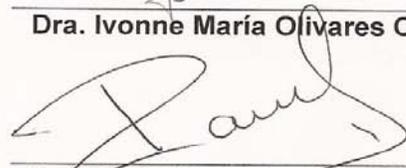
LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. José Rubén García Sánchez

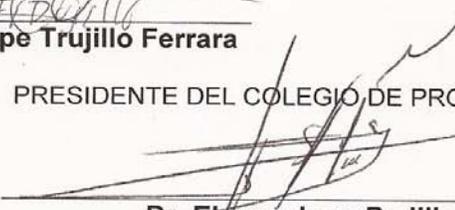

Dra. Ivonne María Olivares Corichi


Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo


Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

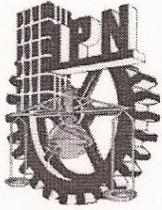

Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Etéazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 24 del mes de mayo del año 2011, el que suscribe **Melissa Hernández Martínez** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro B091790, adscrito a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. José Rubén García Sánchez** y de la **Dra. Ivonne María Olivares Corichi** cede los derechos del trabajo titulado: “**Modulación de la metilación de genes en células de cáncer de mama por (-)-Epicatequina y (+)-Catequina de *Theobroma Cacao***”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del tutor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección meily_zza@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MELISSA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

Nombre y firma

Esta tesis se realizó en él:

- Laboratorio de Bioquímica Inorgánica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

- Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTORES:

Dr. José Rubén García Sánchez

Dra. Ivonne María Olivares Corichi

MIEMBROS DEL COMITÉ:

Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo

Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

**Agradezco al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por el
apoyo otorgado en la realización de este proyecto**

Número de Becario: 231146

Y al PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACIÓN DE INVESTIGADORES

Clave del proyecto: 20100671 y 20110987

ÍNDICE

Relación de figuras	9
Relación de gráficas	11
Relación de tablas	11
Abreviaturas	12
Resumen	14
Abstrac	15
I. INTRODUCCIÓN	16
1. EPIGENÉTICA	16
1.1 Modificaciones Epigenéticas	17
1.2 Modificación de histonas	19
1.3 Metilación de ADN	19
1.3.1 DNA metiltransferasas (DNMTs)	21
1.3.1.a DNMT1	22
1.3.1.b TRDMT1	22
1.3.1.c DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L	23
1.4 Metilación del ADN y su relación con las enfermedades	24
1.4.1 Cambios epigenéticos en las células de cáncer	24
2. CÁNCER	25
2.1 El cáncer en el mundo	26
2.1.1 Incidencia de cáncer	26
2.1.2 Mortalidad de cáncer	26
2.2 Carcinogénesis	26
2.3 Tipos de cáncer	29
3. CÁNCER DE MAMA	29
3.1 Morbilidad y mortalidad mundiales	30
3.2 Morbilidad y mortalidad en México	30
3.3 Tipos de cáncer de mama	32
3.4 Etapas clínicas	33

3.4.1 Sistema TMN	34
3.5 Resistencia a múltiples fármacos	35
3.6 Genes supresores de tumor en cáncer de mama	36
3.6.1 DAPK1	37
3.7 Modelos experimentales de cáncer <i>in vitro</i>	37
3.7.1 MDA MB-231	38
3.7.2 MCF-7	38
3.7.3 BT- 474	38
3.8 Terapia contra el cáncer de mama	39
3.8.1 Terapia epigenética	40
3.8.2 Componentes bioactivos de la dieta en la terapia	42
del cáncer de mama	
4. POLIFENOLES	44
4.1 Estructura y clases de polifenoles	45
4.1.1 Flavonoides	45
4.1.2 Estructura básica de los flavonoides	46
4.1.2.a Subclases de Flavonoides	46
4.1.2.b Farmacocinética de los flavonoides	48
4.1.2.c Flavonoides y carcinogénesis	49
4.1.2.d +(-)Catequina y -(-)Epicatequina de	49
<i>Theobroma Cacao.</i>	
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
III. JUSTIFICACIÓN	52
IV. HIPOTESIS	54
V. OBJETIVOS	54
5.1 OBJETIVO GENERAL	54
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	54
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	54
6.1 Reactivos	54

6.2 Líneas celulares	55
6.3 Ensayos de viabilidad celular con diferente número de células	56
6.4 Ensayo de MTT	56
6.5 Determinación de la concentración inhibitoria 50(CI ₅₀) de +(-)Catequina y -(-)Epicatequina	57
6.6 Cinética de proliferación celular empleando +(-)Catequina , -(-)Epicatequina y la mezcla en las líneas MDA MB-231, MCF-7 y BT-474	57
6.7 Determinación de la especificidad de +(-)Catequina y -(-)Epicatequina en un cultivo primario de células endoteliales aisladas de arterias coronarias humanas (HCAEC)	57
6.8 Estudio de apoptosis con +(-)Catequina, -(-)Epicatequina y la mezcla en las líneas MDA MB-231, MCF-7 y BT-474	58
6.8.1 Extracción de ADN	59
6.8.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa al 2%	60
6.9 Determinación del estado de metilación del gen DAPK1 en la línea celular BT-474	61
6.9.1 Tratamiento de ADN con bisulfito de sodio (NaHSO ₃)	61
6.9.2 Análisis del ADN tratado con bisulfito por medio de MSP	62
6.9.3 Electroforesis de ADN tratado con bisulfito en geles de Acrilamida-Bisacrilamida al 10%	63
VII. RESULTADOS	63
7.1 Determinar si (+)-Catequina y (-)-Epicatequina inhiben la proliferación celular de las líneas MDA MB-231, MCF-7 y BT-474.	63

7.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina sobre la proliferación celular en las líneas celulares bajo estudio.	70
7.2.1 Efecto de la CI_{50} de (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la combinación de los flavonoides sobre la cinética de la proliferación celular de las líneas MDA MB-231 y MCF-7.	70
7.2.2 Efecto de la combinación de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina ($CI_{50}=350 \mu M$) sobre la proliferación de la línea BT-474	73
7.2.3 Efecto de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina sobre un Cultivo Primario de Células Endoteliales Aisladas de Arterias Coronarias (HCAEC).	74
7.3 Determinar si el mecanismo de inhibición de la proliferación celular por +(-)Catequina y -(-)Epicatequina involucra una inducción de apoptosis.	76
7.4 Demostrar sí (+)-Catequina y (-)-Epicatequina tienen la capacidad de revertir el estado de metilación del gen DAPK1 empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Especifica de Metilación (MSP).	78
VIII. DISCUSIÓN	80
IX. CONCLUSIONES	85
X. PERSPECTIVAS	86
XI. BIBLIOGRAFÍA	87

Relación de figuras

- Figura 1** Modificaciones epigenéticas que ocurren en genes supresores de tumor.
- Figura 2** Modificaciones a nivel de las histonas.
- Figura 3** Metilación en células normales y neoplásicas.
- Figura 4** S-adenosil-metionina; donador del grupo metilo (CH₃).
- Figura 5** Mantenimiento y metilación de *ново*.
- Figura 6** Miembros de la familia DNMT.
- Figura 7** Etapas en el desarrollo de un tumor.
- Figura 8** Capacidades adquiridas por el cáncer.
- Figura 9** Fisiología de la glándula mamaria.
- Figura 10** Incidencia proporcional (%) de los cánceres más frecuentes en México para el año 2008.
- Figura 11** Estimación de muertes provocadas por los 10 tipos de cáncer más comunes en México para el año 2008.
- Figura 12** Esquema de la glándula mamaria.
- Figura 13** Factores celulares que causan resistencia a fármacos.
- Figura 14** Estructuras químicas de las diferentes clases de polifenoles.
- Figura 15** Estructura básica de los flavonoides.
- Figura 16** Molécula de Catequina y Epicatequina
- Figura 17** Galería de diastereoisómeros de Catequina y Epicatequina.
- Figura 18** Efecto antiproliferativo de (-)-Epicatequina a diferentes concentraciones en diferente número de células de la línea MDA MB-231
- Figura 19** Efecto antiproliferativo de (+)-Catequina a diferentes concentraciones en diferente número de células de la línea MDA MB-231.
- Figura 20** Efecto antiproliferativo de (-)-Epicatequina a diferentes concentraciones en diferente número de células de la línea MCF-7.
- Figura 21** Efecto antiproliferativo de (+)-Catequina a diferentes concentraciones en diferente número de células de la línea MCF-7.
-
-

- Figura 22** Tratamiento de (-)-Epicatequina a diferentes concentraciones en diferente número de células de la línea BT-474.
- Figura 23** Tratamiento de (+)-Catequina a diferentes concentraciones en diferente número de células de la línea BT-474.
- Figura 24** Cinética de proliferación celular de la línea MDA MB 231.
- Figura 25** Cinética de proliferación celular de la línea MCF-7.
- Figura 26** Cinética de proliferación celular de la línea BT-474.
- Figura 27** Efecto de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina en un Cultivo Primario de Células Endoteliales Aisladas de Arterias Coronarias.
- Figura 28** Cinética de proliferación celular de la HCAEC.
- Figura 29** Electroforesis de agarosa al 2%. ADN de la línea MDA MB-231 después del tratamiento con la CI_{50} de (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y la mezcla de los flavonoides.
- Figura 30** Electroforesis de agarosa al 2%. ADN de la línea MCF-7 después del tratamiento con la CI_{50} de (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y la mezcla de los flavonoides.
- Figura 31** Electroforesis de agarosa al 2%. ADN de la línea BT-474 después del tratamiento con la CI_{50} de la mezcla de los flavonoides.
- Figura 32** Gel de acrilamida-bisacrilamida, donde se muestra el fragmento de 101 pb, correspondiente a DAPK1 metilado en el control. En el carril correspondiente al ADN tratado con la mezcla se pudo observar una banda muy intensa, correspondiente al gen no metilado (106 pb), indicativa de la desmetilación de este gen supresor de tumor en la línea BT-474 por la mezcla. M=Metilado. NM=No metilado.
-

Relación de gráficas

- Gráfica 1** Análisis de pendientes de (-)-Epicatequina y (-)+Catequina en 1×10^4 células MDA MB-231.
- Gráfica 2** Análisis de pendientes de (-)-Epicatequina y (-)+Catequina en 1×10^4 células MCF-7.
- Gráfica 3** Análisis de la CI_{50} de (-)-Epicatequina y (+)-Catequina en 1×10^4 células MDA MB-231.
- Gráfica 4** Área bajo la curva de la viabilidad celular de línea MDA MB-231 con (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y su combinación, comparada con el control.
- Gráfica 5** Área bajo la curva de la viabilidad celular de línea MCF-7 con (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y su combinación, comparada con el control.
- Gráfica 6** Área bajo la curva de la viabilidad celular de la línea BT-474 en presencia de la combinación (-)-Epicatequina y (+)-Catequina comparada con el control.
- Gráfica 7** Área bajo la curva de la viabilidad celular de línea HCAEC con (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y su combinación, comparada con el control.
-
-

Relación de tablas

- Tabla 1** Componentes bioactivos de la dieta, su origen, estructura molecular y sus blancos epigenéticos.
- Tabla 2** Subclases de flavonoides.
- Tabla 3** Par de primers para el gen DAPK1.
-
-

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASR	Tasa Estandarizada por Edad
ATTC	American Type Culture Collection
CpG	Citosina-Fosfato-Guanina
DAPK1	Proteína Quinasa 1 asociada a muerte
DCIS	Ductal carcinoma <i>in situ</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNMT	DNA metiltransferasas
EC	(-)-Epicatequina
ECG	(-)-Epicatequina Galato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGCG	(-)-Epigallocatequina-3-Galato
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
ERK	Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares
HCAEC	Células Endoteliales Aisladas de Arterias Coronarias
HDAC	Histona Deacetilasas
HMT	Histona Metiltransferasa
IARC	Centro Internacional de Investigación sobre el Cancer
KCl	Cloruro de potasio
LCIS	lobular carcinoma <i>in situ</i>
MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitogeno
MBP	Proteínas de Unión a Metilo
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MSP	PCR Especifica de la Metilación
MTT	Dimetil Tiazol Difeniltetrazolio Bromuro
NaCl	Cloruro de sodio

NaHSO₃	Bisulfito de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer Fosfato Salino
SAH	S-adenosil Homocisteina
SAM	S-adenosil Metionina
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SEER	Vigilancia Especifica y resultados finales
SFB	Suero Fetal Bovino
TAE	Tris-HCl-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TRDMT1	RNA ^t metiltransferasa 1 de ácido aspártico
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Estudios realizados en el campo de la epigenética muestran que componentes bioactivos presentes en la dieta tienen un gran potencial en la prevención y en el tratamiento del cáncer. Actualmente, Epicatequingalato (ECG), Epigallocatequina (EGC) y Epigallocatequina 3-galato (EGCG), han recibido atención debido a sus propiedades anti cancerígenas, no así, (+)-Catequina y (-)-Epicatequina los monómeros más abundantes y de mayor concentración plasmáticas después de una ingesta de flavonoides. Si bien, las evidencias muestran el papel quimiopreventivo de los flavonoides, los mecanismos bioquímicos involucrados son poco conocidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si los monómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina presentan una capacidad anti cancerígena, mediada por una modulación en la metilación de genes implicados en la carcinogénesis. Los resultados mostraron que los enantiómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina inhiben la proliferación celular de las líneas celulares MDA MB-231 y MCF-7, no así en la línea BT-474. El análisis de pendientes de las curvas dosis respuestas de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina indicó una eficacia similar para ambos flavonoides; de hecho, la CI_{50} fue similar para ambos compuestos ($350\mu\text{M}$). Estos resultados indicaron que los enantiómeros presentan la misma capacidad para inhibir la proliferación celular. Interesantemente, el análisis del Área bajo la curva de la proliferación celular en presencia de estos flavonoides mostró que la combinación de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina genera un mayor efecto inhibitorio, de hecho, en la línea BT-474 el efecto inhibitorio fue observado solo cuando la mezcla fue utilizada. Estos resultados sugieren la posible existencia de un efecto aditivo entre ambos flavonoides. Por otro lado, los estudios de PCR Específica de la Metilación del gen DAPK1 en la línea BT-474 mostró que los flavonoides modifican su estado de metilación, induciendo una desmetilación de su región promotora, resultado que concuerda con la inducción de apoptosis generada por estos enantiómeros. En conclusión los enantiómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina inhiben la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama, a través de una inducción de apoptosis y la cual fue asociado con una demetilación genética y posible reactivación de genes supresores de tumor.

ABSTRAC

Studies in the field of epigenetics show that bioactive components in the diet have a great potential in the prevention and treatment of cancer. Currently, Epicatequingalato (ECG), Epigallocatechin (EGC) and Epigallocatechin 3-gallate (EGCG), have received attention because of its anti-cancer properties, but not, (+)-Catechin and (-)-Epicatechin monomers and more abundant higher plasma concentration after intake of flavonoids. While evidence shows chemopreventive role of flavonoids, the biochemical mechanisms involved are poorly understood. The aim of this study was to evaluate if the monomers (+)-Catechin and (-)-Epicatechin have anti carcinogenic capacity, mediated by a modulation in the methylation of genes involved in carcinogenesis. The results showed that the enantiomers (+)-Catechin and (-)-Epicatechin inhibit cell proliferation of the cell lines MDA MB-231 and MCF-7, but not in BT-474 line. Analysis of slopes of the dose-response curve of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin showed a similar efficacy for both flavonoids in fact, the IC_{50} was similar for both compounds (350 μ M). These results indicated that the enantiomers have the same ability to inhibit cell proliferation. Interestingly, analysis of the area under the curve of cell proliferation in the presence of these flavonoids showed that the combination of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin generates a greater inhibitory effect, in fact, in line with the BT-474 inhibitory effect was observed only when the mixture was used. These results suggest the possible existence of an additive effect between the two flavonoids. On the other hand, studies of the Methylation Specific PCR gene DAPK1 line BT-474 showed that flavonoids alter their methylation status, inducing demethylation of its promoter region, a finding consistent with the induction of apoptosis generated by these enantiomers. In conclusion, the enantiomers (+)-Catechin and (-)-Epicatechin inhibit the proliferation of cell lines of breast cancer through induction of apoptosis and which was associated with a possible genetic demethylation suppressor gene reactivation tumor.

I. INTRODUCCIÓN

1. EPIGENÉTICA

A diferencia de la genética, que estudia las variaciones en la secuencia, la epigenética es comúnmente definida como cambios heredables y reversibles en la expresión diferencial de los genes, que no involucran cambios en la secuencia de ADN (Baylin y col. 2008, Loss y col. 2010).

Durante el desarrollo de organismos multicelulares, las células y tejidos adquieren diferentes programas de expresión génica, el cual se cree que es sustancialmente regulado por las modificaciones epigenéticas, así, cada tipo de célula en nuestro cuerpo tiene su propia firma epigenética que refleja el fenotipo de la célula y el organismo (Morgan y cols.2005). Los mecanismos epigenéticos regulan todos los procesos biológicos, desde la concepción hasta la muerte, incluyendo la reprogramación del genoma durante el inicio de la embriogénesis, la gametogénesis, la diferenciación celular y el establecimiento del fenotipo (Genevieve y cols.2009). La secuencia primaria del ADN se fija generalmente en la concepción, sin embargo en situaciones normales o de desarrollo de enfermedades, algunas células sufren importantes reprogramaciones epigenéticas, debido a que son dinámicas y modificables, probablemente durante toda la vida, lo que implica la eliminación de dichas firmas, seguido del establecimiento de un conjunto diferente de marcas epigenéticas (Foley y cols.2009, Morgan y cols. 2005).

El término “epigenética” fue utilizado por primera vez por el biólogo Conrad Hal Waddington en 1942. Uno de los mejores ejemplos de los cambios epigenéticos en la biología de los eucariontes, es la diferencia de etapas de desarrollo del huevo fecundado, al cigoto hasta culminar en un organismo plenamente desarrollado (Hinshelwood y cols. 2008).

Las modificaciones epigenéticas están mediadas por mecanismos moleculares que comprenden varias modificaciones tales como la metilación del ADN, acetilación/des acetilación y metilación de las histonas, así como la participación

de los complejos de remodelación SWI/SNF y ncRNAs (Non-coding RNAs); estos sistemas tienden a interactuar y estabilizarse entre sí ^(Van y cols.2007).

1.1 Modificaciones Epigenéticas

El control del inicio de la transcripción en células de mamíferos está estrechamente relacionado con el control de la accesibilidad del ADN, cambios en la alteración de la estructura de la cromatina y las modificaciones postranscripcionales de las histonas, así como las modificaciones post replicación del ADN juegan un papel importante ^(Esteller.2008).

La estructura de la cromatina está constituida por unidades básicas, denominadas nucleosomas, que consisten de ~146 pares de bases de ADN envuelto alrededor de un octámero de cuatro proteínas conocidas como Histonas H3, H4, H2A Y H2B.

Los mecanismos epigenéticos que modifican la estructura de la cromatina se dividen en dos categorías, los mecanismos covalentes; los cuales incluyen la metilación del ADN y las modificaciones de histonas. Los mecanismos no covalentes son aquellos donde la estructura de la cromatina cambia por la incorporación de variantes de histonas, una remodelación del nucleosoma y la participación de los RNAs no codificantes (miRNAs) ^(Balch y cols.2007).

Estas modificaciones trabajan en conjunto para regular el funcionamiento del genoma mediante la alteración de la estructura de la cromatina, principalmente, regulando su accesibilidad y compactación. La interacción de estas modificaciones crea un panorama epigenético que regula la forma en que el genoma de los mamíferos se expresa en diferentes tipos celulares y las etapas del desarrollo.

Los distintos patrones de estas modificaciones presentes en diferentes estados celulares sirven como guardianes de la identidad celular ^(Shikhar Sharma.2009).

De las modificaciones epigenéticas, que más conocimiento se tiene, se encuentran las que ocurren a nivel del ADN (metilación del ADN) y a nivel de la cromatina (remodelación de la cromatina), que en su conjunto definen la estructura de la cromatina y la actividad transcripcional de un gen.

La metilación del ADN es un cambio químico que ocurre generalmente en dinucleótidos CpG (Citosina-Fosfato-Guanina). Mientras que la remodelación de la cromatina se produce por la modificación de residuos de histonas, principalmente en la región N-terminal, afectando la interacción del ADN con la cromatina.

Tanto la metilación del ADN, como la modificación de histonas son dos eventos asociados con el silenciamiento de genes. Eventos que se han relacionado con el desarrollo de enfermedades como es el cáncer. En la figura 1 muestran las modificaciones epigenéticas que ocurren comúnmente en células normales y su alteración en enfermedades como el cáncer (Loss y cols.2010).

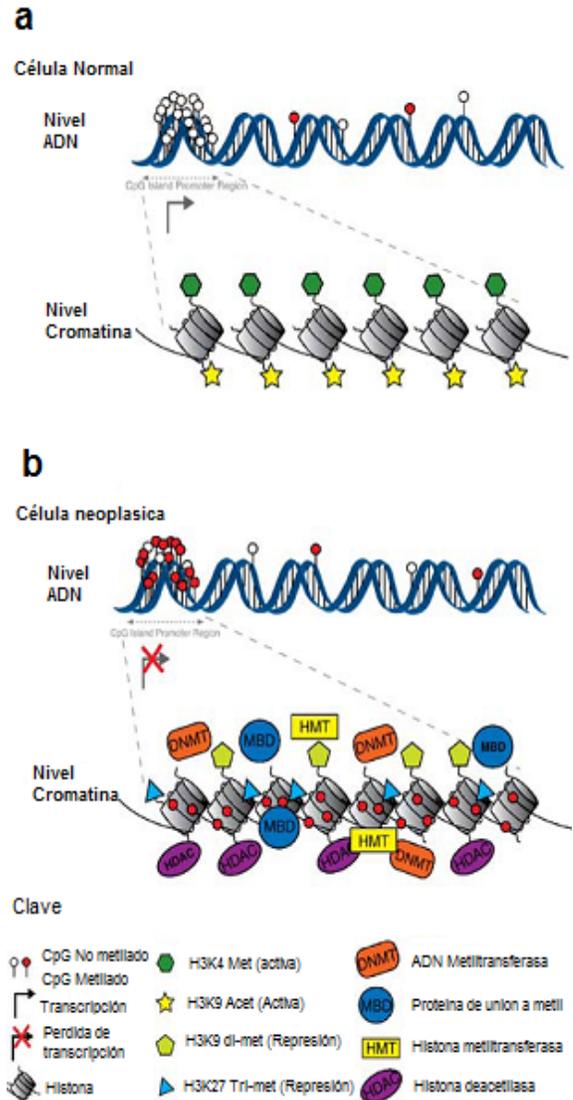


Figura 1. Modificaciones epigenéticas que ocurren en genes supresores de tumor, durante la transición de una célula normal, a una célula neoplásica. a) La célula normal se caracteriza por la desmetilación de genes supresores de tumor en la región promotora y se asocian con la metilación activa de la Histona 3 lisina 4 (H3K4) y la acetilación de la histona 3 lisina 9. b) en la célula neoplásica, los genes supresores de tumor son silenciados por una metilación aberrante del ADN en la región promotora, lo que provoca una incorporación aberrante de HMT's, HDAC's y proteínas de unión a metilo, entre otras.

1.2 Modificación de histonas

Todas las histonas están sujetas a modificaciones post-transcripcionales. Varias de estas modificaciones ocurren en las colas de las histonas: acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinización, entre otras. Las modificaciones de histonas, tienen un importante rol en la regulación transcripcional, reparación y replicación del ADN, el splicing alternativo y la condensación del cromosoma.

En relación al estado transcripcional, el genoma humano se puede dividir en eucromatina y heterocromatina. La eucromatina se caracteriza por altos niveles de acetilación y la metilación de las histonas H3K4, H3K36 y H3K79 predominantemente. Por otro lado la heterocromatina se caracteriza por bajos niveles de acetilación y altos niveles de metilación de las histonas H3K9, H3K27 y H4K20 (Figura 2). Estudios recientes han demostrado que los niveles de modificaciones en las histonas son predictivos en la expresión del gen.

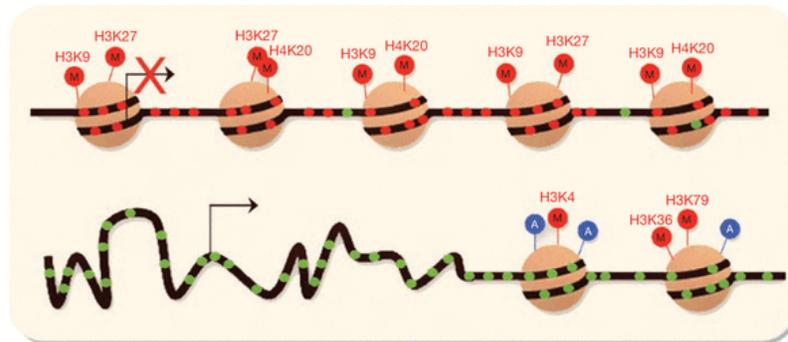


Figura 2. Modificaciones a nivel de las histonas. Juegan un papel importante en la regulación transcripcional. Los promotores activos poseen una región libre de nucleosomas en la región 5', lo que proporciona un espacio para el acoplamiento de la maquinaria de transcripción. Mientras que la obstrucción de esta región conduce a la represión. La metilación se asocia con la compactación de la cromatina, impidiendo la transcripción del gen. Por el contrario, el ADN no metilado se asocia con la relajación de la cromatina, que permite la transcripción.

1.3 Metilación de ADN

Las modificaciones epigenéticas tales como la metilación del ADN son algunas de las alteraciones moleculares más comunes en neoplasias humanas.

En los genomas de vertebrados, la metilación del ADN se produce en residuos de citosina del ADN en dinucleótidos CpG. A diferencia de los cambios genéticos, esta modificación epigenética es potencialmente reversible. Cerca del 6.3 % de citosinas son metiladas en los mamíferos y aproximadamente del 70 al 80% de los sitios CpG en el genoma se encuentran metilados (Cheng y Riggs.2011).

La metilación del ADN se refiere a la adición de un grupo metilo en la posición 5 del anillo de la citosina que precede a una guanina (denominados dinucleótidos CpG) para formar 5-metilcitosina, este proceso enzimático esta mediado por una familia de ADN metiltransferasas. Los dinucleótidos CpG se encuentran en mayor frecuencia en la región promotora de muchos genes (Gehring y col.2009). Estos CpGs se conocen como "islas CpG", que miden aproximadamente de 0.5 a 3 Kb, presentándose en promedio cada 100 Kb en el genoma y se encuentran en aproximadamente la mitad de todos los genes en los seres humanos. La metilación de estas islas en la región promotora es importante en la represión de la expresión génica, el mantenimiento en la integridad del ADN y en la estabilidad de muchos procesos biológicos, tales como la impronta genómica, el desarrollo normal y la proliferación. Varios genes supresores de tumor contienen islas CpG en sus promotores y muchos de ellos muestran evidencia de ser silenciados por metilación (Figura 3).

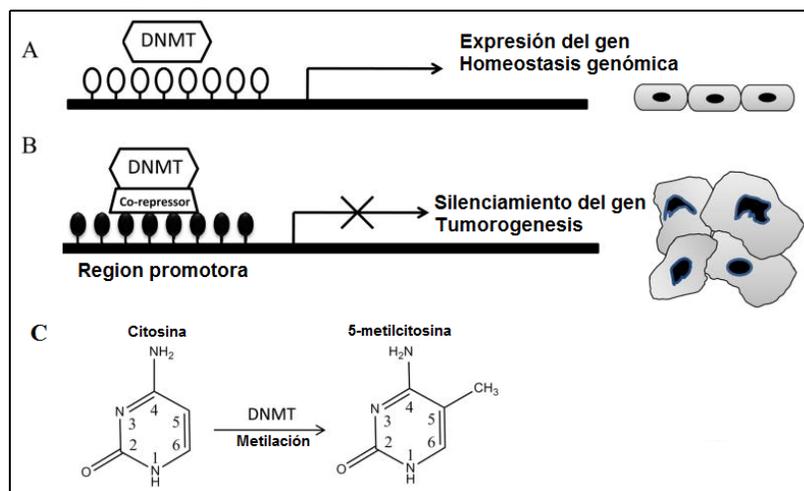


Figura 3. Metilación en células normales y neoplásicas. A, metilación en células normales. Promotor hipometilado es relacionado con la expresión del gen. B, metilación de ADN en células de cáncer. C, la

aberrante hipermetilación del ADN en la región promotora conduce al silenciamiento y tumorigénesis. La metilación del ADN, es un proceso catalizado por ADN metiltransferasas, que añade un grupo metilo a la posición 5 de la citosina de dinucleótidos CpG. Círculos blancos, representan sitios CpG no metilados, los círculos negros, sitios hipermetilados CpG.

La hipermetilación de islas CpG en la región promotora lleva al silenciamiento de la expresión génica, ya sea por inhibición directa de factores de transcripción o mediante la atracción de proteínas de unión al ADN metilado, la atracción de otros represores de la transcripción como histonas acetilasas (HDACs) y de histonas metiltransferasas, dando como resultado cromatina transcripcionalmente inactiva (Jones.2007)

1.3.1 DNA metiltransferasas (DNMTs)

La metilación del ADN esta mediada por una familia de enzimas, denominadas ADN Metiltransferasas (DNMTs) que catalizan la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) al ADN, dando como producto 5-metilcitosina y la formación de S-adenosil Homosisteina (SAH) (Figura 4). En mamíferos, cinco miembros de la familia de las DNMTs han sido reportados: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L. Siendo, la DNMT1 el miembro más conocido y estudiado (Yi Chuan.2009)

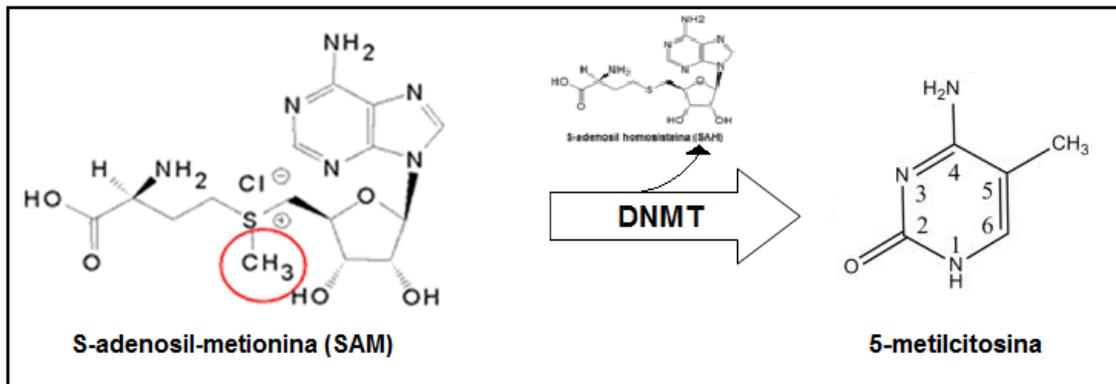


Figura 4. S-adenosil-metionina; donador del grupo metilo (CH₃). SAM es el sustrato de las DNMTs para la adición del grupo metilo al ADN.

Los miembros de esta familia se clasifican en DNMTs de novo (DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L) y DNMTs de mantenimiento (DNMT1).

La familia DNMT3 establece el patrón inicial de metilación de novo, mientras que la DNMT1 mantienen este patrón durante la replicación y las reparaciones, presentando una preferencia de 30 a 40 veces por sitios hemimetilados. (Figura 5).

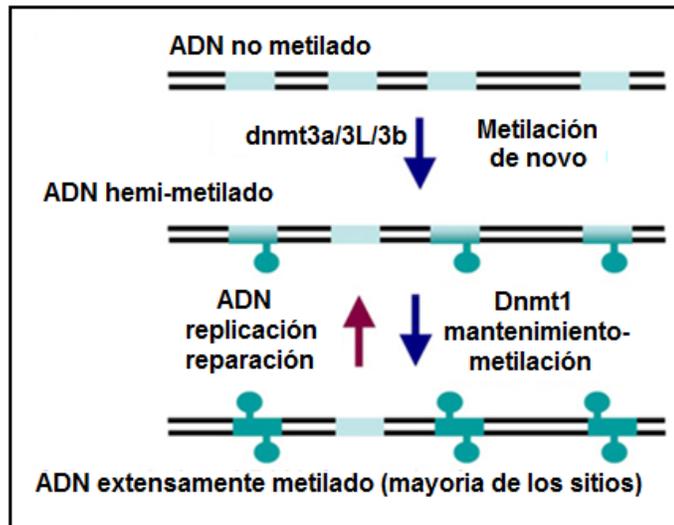


Figura 5. Mantenimiento y metilación de novo. Los segmentos de color azul pálido son secuencias de sustrato (generalmente CpG) y las formas de color turquesa, representan grupos metilo en las citosinas. Después de la replicación o la reparación, el dúplex está metilado en una línea única.

1.3.1.a DNMT1

Se considera la responsable en el mantenimiento de los patrones de metilación durante la replicación del ADN, sin embargo estudios recientes sugieren que la DNMT1 por sí sola, no puede garantizar el mantenimiento adecuado de estos patrones y requiere la cooperación de las enzimas DNMT3a y DNMT3b (Shikhar.2010).

El gen para la DNMT1 está localizado en el cromosoma 19p13.2 y codifica una proteína de 183 kDa. La DNMT1 cuenta con un dominio N-terminal con grandes funciones de regulación y un pequeño dominio catalítico C-terminal de 500 aminoácidos. Estudios han demostrado que la sobreexpresión de DNMT1 en células madre embrionarias da lugar a la letalidad del embrión, sugiriendo que la expresión exacta de DNMT1 es un factor clave para mantener el desarrollo embrionario (Kirpekar.2006).

1.3.1.b TRDMT1

Antes conocida como DNMT2, a pesar de que esta enzima tiene una gran similitud de secuencia y estructura con metiltransferasas de ADN, tanto de procariontes como de eucariontes, en 2006, se demostró que es la responsable de metilar ácido aspártico en la posición 38 del ARN de transferencia ^(Rai y cols.2007), por lo que su nombre fue cambiado a TRDMT1 (RNAt metiltransferasa 1 de ácido aspártico), siendo la primera enzima metiltransferasa de ARN en ser identificada en humanos ^(Goll y cols.2006).

1.2.1.c DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L

La familia DNMT3 establece el patrón de metilación inicial de novo e incluye 2 enzimas con actividad metiltransferasa; DNMT3a y DNMT3b y un factor regulatorio, DNMT3-Like (DNMT3L).

DNMT3a y DNMT3b, ambas contienen una región variable en el extremo N-terminal, seguido de un dominio, que se ha denominado PWWP, que puede estar implicado con la unión no específica al ADN, un dominio rico en cisteína (Cys), unido a zinc (Zn) y un dominio catalítico C-terminal. ^(Qiu y cols.2002, Lukasik y cols.2006).

La secuencia de aminoácidos de DNMT3L es muy similar a la de DNMT3a y DNMT3b en el dominio Cys-Zn pero carece de los residuos conservados en el dominio C-terminal, necesarios para poder ejercer la actividad de metiltransferasa (Figura 6) ^(Cheng y Blumental.2008).

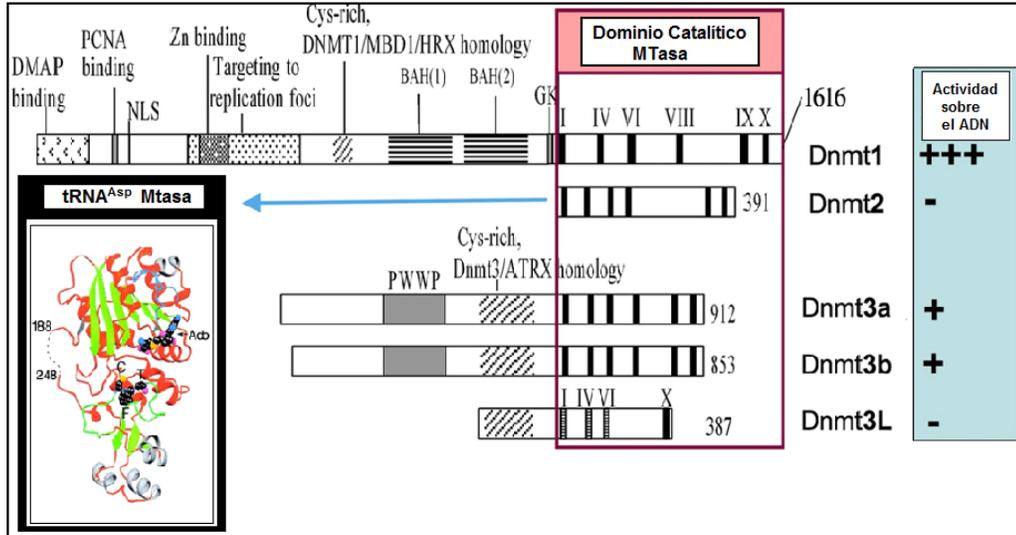


Figura 6. Miembros de la familia DNMT. Representación esquemática de DNMT1 y DNMT3. DNMT2 metilador de RNA^{Asp}. Los números romanos se refieren a los sitios conservados de las ADN metiltransferasas (Cheng y Blumental.2008)

1.4 Metilación del ADN y su relación con las enfermedades

La importancia de establecer y mantener los patrones de metilación del ADN, se pone de manifiesto debido al creciente número de enfermedades humanas asociadas al descontrol en los patrones de metilación del ADN (Robertson, 2005). Las alteraciones en los componentes de la maquinaria de metilación, es la base de varios síndromes hereditarios; como la inmunodeficiencia, inestabilidad del centrómero, síndrome de Rett y anomalías faciales, otro grupo de enfermedades congénitas como el síndrome de Angelmann y los síndromes de Padrer-Willi.

La aberrante metilación del ADN también se ha asociado con enfermedades comunes como son las cardiovasculares, autoinmunes y neurológicas. Por otra parte, parece representar un componente del envejecimiento humano que puede predisponer a un individuo a una mayor morbilidad a edades avanzadas. Las causas de la metilación aberrante y su contribución a la fisiopatología de la enfermedad, es uno de los campos más estudiados en el cáncer (Wolfgang.2009).

La inactivación epigenética de genes por la metilación del promotor ha sido reconocida como un importante mecanismo por el cual los genes supresores de tumor se inactivan durante el desarrollo y la progresión del tumor ^(Hegi.2009).

1.4.1 Cambios epigenéticos en las células de cáncer

Los mecanismos epigenéticos son esenciales para el desarrollo normal y el mantenimiento de los patrones de expresión de genes específicos en los mamíferos. La desregulación de estos procesos epigenéticos puede conducir a la inactivación del gen y la transformación de una célula normal a una célula tumoral ^(Esteller.2008). Inicialmente el cáncer se pensaba que era solo una consecuencia de cambios genéticos en los principales genes supresores de tumor y los oncogenes, sin embargo, el estudio de los mecanismos epigenéticos durante la última década, ha proporcionado una amplia información sobre los mecanismos que contribuyen al fenotipo neoplásico a través de la regulación de la expresión de genes críticos para las vías de transformación ^(Berdasco.2010).

La metilación de las bases de citosina en el ADN es una modificación epigenética fundamental del genoma, que está implicada en la regulación de diversos procesos celulares, estos incluyen; el desarrollo embrionario, la transcripción, la estructura de la cromatina, la inactivación del cromosoma X ^(Yen,2007), la impronta genómica ^(Hore,2007) y la estabilidad cromosómica. De acuerdo con esto, un número creciente de enfermedades humanas como el cáncer se han asociado con la metilación aberrante del ADN ^(Watanabe,2010). Los patrones anormales de metilación del ADN conducen a la inestabilidad génica y el desarrollo del cáncer. Entre los genes alterados detectados en cáncer, tenemos aquellos encargados del control del ciclo celular ($p21^{WAF1/CIP1}$ y $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p14^{ARF}$), reparación de ADN (hMLH1, MGMT), genes reguladores del crecimiento (*RASSF1A*), apoptosis (DAPK1), adherencia celular (CDH1, CDH13), detoxificación (GSTP1), etc.

2. CÁNCER

La organización celular de los tejidos posee una gran complejidad, existiendo un control muy estricto respecto a la proliferación y especialización de cada tipo celular. La habilidad de proliferar para participar en la morfogénesis de los tejidos adultos de un organismo, hace posible el mantenimiento de estos, pero al mismo tiempo, puede representar un grave peligro para el organismo, debido a que las células pueden adquirir esta capacidad en el momento que no les corresponde^(Weinberg,2007). Este es el caso del cáncer; enfermedad con diferente etiología, pronóstico, tratamiento y caracterizado por el descontrolado crecimiento celular, que invade y daña tejidos, causando así la muerte del organismo^(Stresemann y col. 2006). Actualmente numerosas investigaciones demuestran que el cáncer es una enfermedad desarrollada en múltiples pasos y que está asociada con cambios dinámicos en el genoma. De acuerdo con esto, las alteraciones de tipo genético y epigenético confieren una ventaja para el desarrollo de la enfermedad permitiendo que las células normales sean transformadas con un genotipo maligno con capacidad invasiva^(Loudon, 2010).

2.1 El cáncer en el mundo

La Organización Mundial de la Salud (OMS), calcula que de no mediar intervención alguna, 84 millones de personas, morirán de cáncer entre 2005 y 2015. En el año 2005, 5.8 millones de hombres y 5 millones de mujeres alrededor del mundo, sufrieron un tumor maligno. En el año 2007, 7.9 millones murieron por esa causa. Si continúa el mismo estilo de vida poco saludable, se espera que el número de nuevos casos, aumente en un 50% en los próximos 20 años, alcanzando los 15 millones en el año 2020 y a 27 millones de personas para el año 2030.

2.1.1 Incidencia de cáncer

En el año 2008, se diagnosticaron en el mundo 12.7 millones de nuevos casos de cáncer. A nivel mundial, el cáncer más frecuente es el de pulmón, seguido por el

cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer de próstata, hígado, cervico uterino y esófago. Pero hay grandes diferencias entre ambos sexos y el índice de desarrollo del país analizado (Frieden y col. 2011).

2.1.2 Mortalidad de cáncer

El cáncer es la principal causa de mortalidad a escala mundial. Se le atribuyen 7.6 millones, aproximadamente el 13 % de defunciones ocurridas en todo el mundo en el año 2008 (Globocan 2008, IARC 2010).

El cáncer es considerado actualmente el asesino más importante en el mundo, superando a las enfermedades cardiovasculares y a las infecciones (Frieden y col. 2011).

2.2 Carcinogénesis

El proceso tumoral está constituido por múltiples etapas donde cada una de ellas refleja las alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de las células normales a sus derivados celulares cada vez más malignos. Todo este conjunto es necesario para romper los múltiples sistemas de control que regulan la proliferación y homeostasis celular (Figura 7).

El desarrollo de un tumor comienza cuando una o varias células normales adquieren la capacidad de proliferar de una forma relativamente autónoma mediante alguna alteración genética en proto-oncogenes, genes supresores de tumores o en genes encargados de la reparación del ADN. A este crecimiento excesivo se le conoce como *hiperplasia*. A lo largo del tiempo, algunas células de su progenie presentan alteraciones caracterizadas por una variación en su tamaño forma y organización, dando como resultado un cáncer *in situ*, tumor benigno o *neoplasia*. Si los cambios genéticos facilitan la invasión por parte del tumor del tejido circundante y la entrada de las células en el torrente sanguíneo y/o linfático, hablamos entonces de un tumor maligno o *cáncer invasivo*. Las células invasoras pueden iniciar nuevos tumores en otras partes del cuerpo (*metástasis*) que pueden ser letales si afectan algún órgano vital (Vogelstein y col. 2003).

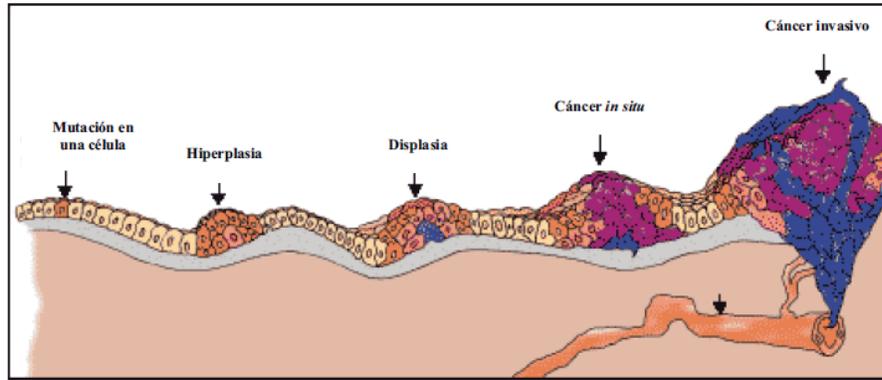


Figura 7. Etapas en el desarrollo de un tumor. (Vogelstein B. Kinzler KW. 1993).

Se han postulado varias normas generales que rigen el proceso de transformación de la célula normal a la célula tumoral. Según Hanahan y Weinberg el cáncer se origina al alterarse los mecanismos celulares esenciales para la regulación de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Hanahan D y Weinberg RA, 2000). Las nuevas capacidades adquiridas por las células cancerosas son la autosuficiencia para proliferar independientemente de señales de crecimiento, la insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, la capacidad de invadir tejidos y metastatizar, la insensibilidad a la muerte celular por apoptosis, un potencial replicativo ilimitado y la habilidad de provocar el proceso de angiogénesis (Figura 8).

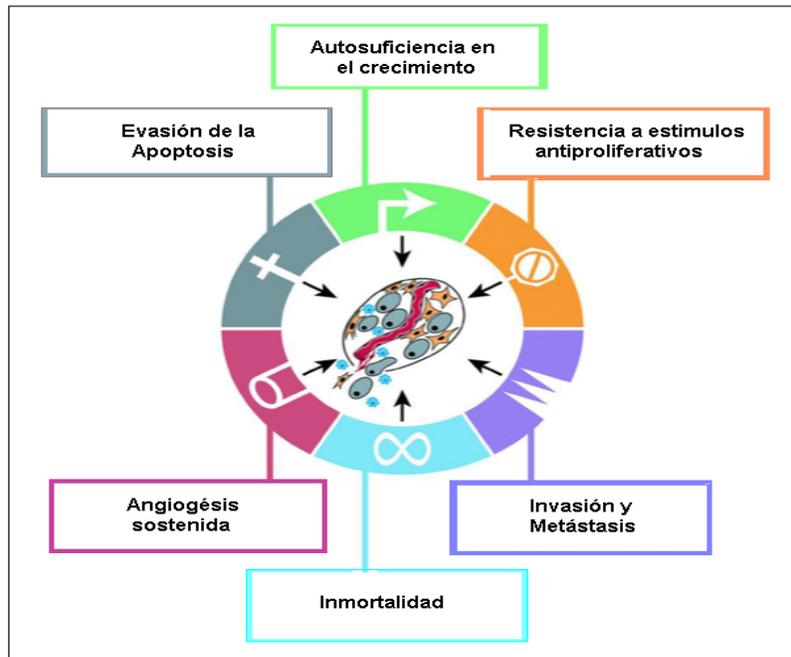


Figura 8. Capacidades adquiridas por el cáncer (Modificado de Hanahan D y Weinberg RA, 2000).

2.3 Tipos de cáncer

Existe un gran número de cánceres dependiendo del tejido donde se haya originado. Según los estándares internacionales para la clasificación y nomenclatura de tumores malignos según su histología, los cánceres se pueden agrupar en cinco grandes categorías ^(Fritz. 2000).

- **Carcinoma.** Neoplasia maligna de origen epitelial. Representa el 80-90% de todos los casos de cáncer diagnosticados.
- **Sarcoma.** Tumor derivado del tejido conectivo y de sostén como huesos, tendones, cartílago, músculo y tejido adiposo.
- **Mieloma.** Cáncer originado en las células plasmáticas de la médula ósea.
- **Leucemia.** Cáncer de la médula ósea.
- **Linfoma.** Tumor desarrollado en las glándulas o nódulos del sistema linfático.

3. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad maligna en donde la proliferación acelerada, desordenada y no controlada de las células pertenecientes a distintos tejidos de la glándula mamaria forman un tumor que invaden los tejidos vecinos y metastatiza a órganos distantes del cuerpo. Estadísticas en países donde el cáncer de mama se detecta principalmente por mamografías de escrutinio indican que del 15 al 30% de las neoplasias malignas de mama corresponden a carcinomas in situ, y el resto a carcinomas infiltrantes ^(Cotran R.2002).

Aproximadamente el 80% de los carcinomas infiltrantes son ductales, y el resto, lobulillares (Figura 9). Los carcinomas ductales infiltrantes pueden ser de un tipo tubular/cribiforme, coloides, medulares y papilares.

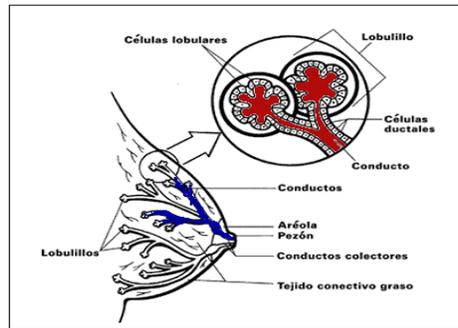


Figura 9. Fisiología de la glándula mamaria, donde se muestran sus partes y se muestran en color rojo, los lobulillos y en azul los conductos.

Una célula cancerosa de mama generalmente se duplica cada 100-300 días. Una neoplasia de mama de 1 cm realiza cerca de 30 duplicaciones antes de alcanzar este tamaño, por lo que este cáncer tiene, como mínimo, unos 7 años de evolución ^(Kopans.2002).

3.1 Morbilidad y mortalidad mundiales

De acuerdo con las últimas estimaciones estadísticas de la International Agency of Research on Cancer: GLOBOCAN 2008, el carcinoma de mama es la neoplasia sólida más frecuente entre la población femenina a nivel mundial, registrándose más de 1,384,155 nuevos casos al año, lo que corresponde a una tasa ajustada por edad (ASR, por las siglas de Age Standardized Rate) de 39.0 por 100,000 mujeres.

En cuanto a la mortalidad, el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo. Según las estadísticas mencionadas, en 2008, se registraron 458,503 muertes por cáncer de mama en el mundo, lo que corresponde a un tasa de mortalidad de ASR de 12.5 por 100 000 habitantes ^(Ferlay. 2010).

Es la segunda causa de muerte por neoplasia en EE.UU, después del carcinoma broncogénico y en México a partir del 2006 ocupa el primer lugar, seguido por el Cáncer Cervicouterino ^(INEGI.2008).

El riesgo de padecer cáncer de mama durante la vida es de 12.2%, según los datos obtenidos por el programa Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) del National Center Institute, lo que se traduce en la cifra frecuentemente citada de 1 de cada 8 mujeres.

La probabilidad de morir por cáncer de mama es mucho menor. Se reduce a 1 de cada 28 mujeres (3.6%). En general, alrededor del 60% de las mujeres que han padecido cáncer de mama se consideran curadas, mientras que un tercio morirán por complicaciones derivadas de la diseminación metastásica (World Health Organization.2006)

3.2 Morbilidad y mortalidad en México

La información epidemiológica nacional más actualizada referente a morbilidad y mortalidad por cáncer de mama son las estadísticas proporcionadas por la International Agency for Research on Cancer (IARC) la cual forma parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las estadísticas de incidencia para el año 2008 indican que el cáncer de mama ocupa el primer lugar con un 21% correspondiendo a 13,939 casos, seguido por el cáncer cervico uterino con un 15% (Figura 10).

Las estadísticas de mortalidad, indican que en 2008 ocurrieron unos 39, 361 fallecimientos en México a causa de un tipo de cáncer, de los cuales el 13% corresponden a cáncer de mama (Figura 11).

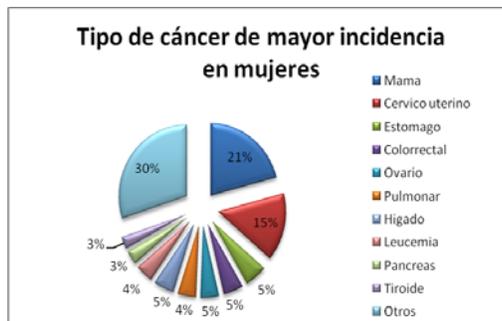


Figura 10. Incidencia proporcional (%) de los canceres mas frecuentes en México para el año 2008.

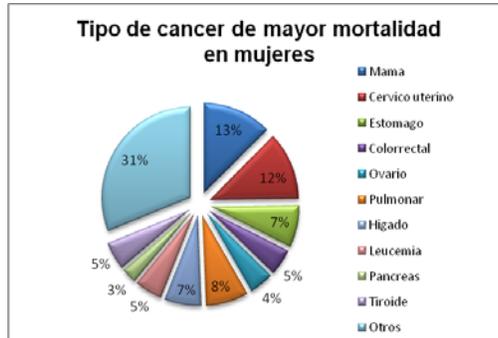


Figura 11. Estimación de muertes provocadas por los 10 tipos de cáncer más comunes en México para el año 2008.

El cáncer de mama ocupa el primer lugar entre las causas de muerte por cáncer en mujeres, seguido por el cáncer cérvico uterino, sin embargo las tendencias de estas patologías son muy diferentes. Las cifras brutas de defunciones por cáncer cérvico uterino muestran desde el año 2000 una tendencia decreciente consistente, mientras que las del cáncer de mama aumentan cada año (INEGI, 2005).

Para entender este tipo de cáncer es necesario comprender cómo está estructurada la glándula mamaria. Las principales partes de la glándula son los lobulillos (glándulas productoras de leche), los conductos (tubos lácteos que conectan los lobulillos y el pezón) y el estroma (tejido adiposo y los ligamentos que rodean los conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos) (Figura 12).

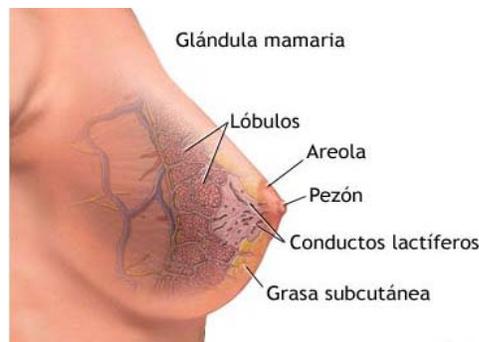


Figura 12. Esquema de la glándula mamaria.

3.3 Tipos de cáncer de mama

La clasificación de los tipos de cáncer de mama se basa en el lugar donde se originó, el grado de invasividad y en la apariencia de las células cancerosas bajo el microscopio.

Existen dos tipos principales de cáncer de mama:

- El carcinoma ductal, que comienza en los conductos que llevan leche desde la mama hasta el pezón. El 80 % de los cánceres de mama son de este tipo.
- El carcinoma lobulillar comienza en partes de las mamas llamadas lobulillos que producen leche. Es el cáncer que con mayor frecuencia ataca a los dos senos.

El cáncer de mama puede ser invasivo o no invasivo. El cáncer no invasivo se denomina *in situ*.

- Carcinoma ductal *in situ* (DCIS, de ductal carcinoma *in situ*) o carcinoma intraductal es un cáncer de mama en los revestimientos galactóforos que todavía no han invadido tejidos cercanos. Sin tratamiento, puede progresar a cáncer invasivo.
- Carcinoma lobulillar *in situ* (LCIS, de lobular carcinoma *in situ*) se origina en los lobulillos y no se propaga en el tejido adiposo circundante ^(Carlson y Allred.2009).

3.4 Etapas clínicas

El diagnóstico y tratamiento es individualizado y dependerá de la etapa clínica, esta se determina dependiendo del tamaño tumoral, la presencia o ausencia de metástasis ganglionares y/o a distancia (sistema de clasificación TMN). Estas etapas, de manera didáctica, se dividen en enfermedad temprana, localmente avanzada y metastásica. Es imprescindible diagnosticarlo en ausencia de síntomas cuando su tamaño no sea mayor a los 2 cm., ya que de esta forma se puede curar hasta el ~ 90 % de las mujeres.

3.4.1 Sistema TMN

El sistema TNM es una estrategia para agrupar a las pacientes con respecto a su pronóstico. Además, se pueden formular decisiones terapéuticas, en parte de acuerdo a su categoría, respecto a su clasificación linfonodal, condición menopáusica y estado general de la paciente.

Tumor primario (T)

Tx: No determinado.

T0: Sin evidencia de Tumor primario (no palpable).

Tis: Carcinoma *in situ*.

Tis (DCIS) Carcinoma ductal *in situ*.

Tis (LCIS) Carcinoma lobulillar *in situ*.

Tis (Paget) Enfermedad de Paget del pezón no asociada a masa tumoral.

T 1: Tumor menor de 2 cm en su diámetro mayor.

T 2: Tumor > 2 cm, pero no > 5 cm en su diámetro mayor.

T 3: Tumor > 5 cm en su diámetro mayor.

T 4: Tumor de cualquier tamaño.

Compromiso linfonodos regionales (N)

Nx: no evaluados.

N0: ausencia de adenopatías palpables.

N1: metástasis axilares homolaterales móviles palpables.

N2: metástasis axilares homolaterales fijas o metástasis en mamaria interna homolaterales detectables por estudios de imágenes (menos linfocintigrafía) o detectables por examen clínico, en ausencia de evidencia clínica de metástasis en linfonodos axilares.

N3: metástasis en linfonodos intraclaviculares homolaterales o metástasis en linfonodos de mamaria interna homolaterales detectables por estudios de

imágenes o examen clínico y la presencia de evidencia clínica de metástasis en linfonodos axilares; o metástasis en linfonodos supraclaviculares homolaterales, con o sin compromiso de linfonodos axilares o de mamaria interna.

Metástasis a distancia (M)

Mx: no evaluadas.

M0: sin metástasis demostrables.

M1: metástasis presentes (incluso adenopatías supraclaviculares).

3.5 Resistencia a múltiples fármacos

La quimioterapia es un importante componente en el tratamiento del cáncer de mama, su efecto suele ser muy variable de un paciente a otro debido a la heterogeneidad genética de los tumores ^(Gong,2010). Además, unos de los mayores impedimentos para el éxito de dicho tratamiento es el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos, el cual suelen desarrollar las células de un tumor tras la exposición reiterada a uno o varios fármacos ^(Li,2008). Existen dos clases generales de resistencia a drogas anticancerosas: aquellos mecanismos que impiden la entrada del fármaco al interior de la célula y los que disminuyen la sensibilidad de la propia droga debido a alteraciones genéticas y epigenéticas ^(Gottesman y cols.2002) (Figura 13).

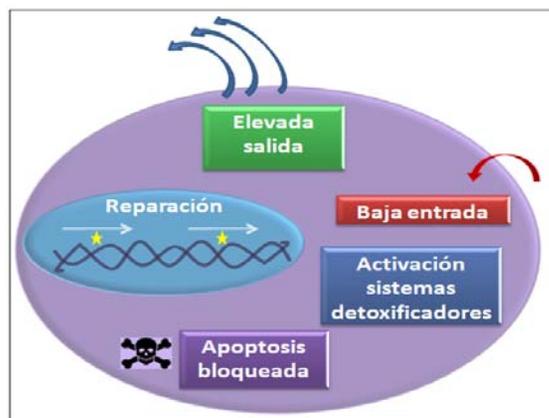


Figura 13. Factores celulares que causan resistencia a fármacos (Modificado de Gottesman y cols. 2002).

Dentro de los mecanismos principales implicados en la resistencia de las células cancerosas a los medicamentos se encuentran los cambios celulares por alteraciones epigenéticas (Egger.2004).

Varios estudios han demostrado que dentro de las alteraciones epigenéticas involucradas en la resistencia a múltiples fármacos, se encuentra la metilación aberrante de la región promotora de islas CpG (Vasyl.2007).

Probablemente dentro de los genes más importantes, implicados en la resistencia a los medicamentos y que son transcripcionalmente regulados a través de la metilación, se encuentran los transportistas de fármacos (*ABCB1, DNAJC15, GSTP1, RAB6C*), sin embargo, no solo los transportistas de fármacos, sino también, los genes implicados en la reparación del daño al ADN (*BRCA1*), los genes encargados de la inducción de apoptosis (*DAPK1*) y los implicados en la proliferación de células tumorales e invasión (*APC, CDH1, ESR1HIC, RASSF1*), desempeñan un papel crucial en el desarrollo de resistencia a los medicamentos (Michael.2010). Tal es el caso de los genes supresores de tumor, los cuales se encargan de reducir la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena.

3.6 Genes supresores de tumor en cáncer de mama

En las células normales, las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores, detienen la progresión del ciclo celular en respuesta a un daño al ADN o a señales de supresión de crecimiento proveniente del medio extracelular. Cuando los genes supresores de tumores están inactivos por alteraciones genéticas y/o epigenéticas, las células no pueden responder normalmente a los puntos de control del ciclo celular o son incapaces de realizar la muerte celular programada si el daño al ADN es demasiado grave. Esto conduce a un incremento de las alteraciones y a la incapacidad de la célula de su propio control (Ostrow y cols.2009).

La hipermetilación por lo tanto es un mecanismo asociado con la inactivación de genes supresores de tumores. Dentro de los genes supresores de tumor, que

muestran hipermetilación en el cáncer de mama, pero que no se encuentran metilados en las células normales, se encuentran el gen de Adenomatosis Poliposis Coli, mejor conocido como APC y la proteína quinasa 1 asociada a muerte (DAPK1), entre otros (Esseii.2004).

La detección de hipermetilación de ambos genes supresores de tumor en el cáncer de mama ha sido ampliamente reportada (Bartek y cols.2007 y Esteller. 2001).

3.6.1 DAPK1

Proteína quinasa 1 asociada a muerte (DAPK1), es un mediador positivo de serina-treonina quinasa, cuya expresión es necesaria para la apoptosis inducida por el interferon gamma. DAPK1 codifica una proteína de 160 kD conocida como calmodulina dependiente de serina-treonina quinasa (Reddy.2003).

DAPK1 es un gen pro-apoptótico que potencialmente inhibe la metástasis mediante el aumento de la incidencia de la apoptosis, este gen considerado como supresor de tumor se ha visto inactivado por la metilación aberrante de la región promotora en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama (Inas.2010). Una gran variedad de estudios han demostrado que la metilación del promotor, disminuye considerablemente el nivel de expresión del ARNm de DAPK1 y puede ser una de las razones para la conversión de células normales en células malignas, debido a la frecuencia de metilación en la fase temprana de tumores de mama, DAPK1 se ha considerado como un posible marcador de pronóstico para la progresión y el desarrollo de esta neoplasia (Xu.2009).

3.7 Modelos experimentales de cáncer *in vitro*

Los estudios *in vitro* en cultivos celulares son herramientas valiosas para la detección de agentes quimiopreventivos y proporcionan datos preliminares para estudios *in vivo*. Este tipo de estudio tiene hoy un gran interés científico, debido a que se pueden realizar investigaciones sobre el ciclo celular y el control del crecimiento de células tumorales (Morgan y Darling.2005).

El cultivo de células tiene el objetivo de mantenerlas, fuera de su organismo de origen, para estudiar su comportamiento sin el control normal ejercido por el organismo vivo y poder estudiarlas bajo un ambiente experimental y controlable (Freshney.2000)

En nuestro estudio hemos utilizado líneas establecidas de tumores primarios o metástasis de pacientes de cáncer de mama. A continuación se detallan las características propias de cada una de ellas.

3.7.1 MDA MB-231

Prototipo utilizado para el estudio de células hormono-independientes. Células adherentes, con morfología epitelial. Aisladas de paciente femenina, caucásica de 51 años de edad, diagnosticada con adenocarcinoma lobulillar. Expresan el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor transformante de crecimiento alfa (TGF α) (ATCC Advanced Catalog Search)

3.7.2 MCF-7

La línea MCF tiene su origen a las iniciales de la institución *Michigan Cancer Foundation*. Cuando se ha interesado en estudiar células cancerosas hormono dependientes la línea celular MCF-7 ha sido la más utilizada. Células adherentes con morfología epitelial, con tiempo estimado de división de 29 horas. Aisladas de paciente femenina, caucásica de 69 años de edad, diagnosticada con adenocarcinoma Lobulillar (ATCC Advanced Catalog Search)

3.7.3 BT- 474

Células aisladas de carcinoma ductal invasivo que expresan el receptor HER-2, Receptor a Progesterona (RP) positivo y Receptor a Estrógenos (RE) negativo. Células adherentes con morfología epitelial, aisladas de paciente femenina, caucásica de 60 años de edad (ATCC Advanced Catalog Search)

3.8 Terapia contra el cáncer de mama

La detección temprana junto con la aplicación de algún tratamiento contra el cáncer reduce significativamente el riesgo de muerte a causa de esta enfermedad. Los tratamientos más comúnmente utilizados contra el cáncer de mama son ^(Ades y cols.2005).

- **Cirugía**. La mayoría de las mujeres con cáncer de mama serán sometidas a cirugía. En la tumorectomía se extirpa solo la masa tumoral, pero dependiendo del tamaño y la localización del tumor se podría realizar una mastectomía, es decir la extirpación de la mama por completo.
- **Radioterapia**. La radiación se usa para destruir las células cancerosas que puedan quedar en la mama, en la pared torácica o en los ganglios linfáticos después de la cirugía.
- **Tratamiento sistémico**. Se usa para combatir células cancerosas que podrían haberse propagado más allá de la mama y los tejidos circundantes. Para ello se administran medicamentos en forma oral o por vía intravenosa. Dependiendo del medicamento que se use tenemos la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia hormonal.

En **quimioterapia** se usan agentes citotóxicos para eliminar las células cancerosas, tratando de minimizar la toxicidad en las células sanas del organismo. Estas sustancias poseen diferentes mecanismos de acción pero los más frecuentes pertenecen a una de estas categorías: agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, agentes diferenciadores, enzimas, hormonas, alcaloides de plantas o inhibidores de topoisomerasas ^(Pitot y cols.2002).

En la **terapia antihormonal** se usan medicamentos para bloquear el efecto del estrógeno, hormona que hace que algunos cánceres de mama crezcan.

En la **terapia con anticuerpos monoclonales** se usan para bloquear receptores de membrana de las células cancerosas y así inhibir la proliferación de

estas. Uno de los medicamentos más utilizados en el cáncer de mama es el trastuzumab (Herceptin) que es un anticuerpo administrado via I.V, dirigido directamente contra el receptor HER-2/neu/erbB2 (Yeong y cols.2005).

Por otra parte, la mayor fuente de nuevos productos químicos con actividades biológicas interesantes para aplicaciones médicas, ha sido la naturaleza, en el área de la oncología, desde los años 40, de las 155 moléculas aprobadas para el tratamiento del cáncer, el 73% de ellas no son sintéticas y de estas el 47% son productos naturales o compuestos directamente derivados de ellos (Newman y Cragg, 2007).

3.8.1 Terapia epigenética

El silenciamiento epigenético presente en cáncer debido a una hipermetilación del promotor sensibiliza a los tumores a una terapia epigenética. Un número significativo de genes supresores de tumor son transcripcionalmente silenciados por la hipermetilación del promotor. Investigaciones recientes implican a las alteraciones en la estructura de la cromatina como la base de esta represión, por lo que existe un interés agudo en la modulación de la metilación del ADN para el tratamiento del cáncer humano.

Una distinción importante entre la metilación del ADN y las mutaciones o deleciones, es que la inactivación epigenética es altamente reversible y puede ser alterada por pequeñas moléculas, incluyendo metiltransferasas de ADN e inhibidores de la histona deacetilasa. Además, se han desarrollado estrategias que combinan tratamientos con fármacos que reactiven la expresión de genes silenciados con agentes secundarios. En la actualidad, los fármacos capaces de reactivar la expresión de genes diana por medio de enzimas de ADN metiltransferasas, se encuentran la 5-aza-2'-citidina (5-aza-CR) y 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CDR), siendo los primeros inhibidores específicos descritos para las DNMTs. Estos 2 compuestos inhiben la DNMT1, formando un aducto covalente a través de la formación de un enlace tioester en el C-6. Por el momento, no hay informes acerca de la actividad de estos compuestos contra la

DNMT3a y DNMT3b, pero teniendo en cuenta la conservación de los mecanismos de metilación del ADN, es probable que sean afectados de forma similar (Kulis y Esteller.2010).

La interacción covalente entre 5-aza-citosina y las fuerzas de replicación de DNMT1 provocan la ausencia de la metilación del ADN, ocasionando una hipometilación y por lo tanto, la pérdida de la metilación de los promotores de genes supresores de tumores. 5-aza-CR y 5-aza-CDR han demostrado ser valiosos para los estudios básicos de la metilación del ADN y el silenciamiento transcripcional (Kaminskas y cols.2005).

Más recientemente se han descrito otros inhibidores, los cuales han resultado de gran interés, debido a que no presentan la elevada toxicidad como los mencionados anteriormente, incluido la formación de aductos altamente tóxicos y la falta de selectividad para las enzimas de ADN metiltransferasas.

El primero de estos inhibidores, son oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el ARNm de DNMT1. El tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, conduce a la pérdida de proteínas de DNMT1 y con ello a la desmetilación del promotor de genes supresores de tumor.

El segundo inhibidor, consta de una estructura de oligonucleótidos, que tiene como sustrato la horquilla de DNMT1, sin embargo, por razones que aun no están claras, estos inhibidores no han sido capaces de inducir cambios en los patrones de metilación del ADN y por lo tanto, activar genes silenciados en las células tratadas.

Un reciente desarrollo de las estrategias, que afectan la reactivación del gen, es el descubrimiento de que el tratamiento de las células cancerosas con 5-aza-CDR y el inhibidor de histonas deacetilasas (HDAC) con Tricostatin A (TSA), presentan un sinergismo y reactivan el silenciamiento de genes supresores. Esta observación proporciona un campo alentador en el mecanismo de silenciamiento dirigido a la metilación de ADN (Karp y Jones, 2007).

Estas observaciones de la reactivación del gen, por el sinergismo del tratamiento celular del ADN con metiltransferasas e inhibidores de histonas deacetilasas indican que las dianas moleculares interactúan. De hecho, ahora se ha demostrado que las DNMTs y HDACs, pueden interactuar, ya sea directa o indirectamente. Estos datos sugieren que las altas dosis de 5-aza-CDR utilizadas en los ensayos clínicos podrían reducirse si se utiliza en combinación con los inhibidores de HDAC. Una estrategia de tratamiento de combinación como esta, podría reducir los efectos secundarios asociados con la inhibición de la metilación del ADN, sin dejar de lograr un nivel elevado de la reactivación del gen. Sin embargo, a pesar de ser parte de los fármacos más comúnmente utilizados, no hay que dejar de mencionar que producen resultados significativos en menos de la mitad de los pacientes ^(Gronbaek y col. 2007). Esto nos lleva a concluir, que en el tratamiento del cáncer el paciente está expuesto a fármacos altamente tóxicos y sufre efectos secundarios mientras reciben pocos beneficios terapéuticos. Por otra parte los componentes bioactivos de la dieta, han recibido una amplia atención en el uso contra varios tipos de cáncer, con nula toxicidad y alta eficacia.

Numerosos estudios muestran que los componentes bioactivos de la dieta poseen un gran potencial sobre la metilación aberrante, por medio de la modificación de los niveles de DNMTs.

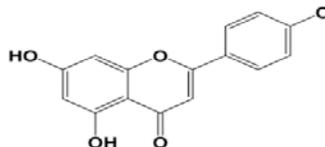
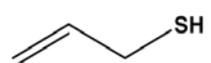
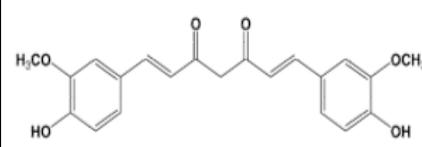
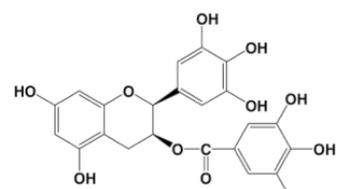
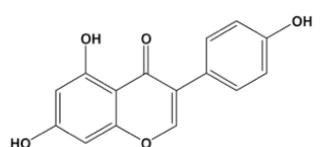
3.8.2 Componentes bioactivos de la dieta en la terapia del cáncer de mama

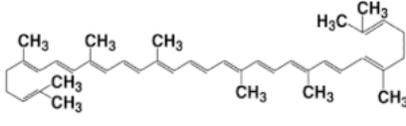
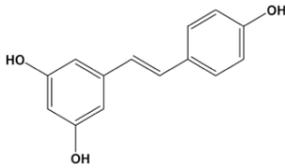
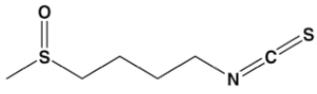
Los agentes naturales de la dieta, incluyendo frutas, verduras y especias han venido mostrando un gran potencial en la prevención y el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer.

Los agentes de la dieta consisten en una gran variedad de compuestos bioactivos que se encuentran en altas concentraciones en plantas, muchas de las cuales se han venido utilizando desde la medicina antigua tradicional. Cabe mencionar, que los agentes de la dieta no son solo una excelente fuente de fibra, vitaminas y minerales, sino también contienen componentes bioactivos como los polifenoles,

alcaloides y compuestos fenólicos. En los últimos años estudios epidemiológicos y meta-análisis han demostrado que los componentes bioactivos de los fitoquímicos tienen un gran potencial en la prevención del cáncer, mediante la modificación de alteraciones epigénéticas, dentro de los cuales podemos encontrar a los polifenoles, la genisteína, el resveratrol, licopeno, ácido rosmarínico, apigenina y la curcumina, entre otros (ver tabla 1).

TABLA 1. Componentes bioactivos de la dieta, su origen, estructura molecular y sus blancos epigenéticos.

Componente	Estructura	Efecto epigenético en el cáncer
Apigenina (Perejil) (<i>M Petroselinu</i>)		Inhibidor de DNMT (Fang y col.2007)
Alil mercaptano (Ajo) (<i>Allium sativum</i>)		Inhibidor de HDAC (Lea y col. 2001 ; Druesne y col.2004)
Curcumina (Turmeric) (<i>Curcuma longa</i>)		Inhibidor de DNMT (Liu y col. 2009; Fang y col. 2007 ; Fu y Kurzrock .2010) Inhibidor de HDAC y HAT (Chen y col. 2007 ; Liu y col.2005 ; Kang y col. 2006 ; Cui y col. 2007 ; Balasubramanyam y col. 2004)
Epigallocatequina-3-galato (EGCG) (té verde) (<i>Camellia sinensis</i>)		Inhibidor de DNMT (Fang y col. 2003 ; Kato y col. 2008 ; Pandey y col. 2010 ; Lee y col.2005) Inhibidor de HAT (Choi y col. 2009) HAT inhibidor (Choi y col.2009)
Genisteína (soja) (<i>Glycine max</i>)		Inhibidor de DNMT (Majid y col. 2008 ; Kikuno y col. 2008 ; Fang y col. 2005 ; Li y col.2009) Inhibidor de HDAC y activador de HAT (Fang y col.2005 ; Li y col. 2009)

<p>Licopeno (tomate) (<i>M Copersicu Solanum</i>)</p>		<p>Desmetilantes de RARβ, GSTP1 y HIN en células de cáncer de mama (MDA-MB-231 y MCF10A) (King-Batoon y col.2008) (Rey-Batoon y col. 2008)</p>
<p>Resveratrol (uva roja) (<i>Vitis vinífera</i>)</p>		<p>Inhibidor de DNMT (Papoutsis y col. 2010 ; Stefanska y col. 2010) Activador de SIRT1 (Kaerberlein y col.2008 ; Wang y col.2008 ; Boily y col.2009)</p>
<p>Sulforafano (verduras crucíferas) (<i>Brassicaceae</i>)</p>		<p>Inhibidor de DNMT (Meeran y col.2010 ; Traka y col.2005) Inhibidor de HDAC (Myzak y col.2007 ; Dashwood and Ho 2007 ; Ho y col.2009 ; Myzak y col.2004)</p>

Muchos de estos componentes han mostrado resultados prometedores en la inhibición directa o indirecta de la actividad de DNMTs. Tal es el caso de (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), el principal polifenol del té verde, el cual está siendo ampliamente estudiado, por sus capacidades para inhibir al complejo DNMT y reducir la metilación en células de cáncer de mama, contribuyendo así a la prevención del cáncer, a través los mecanismos epigenéticos (Fang y col.2003; Mittal y col.2003; Tsao y col.2009)

4. POLIFENOLES

Los polifenoles son compuestos naturales que se encuentran principalmente en las frutas, verduras, cereales y bebidas. Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y por lo general participan en la defensa antioxidante contra la radiación ultravioleta y la agresión por agentes patógenos. En los alimentos, contribuyen a la amargura, astringencia, color, sabor, olor y estabilidad a la oxidación. En la última década, el interés por los beneficios potenciales que otorga el consumo de polifenoles ha ido en aumento. Los estudios epidemiológicos sugieren que el consumo a largo plazo de dietas ricas en polifenoles, ofrecen protección contra el desarrollo de enfermedades

cardiovasculares, diabetes, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer.

4.1 Estructura y clases de polifenoles

Más de 8.000 compuestos fenólicos se han identificado en diversas especies de plantas. Todos los compuestos fenólicos surgen de un intermediario en común; la fenilalanina, o bien de su precursor; el ácido siquímico. Los polifenoles se pueden clasificar en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que se unen a estos anillos. Las clases principales incluyen los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides (Figura 14). Siendo estos últimos aquellos que representan aproximadamente un tercio de los compuestos polifenólicos en nuestra dieta.

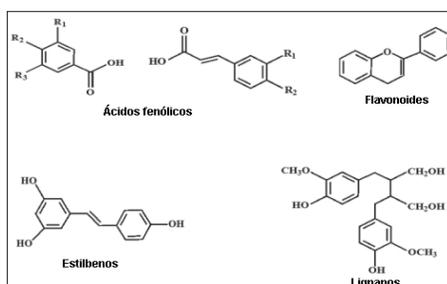


Figura 14. Estructuras químicas de las diferentes clases de polifenoles

4.1.1 Flavonoides

Los flavonoides representan el grupo más estudiado de los polifenoles y se refiere a un grupo aromático de compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno, están ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Por ende, se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas y cerezas, además de ser parte del árbol *Ginkgo Biloba*, *Camelia Sinensis* y *Theobroma Cacao* (Keen,2001).

La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Después, estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; siendo que al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides.

Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Lippi, 2010).

4.1.2 Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los anillos del B desde el 2' al 6' (Figura 15).

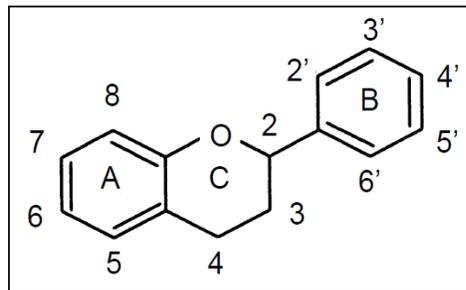
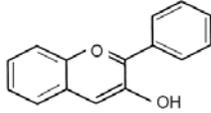
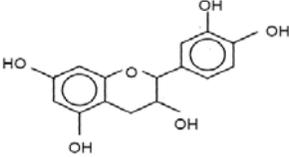
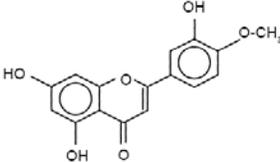
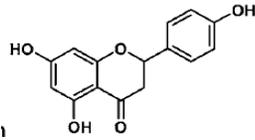
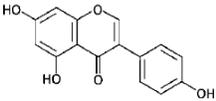
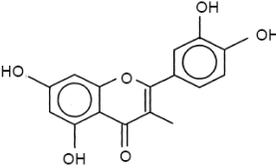


Figura 15. Estructura básica de los flavonoides

4.1.2.a Subclases de Flavonoides

Hasta el momento más de 5000 flavonoides diferentes se han descrito. Las seis principales subclases se incluyen en la tabla 2:

TABLA 2. Subclases de flavonoides.

Nombre	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Antocianidina	
Flavanoles	Catequina	
Flavonas	Diosmetina	
Flavanones	Naringenina	
Isoflavonas	Genisteina	
Flavonoles	Quercetina	

La mayoría de los flavonoides presentes en las plantas se unen a azúcares (glucósidos), aunque en ocasiones se encuentran como agliconas.

El interés en los posibles beneficios de los flavonoides se ha incrementado debido a su potente capacidad antioxidante y a su efecto protector en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer. Por otra parte hay una creciente

evidencia a base de estudios sobre la alimentación humana de que la absorción y biodisponibilidad de los flavonoides es mucho mayor de lo que se creía (Pandey, 2009).

4.1.2.b Farmacocinética de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos que no son lipofílicos y la presencia de los grupos fenólicos tanto los conjugados sulfatados como los glicosilados, facilitan la eliminación. Antes de ser absorbido un flavonoide es escindido, dando como resultado, por una parte su aglicona y por otra su glicósido; teniendo este último mayor solubilidad en agua y absorbiéndose rápidamente, sin embargo la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida. Por lo que en promedio las concentraciones pico de los flavonoides se da a las 1.75 horas. Consiguen una distribución homogénea en todos los tejidos corporales, incluso logran atravesar la barrera hematoencefálica; permitiendo mayor paso, por supuesto, a los flavonoides más lipofílicos (como la naranjina) y su transportación con los receptores. Los flavonoides sufren metabolismo de primer paso y sus metabolitos son excretados por la bilis y aunque se reabsorben ya no tienen funcionalidad (Ross, 2002, Abrahamse, 2005).

Es intensa la transformación de los flavonoides, llevándose a cabo en dos sitios: primero en hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I, en las que se adicionan o exponen grupos polares; y posteriormente en colon, mediante la fase II de la biotransformación, en donde la microbiota intestinal degrada los flavonoides no absorbidos y son conjugados con glicina, ácido glucurónico y sulfatados (Youdim, 2004).

La excreción se lleva a cabo después de que se forman estos conjugados y por dos salidas. Los no solubles en agua se excretan junto con la bilis al duodeno, y los solubles a las vías urinarias con la orina, siendo esta última la salida predominante. Pero al final lo que importa es la ruta por la cual se metabolizaron; pues si un flavonoide sólo es glucuronidado se excretará por vía renal (como la catequina), pero si es metilado y sulfatado será excretado por la vía hepática (como la quercetina) (Abrahamse, 2005).

4.1.2.c Flavonoides y carcinogénesis

La actividad biológica de los flavonoides es dependiente de la estructura química y los estudios epidemiológicos apoyan su papel en la prevención del cáncer humano.

La disminución en los niveles de incidencia de cáncer de colon, hígado, próstata y de mama en la población asiática, se ha correlacionado con la ingesta rica en verduras, frutas y te, lo que plantea la cuestión de que los flavonoides median los efectos quimiopreventivos de estos alimentos.

Una gran variedad de información sobre la acción antitumoral de los flavonoides ha demostrado su capacidad de activar genes silenciados por alteraciones epigenéticas y su efecto en el bloqueo de la angiogénesis, carcinogénesis, metástasis y proliferación de células tumorales (Syed y cols.2010 Pandey.2010).

Innumerables estudios *in vitro* han demostrado que los flavonoides aumentan significativamente la expresión de la proteína p53, E-Cadherina y β -catenina, la activación de caspasa 3, Fas ligando y el receptor Fas/APO-1, que están fuertemente asociados con la vía de transducción de señales implicados en la apoptosis, adhesión celular que afectan la quimiosensibilidad de las células tumorales (Po-Lin.2003 y Hsu.2010).

Recientemente, uno de los mecanismos potenciales que ha recibido considerable atención, es que los flavonoides pueden modular la expresión génica por influir en los procesos epigenéticos, tales como la metilación del ADN y la modificación de las histonas (Berletch y cols.2008, Fang y cols.2003). Los estudios han demostrado que estos compuestos pueden alterar los patrones de metilación del ADN en diferentes líneas celulares provenientes de cáncer de mama (Lee.2005).

4.1.2.d (+)-Catequina y (-)-Epicatequina de *Theobroma Cacao*

Durante siglos el chocolate de cacao ha sido conocido no solo por su sabor, si no por sus efectos en la salud. De hecho los Incas lo consideraban la bebida de los

dioses, asociación que le dio origen al nombre científico del árbol de cacao; *Theobroma Cacao*, proveniente de las vocablos griegos *teo* que significa Dios y *broma* que significa bebida. Los primeros indicios de la fecha de consumo del cacao se remontan al año 1600. En el siglo 16, el emperador azteca Moctezuma quien fue un gran admirador de cacao, lo llamo "bebida divina" y Hernán Cortez expresó que: Una taza de esta preciosa bebida permitía a un hombre caminar durante un día entero sin comer.

Estudios recientes han demostrado que el cacao es una fuente rica de flavanoles los cuales están presentes en la naturaleza en forma de monómeros (catequinas) y de polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). A diferencia del resto de los flavonoides, los flavanoles son los únicos que no aparecen en forma glicosilada en los alimentos y se distinguen dos clases:

- Las proantocianidinas son los flavanoles responsables del carácter astringente de algunas frutas (uvas, manzanas, bayas, etc.) y bebidas (vino, sidra, té, cerveza, etc.), así como del amargor del chocolate. Dada la dificultad para evaluar el contenido de proantocianidinas en los alimentos por su amplio rango de estructuras y pesos moleculares, los únicos datos disponibles en la literatura se refieren a los dímeros y trímeros de catequinas, que son tan abundantes como las propias catequinas ^(Manach y cols.2004).
- Las catequinas se encuentran en frutas como los albaricoques, cerezas (hasta 250 mg/Kg) y en bebidas como en el vino tinto (hasta 300 mg/L), sin embargo, las principales fuentes de catequinas son el té verde (hasta 800 mg/L) y el chocolate (hasta 600 mg/L). La Catequina y Epicatequina (EC) son los flavanoles más comunes en las frutas, mientras que las galocatequinas, epigalocatequina (EGC) y epigalocatequina 3-galato (EGCG), se encuentran en algunas semillas de leguminosas, uvas y principalmente en el té ^(Arts y cols.2000).

Catequina y Epicatequina poseen 2 anillos de fenilo (A y B) unidos a través de un dihidropirano heterocíclico (C), con un grupo hidroxilo en el Carbono 3, la molécula presenta dos centros quirales en el Carbono 2 y 3 (Figura 16). Por lo que tienen cuatro diastereoisómeros.

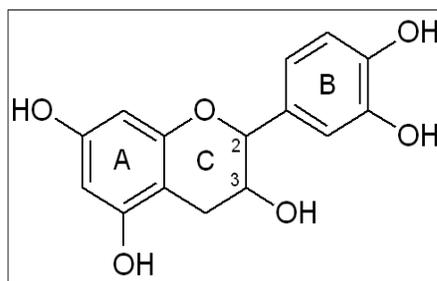


Figura 16. Molécula de Catequina y Epicatequina

Dos de los isómeros en posición trans y son llamados Catequina y los otros dos están en configuración cis, llamados Epicatequina (Figura 17).

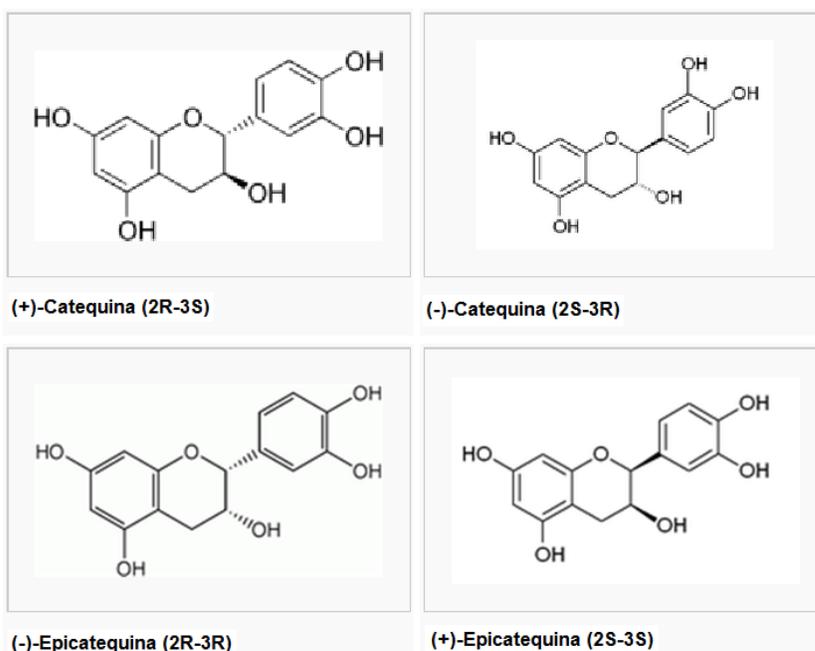


Figura 17. Galería de diastereoisómeros de Catequina y Epicatequina

El isómero de la Catequina más común es la (+)-Catequina y el isómero de Epicatequina más común es (-)-Epicatequina ^(Rinaldo y col.2010).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El papel fundamental de la metilación aberrante de genes supresores de tumor se ha establecido en los últimos años, como un acontecimiento precoz y frecuente en la carcinogénesis. Numerosos estudios muestran una amplia gama de genes silenciados por la metilación del ADN en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama.

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en el mundo. En México estudios epidemiológicos muestran que esta patología ocupa el primer lugar en neoplasias en la mujer y es una de las principales causas de muerte. Los tratamientos actuales en pacientes en estadio temprano, así como en la última etapa, involucran desde cirugía, radiación y quimioterapia citotóxica. Unos de los principales problemas asociados con los tratamientos farmacológicos es su efecto secundario tóxico. La mayor parte de los agentes quimioterapéuticos no discriminan entre células normales y tumorales y por lo tanto inducen la muerte celular en todas las células proliferantes.

En la búsqueda de nuevos compuestos que podrían ser beneficiosos para la prevención y tratamiento del cáncer, se encuentran los flavonoides, los cuales han atraído mucha atención debido a su amplia gama de actividades biológicas y su capacidad de modular alteraciones epigenéticas como la metilación. Hoy en día, se cuenta con evidencia fehaciente que sugiere que estos compuestos actúan como potentes agentes antitumorales. Nuestro interés se ha centrado en evaluar las propiedades anti cancerígenas de dos flavanoles (+)-Catequina y (-)-Epicatequina provenientes de las semillas del árbol *Theobroma Cacao*.

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en la población femenina alrededor del mundo. Datos alarmantes revelan que 1 de cada 8 mujeres desarrollará esta enfermedad, en México a partir del 2006, ocupa el primer lugar como causa de muerte en mujeres.

Uno de los principales problemas durante el tratamiento de la enfermedad es la agresividad de la terapia, a la cual son sometidas las pacientes. También falta dar una terapia personalizada y caracterizar el tumor. Actualmente, aun cuando la incidencia de cáncer de mama continua aumentando, es importante señalar que en muchos países, la mortalidad ha disminuido; cambio que se ha explicado por los avances logrados en el diagnóstico y el tratamiento dirigido a las alteraciones epigenéticas (alteraciones que se presentan en las primeras etapas de la carcinogénesis).

En la actualidad, un gran número de evidencias señalan a la dieta como un elemento clave en la prevención de neoplasias; siendo el consumo de polifenoles un factor importante en reducir el riesgo de cáncer y otras enfermedades, de hecho, los efectos quimiopreventivos de estos compuestos fitoquímicos, así como su capacidad de activar genes silenciados por alteraciones epigenéticas y su posible capacidad de modular eventos celulares como son la apoptosis, la diferenciación y el ciclo celular los colocan como agentes terapéuticos potenciales para el tratamiento de esta enfermedad.

Una fuente rica en polifenoles (flavonoides) es el árbol *Theobroma Cacao*, del cual se obtiene el cacao; un componente básico del chocolate, donde los monómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina han recibido considerable atención debido a sus propiedades antioxidantes y anti-cancerígenas, colocándolos como agentes bioactivos con un gran potencial en la prevención y tratamiento del cáncer de mama.

En este estudio se pretende aportar conocimientos sobre las propiedades antineoplásicas y eventos moleculares relacionados con estos compuestos, que permitan conocer su mecanismo de acción y su posible utilidad en el tratamiento del cáncer de mama.

IV. HIPÓTESIS

La capacidad antineoplásica de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina está determinada por su capacidad de modular el proceso de metilación de genes en células cancerosas

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si los flavonoides (+)-Catequina y (-)-Epicatequina modulan la metilación de genes en líneas celulares de cáncer de mama.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si (+)-Catequina y (-)-Epicatequina inhiben la proliferación celular de las líneas MDA MB-231, MCF-7 y BT-474.
- Determinar la Concentración Inhibitoria 50 de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina sobre la proliferación celular en las líneas celulares bajo estudio.
- Determinar si el mecanismo de inhibición de la proliferación celular por (+)-Catequina y (-)-Epicatequina involucra una inducción de apoptosis.
- Demostrar sí (+)-Catequina y (-)-Epicatequina tienen la capacidad de revertir el estado de metilación del gen DAPK1 empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Específica de Metilación (MSP).

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

En este trabajo se analizaron los efectos antiproliferativos de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina (SIGMA.USA). Ambos compuestos fueron disueltos en metanol a una concentración final de 10 mM (solución stock) y almacenados a -20°C por no más de 20 días.

Metil tiazol tetrazolio (MTT), conocido también como (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolio bromuro) se preparó disolviendo 3 mg/mL en medio DMEM (sin rojo de fenol) y se almacenó a -4°C protegido de la luz.

El estuche comercial *MethylCode Bisulfite Conversion* se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA. USA).

Los primers para identificar el estado de metilado y no metilado se muestran en el tabla 3 y se señala el producto de amplificación esperado.

TABLA 3. Par de primers para el gen DAPK1.

Primer	Producto amplificado
DAPK1 No metilado 5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTATTGTT-3' S 5'-CAAATCCCTCCCAAACACCAA-3' AS	106 pb
DAPK1 Metilado 5'-GATACGGTTTGTATTTTGTTCGC-3' S 5'-CGAACGATTCAAAAACCTCCAAC-3' AS	101 pb

6.2 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares: MDA MB-231, MCF-7 y BT-474 provenientes de American Type Culture Collection (ATCC):

Las líneas celulares MDA MB-231 y MCF-7 fueron crecidas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alto en glucosa, antibiótico al 1% y suplementado con 7.5 % de suero fetal bovino (SFB).

La línea celular BT-474 fue crecida en DMEM Avanzado, antibiótico y suplementado con 10% de SFB y glutamina.

El cultivo primario de Células Endoteliales de Arterias Coronarias Humanas (HCAEC), fue crecida en medio basal endotelial (medio suplementado), antibiótico al 1% y 10% de SFB.

Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, el medio se cambio cada 72 hrs y se emplearon en los experimentos cuando alcanzaron la confluencia.

La manipulación de los cultivos y la preparación de los compuestos en estudio se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

6.3 Ensayos de viabilidad celular con diferente número de células

Las líneas celulares son un modelo frecuentemente usado en el estudio de la carcinogénesis, vías de transducción de señales y el hallazgo de nuevos blancos terapéuticos. En este estudio se utilizaron placas de 96 pozos fondo plano para el cultivo celular. Las líneas celulares MDA MB-231, MCF-7 y BT-474 fueron resuspendidas en el medio correspondiente y sembradas a una densidad de 1×10^3 , 5×10^3 y 1×10^4 en un volumen de 100 μ L por pozo. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad por 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio y se crecieron en presencia de 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 μ M de (+)-Catequina. Se incubaron por 72 horas y la viabilidad celular fue determinada empleando el ensayo de MTT. El mismo procedimiento fue realizado para (-)-Epicatequina.

6.4 Ensayo de (MTT)

Este método fue desarrollado para medir la proliferación celular, el cual está basado en la medición de la actividad mitocondrial ^(Mosmann.1983, Francois Denizot and Rita Lang.1986), y se fundamenta en la reducción metabólica del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolio bromuro, realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para formar cristales azules de formazán; compuesto insoluble en agua, pero soluble en dimetil sulfóxido (DMSO).

Transcurrido el tiempo de 72 hrs de incubación células-flavonoides, se retiró el tratamiento y se colocaron 100 μ L de medio claro por pozo. Se añadieron 40 μ L de MTT y se incubó por 2.5 horas a 37°C, para permitir la formación de cristales de formazán. Posteriormente se retiró el medio y se adicionaron 200 μ L de dimetil

sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales. Se incubó 10 minutos con agitación constante y se determinó la D.O. a 550 nm en un lector de microplacas. La viabilidad celular es proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazán en solución.

6.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina

Para determinar la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀), la línea celular MDA MB-231 fue sembrada a una densidad 1×10^4 células y se incubó por 24 hrs. Posteriormente las células fueron expuestas a 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 μM de (+)-Catequina ó (-)-Epicatequina. La viabilidad celular fue determinada a las 72 hrs empleando el ensayo de MTT. El cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se realizó empleando el programa GraphPad Prism versión 5.

6.6 Cinética de proliferación celular empleando (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la mezcla en las líneas MDA MB-231, MCF-7 y BT-474

Para evaluar el efecto de (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la mezcla sobre la proliferación celular con respecto al tiempo, las líneas MDA MB-231 y MCF-7 (1×10^4) fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas con la CI₅₀ de cada uno de los compuestos fenólicos y la mezcla. La línea BT-474 (1×10^4 células) fue incubada únicamente con la CI₅₀ de la mezcla de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina. Las placas fueron incubadas durante 72 hrs. Y la viabilidad celular fue determinada cada 24 hrs empleando el ensayo de MTT.

6.7 Efecto de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina en un Cultivo Primario de Células Endoteliales de Arterias Coronarias Humanas (HCAEC)

Para determinar la especificidad del efecto antiproliferativo observado con los flavonoides se emplearon Cultivos Primarios de Células Endoteliales de Arterias Coronarias Humanas, las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^4 y se dejaron reposar por 24 hrs. Posteriormente se incubaron

con 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 μM de cada uno de los flavonoides. La viabilidad celular fue determinada a las 72 hrs empleando el ensayo de MTT.

Para evaluar el efecto de (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la mezcla sobre la proliferación celular con respecto al tiempo. Células HCAEC (1×10^4) fueron sembradas en placas de 96 pozos y crecidas en presencia de la CI_{50} de los flavonoides y la mezcla. La viabilidad celular fue determinada cada 24 hrs durante 72 hrs, empleando el ensayo de MTT.

6.8 Estudio de apoptosis con (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la mezcla en las líneas MDA MB-231, MCF-7 y BT-474

Se han descrito muchos procesos dinámicos que llevan a la muerte de la célula, sin embargo, el proceso de apoptosis ha sido considerado el mecanismo principal de inducción de muerte por los agentes bioactivos de la dieta, donde la pérdida de la integridad del ADN mediante su fragmentación por la acción de la enzima endonucleasa a nivel internucleosomal, genera fragmentos de 180-200 pares de bases o múltiplos. Este patrón en la fragmentación del ADN puede ser evaluado mediante electroforesis en un gel de agarosa a través de la aparición de “escaleras de ADN”.

Células MDA MB-231, MCF-7 y BT-474 (1×10^6) fueron sembradas en cajas de 6 pozos, 24 horas después de ser incubadas con la CI_{50} de (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la mezcla de los flavonoides la fragmentación del ADN fue analizada. En el caso de las líneas MDA MB-231 y MCF-7 la incubación se llevó a cabo en medio claro. En la línea BT-474, la incubación de los compuestos se realizó en DMEM Advanced y únicamente empleando la mezcla de los flavonoides. Cada 24 hrs las células fueron recolectadas y el ADN fue obtenido. La fragmentación de ADN fue analizada a través de electroforesis en geles de agarosa al 2%.

6.8.1 Extracción de ADN

El método de purificación de ADN genómico más ampliamente utilizado es el de fenol-cloroformo, el cual se fundamenta en el uso de solventes orgánicos que por diferencia de densidades y por su capacidad para separar proteínas, permiten la purificación y aislamiento del ADN.

Trascurrido el tiempo de los tratamientos y sus respectivos controles, se retiró el medio de las células y se colocó en tubos de 15 ml. Se adicionaron 2 mL de EDTA 5mM por pozo y se incubaron 30 minutos a 37°C. Las células fueron recolectadas por raspado y depositadas en sus respectivos tubos. Se centrifugó por 10 min a 2000 rpm. El sobrenadante fue desechado y la pastilla formada se trató con 220 µL de buffer 2 (Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgCl₂ 10 mmol/L, NaCl 0.4 mol/L y SDS 10 g/L), disolviendo el precipitado de células. Las células disueltas se pasaron a un eppendorf de 1.6 mL y se agregaron 100 µL de NaCl 5M, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. Posteriormente se rescató el sobrenadante y se colocaron 2 volúmenes de etanol al 100%. Se dejó reposar por 24 hrs a -20°C.

Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 49 µL de Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1mmol/L (TE) y 1 µL de RNAsa H. Se incubó a 37°C por 2 hrs. Después de ese tiempo se llevó a un volumen de 500 µL con agua y se agregaron 500 µL de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y la fase acuosa se recolectó en otro tubo, se agregó undécima parte de acetato de amonio 10 M y dos volúmenes de etanol. Se dejó precipitando por 24 hrs a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 min y el sobrenadante fue desechado. Se colocaron 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar por espacio de 15 min. El ADN fue re suspendido en 30 µL de agua.

6.8.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa al 2%

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica rutinaria de gran utilidad que permite la separación, observación y purificación de muestras de ADN.

A 2 g de agarosa grado electroforesis en un matraz Erlenmeyer se le añadieron 100 mL de tampón TAE 1X (TAE 1X: Tris-base: 4.9 g, Na₂EDTA: 0.74 g, Acido acético glacial: 1.1 mL, H₂O c.b.p 1000 mL) y 1 µL de bromuro de etidio (0.625 mg/mL). Se calentó la mezcla, preferiblemente sin llegar a la ebullición y con agitación constante. Una vez disuelta la agarosa fue vertida sobre un soporte previamente sellado con cinta adhesiva y colocando el peine que sirvió para formar los pocillos del gel. Se dejó reposar durante 15 min. Gelificado se retiró la cinta adhesiva y el peine. Se colocó el soporte en una cámara horizontal de electroforesis, se añadió buffer TAE 1X cubriendo el gel.

Las muestras de ADN a analizar fueron colocadas en los pozos. 1 µg de ADN, con 2µL de buffer de carga 10X (Azul de bromofenol en porcentaje, Xilén cianol 0.25%, Glicerol 30% en H₂O). Finalmente la cámara se conectó a la fuente de poder y se corrió a 50 volts durante 45 min. Transcurrida la electroforesis se visualiza el gel bajo luz ultravioleta.

6.9 Determinación del estado de metilación del gen DAPK1 en la línea celular BT-474

La capacidad de detectar la metilación del ADN con eficacia y precisión se ha convertido esencial para el estudio de cáncer. A la fecha se han desarrollado métodos para la identificación de ADN metilado, incluyendo la electroforesis de alto rendimiento capilar y la Reacción en Cadena de la Polimerasa Especifica de la Metilación (MSP por sus siglas en ingles; Methylation Specific PCR).

En la actualidad la técnica más utilizada ha sido el método del bisulfito (Frommer y cols.2007). Este método consiste en el tratamiento del ADN con NaHSO₃ (bisulfito de sodio), donde las Citosinas no metiladas se convierten en Uracilos (detectadas

como timinas al amplificar por PCR), mientras que las Citosinas metiladas permanecen sin cambios.

ADN original con CpG metiladas G T T G **C^m** G C T **C^m** G C C T **C^m**

Secuenciación de ADN después de la G T T G **C^m** G T T **C^m** G T T T **C^m**

Conversión con bisulfito de sodio

Se recolectó el ADN (2 µg), el cual fue tratado con bisulfito de sodio, posteriormente el ADN fue amplificado empleando la técnica de MSP con primers específicos para detectar el estado metilado o no metilado. Las reacciones se realizaron bajo las mismas condiciones empleadas para determinar el estado del gen sin ningún tratamiento.

6.9.1 Tratamiento de ADN con bisulfito de sodio (NaHSO₃)

Una vez obtenido el ADN de la línea BT-474 correspondiente al control y la mezcla de los flavonoides. Se procedió al análisis de metilación del promotor del gen DAPK1 empleando PCR Especifica de la Metilación.

La cantidad de ADN empleada fue de 2 µg, los cuales fueron colocados en un tubo de PCR y llevados a un volumen final de 20 µL con agua estéril. Posteriormente se agregaron 130 µL de reactivo de conversión (ADN + CT), y se mezcló con la ayuda de la pipeta de arriba hacia abajo. Se cerró el tubo y se colocó en un termociclador a 98°C durante 10 minutos (desnaturalización del ADN), 64°C durante 2.5 horas (conversión de bisulfito) y 4°C de almacenamiento hasta por 20 horas.

Terminada la conversión el ADN fue purificado por columna de afinidad. La columna fue colocada en un tubo recolector y se añadió 600 µL de buffer de unión y la mezcla de conversión. La columna se mezcló por inversión y se dejó reposar, se centrifugó a 11000 rpm durante 30 seg y se desechó la solución obtenida en el tubo recolector.

Se añadió 100 µL de buffer de lavado (preparado con etanol) a la columna y se centrifugó a 11000 rpm durante 30 seg. Se desechó la solución resultante en el tubo recolector. Después se añadieron 200 µL de buffer de desulfonación a la columna y se dejó reposar a temperatura ambiente por un lapso de 15-20 min. Se centrifugó a 11000 rpm durante 30 seg y se desechó la solución obtenida. Posteriormente, se agregaron 200 µL de buffer de lavado a la columna y se centrifugó a las mismas condiciones. El lavado se repitió y se transfirió la columna a un tubo de microcentrifuga nuevo de 1.6 µL. Por último se añadieron 10 µL de buffer de elución directamente a la columna y se centrifugó a las condiciones mencionadas para obtener el ADN, el cual estuvo listo para su análisis.

6.9.2 Análisis del ADN tratado con bisulfito por medio de MSP

Una vez obtenidos los ADNs tratados con bisulfito (correspondiente al control y al tratamiento con la CI_{50} de la mezcla de flavonoides), se llevaron a cabo las reacciones de PCR Específicas de Metilación (MSP). Para ello se utilizó 1 µg de ADN de cada reacción MSP, mezclándose con los siguientes componentes: H₂O: 13.65 µL; dNTPs 0.5 mM: 1.0 µL; buffer de reacción 10X: 2 µL; MgCl₂ 2mM: 0.8 µL; primers específicos 10 µM: 1 µL + 1 µL; Taq polimerasa 5U/ µL: 0.25 µL.

Condiciones de amplificación: 94°C durante 3 min, 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 67°C durante 30 seg y 72°C de extensión por 45 seg, con una extensión final de 3 min a 72°C.

En todos los casos, las reacciones de MSP se llevaron a cabo utilizando primers específicos para regiones metiladas y no metiladas (ver tabla 4).

6.9.3 Electroforesis de productos amplificados por MSP en geles de Acrilamida-Bisacrilamida al 10%

Se empleó la técnica unidireccional usando el Sistema de BIORAD, se preparó un gel de Acrilamida-Bisacrilamida al 10% mezclando las siguientes soluciones: 1.72 de solución de Acrilamida-Bisacrilamida [29%-1%] + 100 µL de solución TAE 50X [Tris base; 242 g, Na₂EDTA; 37.2 g, Ácido acético glacial; 57.1 mL, H₂O cbp 1L] +

50 μ L de persulfato de amonio al 10% + 5 μ L de tetrametilendiamina + 3.1 mL de agua destilada. La mezcla preparada se colocó entre dos placas de vidrio y posteriormente se introdujo un peine hasta su polimerización. La placa de vidrio fue montada en la cámara de electroforesis (BIORAD) con 850 mL de buffer de corrimiento (TAE 1X) y se retiró el peine. Se cargó en el primer carril 1 μ L de marcador de pares de bases y en el resto de los carriles las muestras correspondientes de productos amplificados. Se corrió a 100 volts durante 80 min. Después de que se ha completado la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 min y posteriormente visualizado en luz ultravioleta.

VII. RESULTADOS

OBJETIVO 1

7.1 Determinar si (+)-Catequina y (-)-Epicatequina inhiben la proliferación celular de las líneas MDA MB-231, MCF-7 y BT-474.

Para determinar si (+)-Catequina y (-)-Epicatequina presentaban un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las líneas celulares provenientes de cáncer de mama se realizaron ensayos de proliferación celular en presencia de estos flavonoides. Las líneas celulares fueron crecidas en presencia de los flavonoides como se indica en la sección 6.3.

Línea MDA MB-231 con (-)-Epicatequina

Como se puede observar en la Figura 18A, cuando 1×10^3 células de la línea MDA MB-231 fueron crecidas en presencia del flavanol, una inhibición del crecimiento celular por (-)-Epicatequina fue observado a partir de 150 μ M, detectando un mayor efecto con el incremento de la concentración.

Cuando el número de células fue incrementado a 5×10^3 (Figura 18B) el efecto inhibitorio se observó a una concentración de 200 μ M, sin embargo un mayor efecto fue observado a 400 μ M.

Cuando un número mayor de células (Figura 18C) fue utilizado (1×10^4), el tratamiento con (-)-Epicatequina mostró un efecto inhibitorio a 200 μM , observando una mayor inhibición de la proliferación a la concentración de 400 μM .

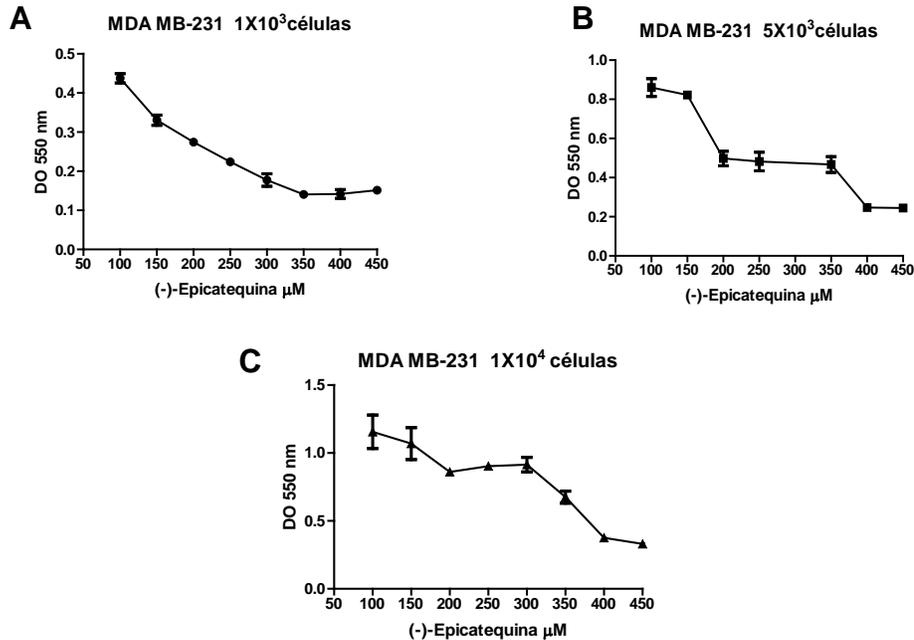


Figura 18. Gráficas que muestran el efecto antiproliferativo de (-)-Epicatequina a diferentes concentraciones y número de células de la línea MDA MB-231. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y el experimento fue realizado por triplicado.

Los resultados fueron graficados en el programa GraphPad Prism *versión 5.0*.

Línea MDA MB-231 con (+)-Catequina

Cuando MDA MB-231 fue tratada con (+)-Catequina, un efecto inhibitorio de la proliferación celular también fue observado. Sin embargo el efecto se presentó a diferentes concentraciones.

Como se observa en la Figura 19A, cuando 1×10^3 células fueron empleadas, el efecto inhibitorio se presentó a 300 μM . Al incrementar el número de células (5×10^3), el efecto se presentó a 350 μM . Finalmente con 1×10^4 células el mayor efecto inhibitorio de la proliferación celular se presentó a 400 μM .

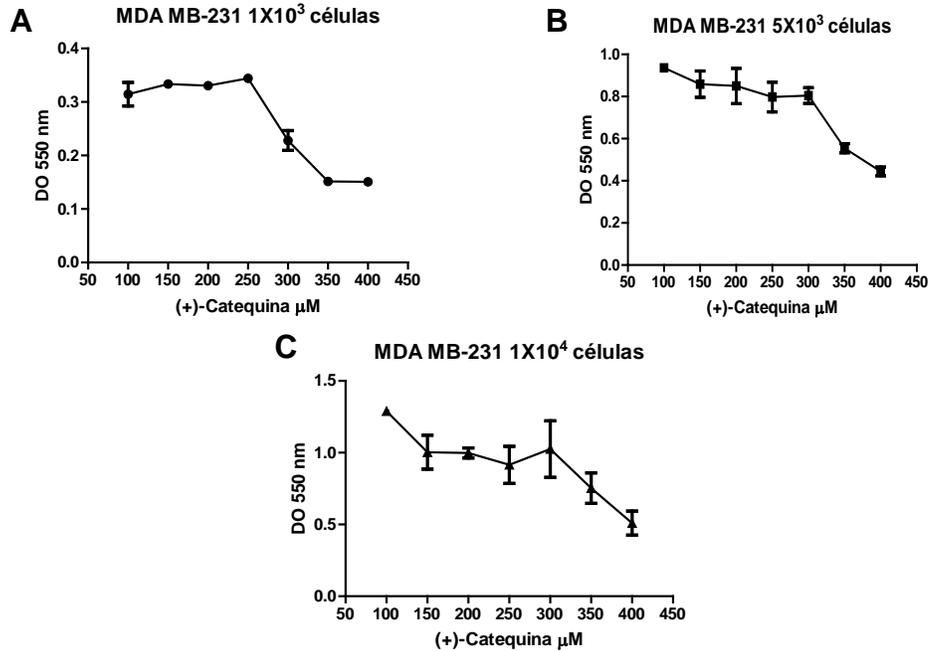
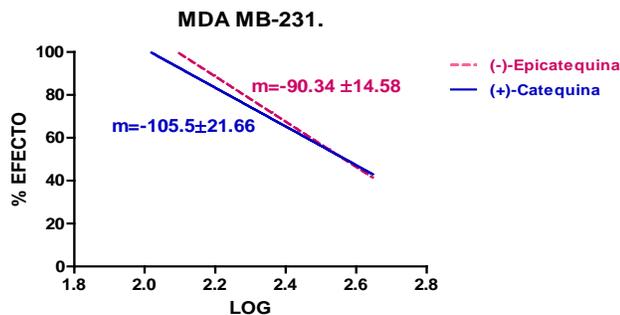


Figura 19. Gráficas que muestran el efecto antiproliferativo de (+)-Catequina a diferentes concentraciones y número de células en la línea MDA MB-231. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

Los resultados fueron graficados en el programa GraphPad Prism *versión 5.0*.

Con el objetivo de analizar la eficacia de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina, fue necesario linearizar las curvas obtenidas en los ensayos de la proliferación celular empleando 1×10^4 células con (-)-Epicatequina como con (+)-Catequina, lo cual se consiguió expresando la concentración en forma logarítmica en el eje de las abscisas y en las ordenadas el porcentaje del efecto, para posteriormente calcular la pendiente de la recta, parámetro que podemos utilizar para comparar la eficacia de los dos compuestos empleados. Los datos obtenidos se muestran en la gráfica 1.



Gráfica 1. Análisis de pendientes de (-)-Epicatequina y (+)-Catequina en 1×10^4 células MDA MB-231. El eje de las ordenadas muestra el porcentaje de efecto obtenido y el eje de las abscisas el Log 10 de las concentraciones empleadas.

Como se puede observar en la gráfica 1, las pendientes obtenidas para (-)-Epicatequina ($m=-90.34\pm 14.58$) y (+)-Catequina ($m=-105.5\pm 21.66$) no muestran diferencia significativa alguna, lo que sugirió que ambos compuestos presentan la misma eficacia.

Por otra parte, los resultados obtenidos con (+)-Catequina y (-)-Epicatequina con respecto al efecto inhibitorio de la proliferación celular de la línea MDA MB-231 indicaron que es independiente del número de células.

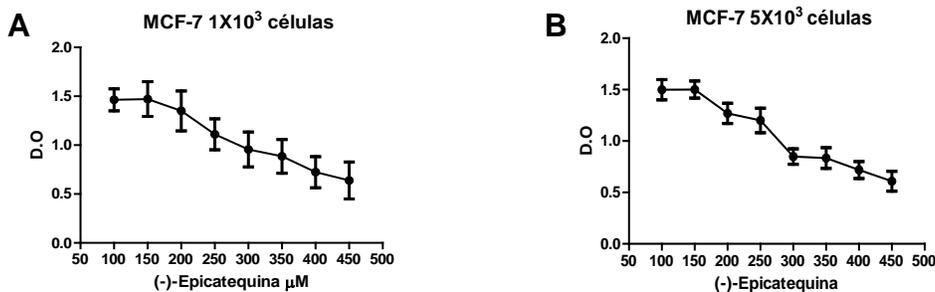
Cuando la línea celular MCF-7 fue empleada, los resultados mostraron un comportamiento similar al observado en la línea MDA MB-231, ya que ambos compuestos fenólicos indujeron una inhibición de la proliferación celular dependiente de la concentración.

Línea MCF-7 con (-)-Epicatequina

La figura 20A muestra el efecto de (-)-Epicatequina con 1×10^3 células. Como se observa, la inhibición de la proliferación celular comienza con $250 \mu\text{M}$, efecto que aumentó con la concentración.

Cuando 5×10^3 células fueron empleadas (figura 20B), una inhibición se presentó en $200 \mu\text{M}$. Una mayor inhibición fue observada a partir de $300 \mu\text{M}$.

En la figura 20C, correspondiente a 1×10^4 células, también se observó que la inhibición se presentó a $200 \mu\text{M}$ y esta fue en aumento conforme al incremento de la concentración.



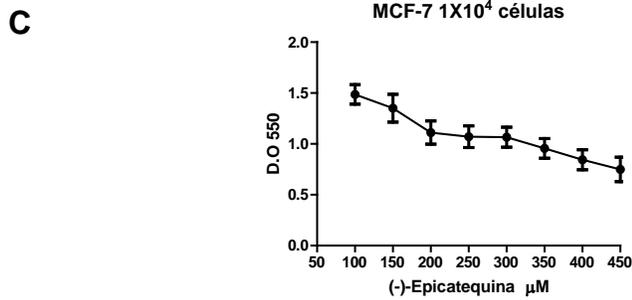


Figura 20. Gráficas que muestran el efecto antiproliferativo de (-)-Epicatequina a diferentes concentraciones y número de células en la línea MCF-7. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas ± SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

Línea MCF-7 con (+)-Catequina

Al administrar (+)-Catequina a 1x10³ células (figura 21A) el efecto inhibitorio se pudo observar a 250 μM, efecto que se incrementó al aumentar la concentración.

De una forma muy interesante, cuando 5x10³ células fueron tratadas, el efecto inhibitorio fue muy evidente a 200 μM. En 1x10⁴ células (figura 21C) el efecto se pudo observar a 350 μM.

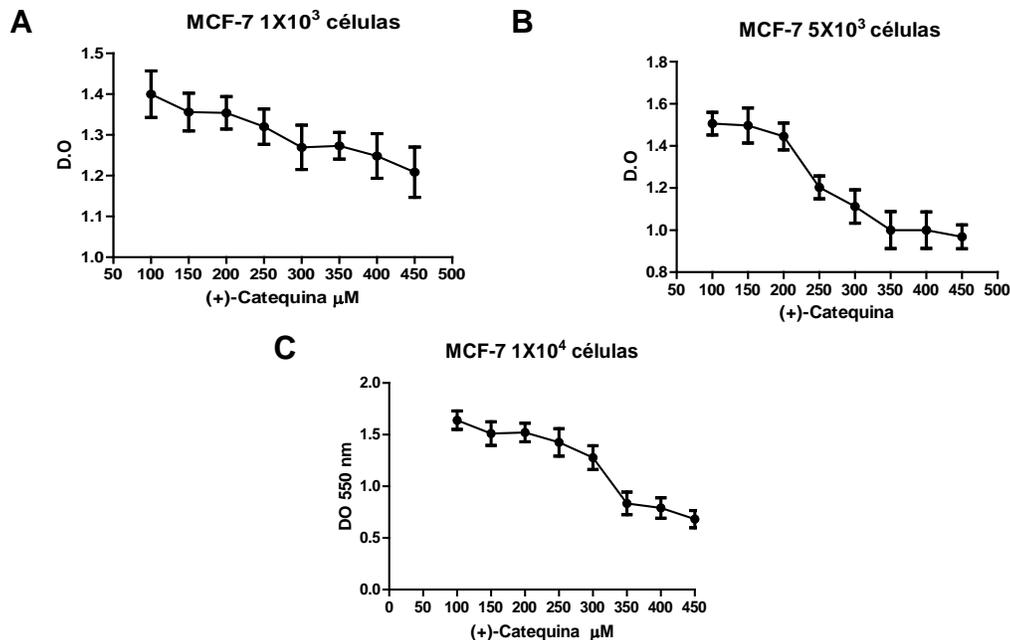
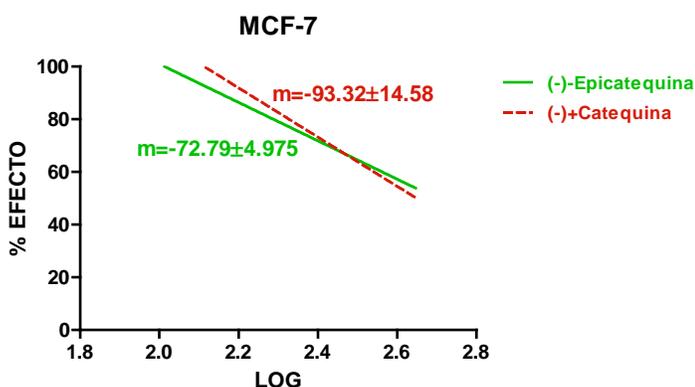


Figura 21. Gráficas que muestran el efecto antiproliferativo de (+)-Catequina a diferentes concentraciones y número de células en la línea MCF-7. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas ± SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

Como en el caso de la línea MDA MB-231, se determinó la eficacia de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina en la línea MCF-7 (1×10^4 células), realizándose el análisis de la pendiente.



Grafica 2. Análisis de pendientes de (-)-Epicatequina y (+)-Catequina en 1×10^4 células MCF-7. El eje de las ordenadas muestra el porcentaje de efecto obtenido y el eje de las abscisas el Log 10 de las concentraciones empleadas.

Como se puede observar en la gráfica 2 las pendientes correspondientes a (-)-Epicatequina; $m = -72.79 \pm 4.975$ y a (+)-Catequina; $m = -93.32 \pm 14.58$ no muestran diferencia significativa.

Estos resultados sugieren que ambos compuestos fenólicos presentan la misma eficacia en la línea MCF-7.

La gráfica nos muestra el análisis de las pendientes, las cuales fueron; línea MDA MB-231: (-)-Epicatequina de -90.34 ± 14.58 , para (+)-Catequina de -105.5 ± 21.66 , en la línea MCF-7 para (-)-Epicatequina de -72.79 ± 4.975 y para (+)-Catequina: -93.32 ± 14.58 .

Este resultado muestra que los monómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina presentan la misma eficacia en el efecto inhibitorio de la proliferación celular en las líneas MDA MB-231 y MCF-7.

Línea BT-474 con (-)-Epicatequina y posteriormente con (+)-Catequina.

Interesantemente cuando analizamos la línea celular BT-474 bajo las condiciones empleadas anteriormente, se observó que (+)-Catequina y (-)-Epicatequina no presentaron efecto inhibitorio sobre la proliferación celular (Figura 22 y 23).

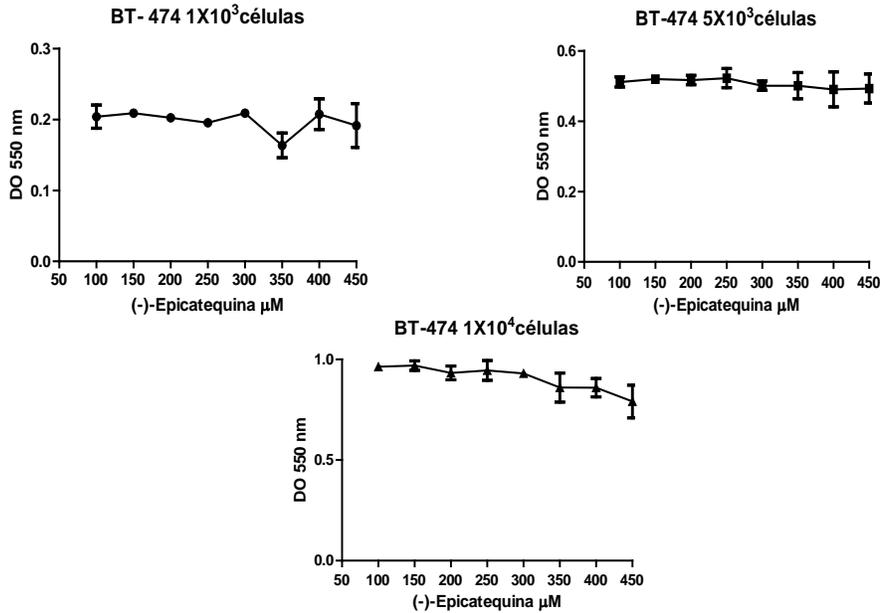


Figura 22. Gráficas que muestran el tratamiento de (-)-Epicatequina a diferentes concentraciones y número de células en la línea BT-474. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

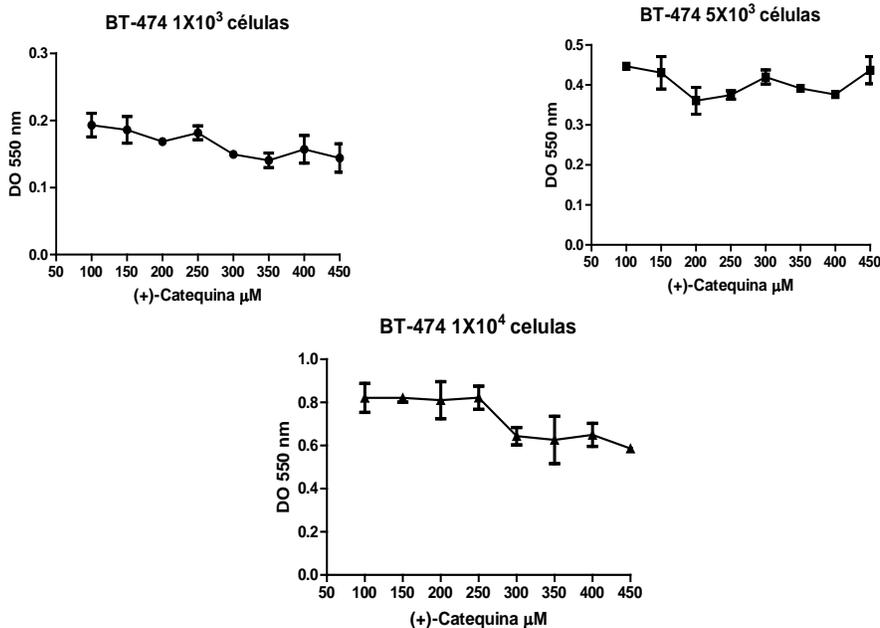


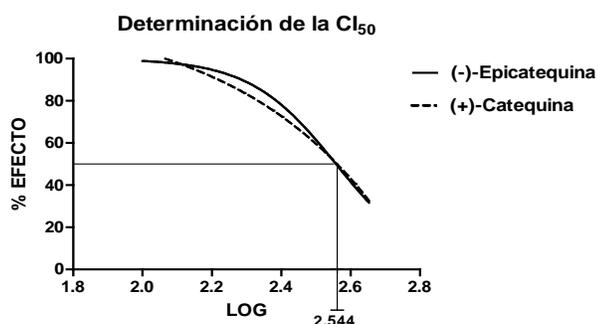
Figura 23. Gráficas que muestran el tratamiento de (+)-Catequina a diferentes concentraciones y número de células en la línea BT-474. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

Estos resultados sugieren que (+)-Catequina y (-)-Epicatequina presentan un efecto antiproliferativo específico contra células de carcinoma lobulillar.

OBJETIVO 2

7.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina en la proliferación celular de las líneas celulares bajo estudio.

Para determinar la CI₅₀ se utilizaron las curvas dosis-respuesta de la línea MDA MB-231 con 1×10^4 células (sección 6.5).



Gráfica 3 Análisis de la CI₅₀ de (-)-Epicatequina y (+)-Catequina en 1×10^4 células MDA MB-231. El eje de las ordenadas muestra el porcentaje de efecto obtenido y el eje de las abscisas el Log 10 de las concentraciones empleadas.

El cálculo se realizó con el programa GraphPad Prism *versión 5*, resultando: **350 μ M tanto para (-)-Epicatequina como para (+)-Catequina.**

Estos resultados permitieron establecer las condiciones de número de células y CI₅₀ de los compuestos fenólicos para los experimentos siguientes.

7.2.1 Efecto de la CI₅₀ de (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la combinación de los flavonoides sobre la cinética de la proliferación celular de las líneas MDA MB-231 y MCF-7.

Con el objetivo de examinar el efecto inhibitorio de (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y la combinación con respecto al tiempo, se realizó una cinética de proliferación celular utilizando la CI₅₀ y 1×10^4 células de las líneas MDA MB-231 y MCF-7.

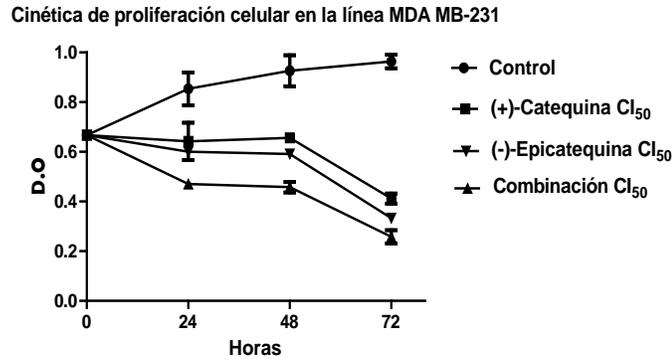
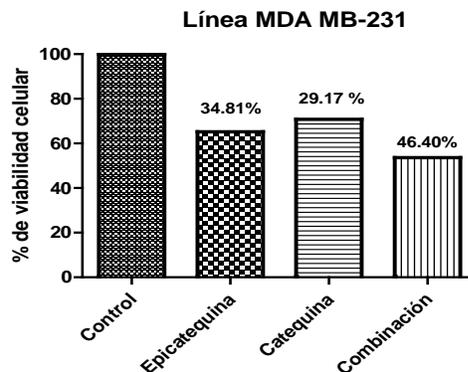


Figura 24. Efecto de (+)-Catequina (350 μ M), (-)-Epicatequina (350 μ M) y la combinación de ambos compuestos fenólicos sobre la cinética de proliferación celular de MDA MB 231 a 24, 48 y 72 hrs. La Densidad Óptica (D.O) representa una relación directamente proporcional de la proliferación celular. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

En la figura 24 se puede observar que el control (células neoplásicas tratadas con el vehículo) presentaron una proliferación, sin embargo en la presencia de la CI₅₀ de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina se observó una inhibición de la proliferación celular con respecto al tiempo. Interesantemente cuando los compuestos fenólicos se usaron en combinación, una inhibición mayor de la proliferación celular fue observada.

Para determinar si el efecto observado con la combinación de los compuestos fenólicos era de tipo aditivo, sinérgico o de potencialización, el área bajo la curva (ABC) de los resultados obtenidos de la cinética de proliferación fue calculada y posteriormente normalizada a porcentaje, obteniendo la siguiente gráfica.



Gráfica 4 Área bajo la curva de la viabilidad celular de línea MDA MB-231 con (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y su combinación, comparada con el control. Los números sobre las barras indican el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular.

En la gráfica 4 se puede observar que (-)-Epicatequina inhibió la viabilidad celular en un 34.81%, (+)-Catequina en un 29.17% y la combinación en un 46.40%.

Similar patrón sobre la inhibición de la proliferación celular fue observado en la línea MCF-7.

La figura 25 muestra los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento realizada a las células MCF-7. Como se puede observar un efecto inhibitorio en el crecimiento de las células se presentó con (+)-Catequina y (-)-Epicatequina, efecto que se incrementó cuando la combinación de ambos compuestos fue empleada en comparación con el grupo control.

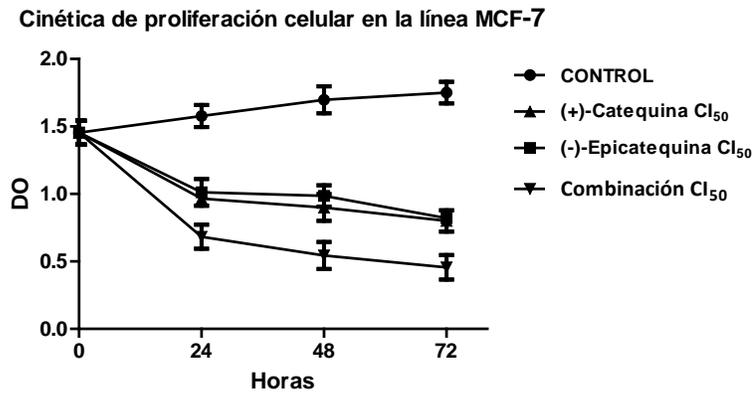
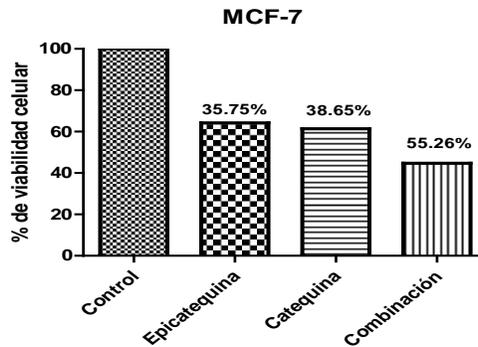


Figura 25. Efecto de (+)-Catequina (350 μ M), (-)-Epicatequina (350 μ M) y la combinación de ambos compuestos fenólicos sobre la cinética de proliferación celular de MCF-7 a 24, 48 y 72 hrs. La Densidad Óptica (D.O) representa una relación directamente proporcional de la proliferación celular. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

Los resultados fueron normalizados a porcentaje, obteniendo la siguiente gráfica.



Gráfica 5. Área bajo la curva de la viabilidad celular de línea MCF-7 con (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y su combinación, comparada con el control. Los números sobre las barras indican el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular.

En la gráfica se muestra que (-)-Epicatequina inhibió la viabilidad celular en un 35.75%, (+)-Catequina en un 38.65% y la combinación en un 55.26 %. Estos resultados muestran un mayor efecto observado cuando la mezcla de los compuestos fue utilizada.

7.2.2 Efecto de la combinación (+)-Catequina y (-)-Epicatequina ($CI_{50}=350 \mu M$) sobre la proliferación de la línea BT-474

Debido a que la mezcla (+)-Catequina y (-)-Epicatequina presentó un mayor efecto en la inhibición de la proliferación de las líneas celulares MDA MB-231 y MCF-7, se analizó si la mezcla podría tener un efecto en las células BT-474. Se realizó una cinética de proliferación celular empleando esta mezcla (sección 6.6) y los resultados obtenidos se muestran en la figura 26.

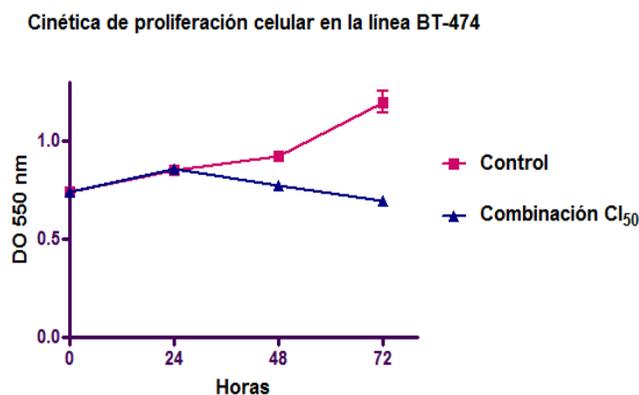


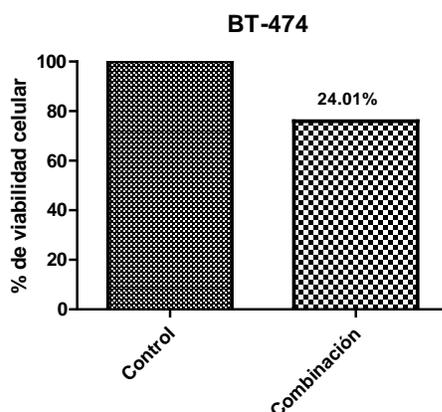
Figura 26. Efecto de la combinación de ambos compuestos fenólicos sobre la cinética de proliferación celular en la línea BT-474 a 24, 48 y 72 hrs. La Densidad Óptica (D.O) representa una relación directamente proporcional de la proliferación celular. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

Un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de BT-474 se pudo observar (Figura 26), el control mostró una proliferación celular, mientras que una inhibición fue observada en presencia de la mezcla (+)-Catequina y (-)-Epicatequina ($CI_{50}=350\mu M$) a partir de las 24 hrs.

Este resultado puso en evidencia que la combinación de los compuestos fenólicos generó una inhibición de la proliferación celular de la línea BT-474, efecto que no

fue observado cuando los compuestos fenólicos fueron empleados por separado (Figuras 22 y 23).

El área bajo la curva fue obtenida y normalizada a porcentaje, obteniendo la siguiente grafica.



Gráfica 6. Área bajo la curva de la viabilidad celular de la línea BT-474 en presencia de la combinación (-)-Epicatequina y (+)-Catequina comparada con el control. Los números sobre la barra indican el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular.

La gráfica muestra una inhibición de la viabilidad celular con la mezcla de los flavonoides en un 24.1 %.

Los resultados obtenidos del análisis de ABC (gráficas 4, 5 y 6) muestran un mayor efecto inhibitorio al emplearse la combinación (+)-Catequina y (-)-Epicatequina, sugiriendo la posible existencia de un efecto aditivo.

7.2.3 Efecto de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina sobre un Cultivo Primario de Células Endoteliales de Arterias Coronarias (HCAEC).

Con la finalidad de determinar si el efecto inhibitorio de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina era específico de células neoplásicas, decidimos analizar el efecto de estos flavonoides en células no neoplásicas. Células endoteliales aisladas de arterias coronarias humanas, fueron crecidas en presencia de los flavonoides como se indica en la sección 6.7.

Como se muestra en la figura 27, (+)-Catequina y (-)-Epicatequina administradas a las concentraciones empleadas en células tumorales no presentaron efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular.

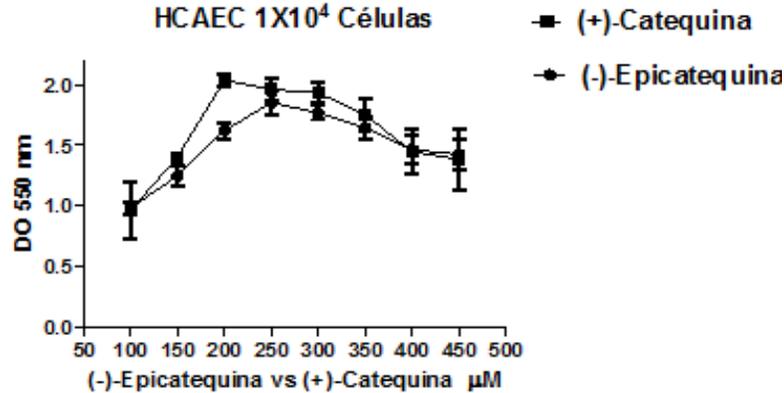


Figura 27. Efecto de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina en un Cultivo Primario de Células Endoteliales Aisladas de Arterias Coronarias.

Con el objetivo de analizar el efecto de la CI_{50} de (+)-Catequina, (-)-Epicatequina y su combinación con respecto al tiempo, se realizó una cinética de proliferación celular utilizando 1×10^4 células HCAEC (figura 28).

Como se puede observar; el tratamiento de las células con los compuestos fenólicos por separado y su combinación, no afecta la proliferación celular, la cual fue muy similar al control.

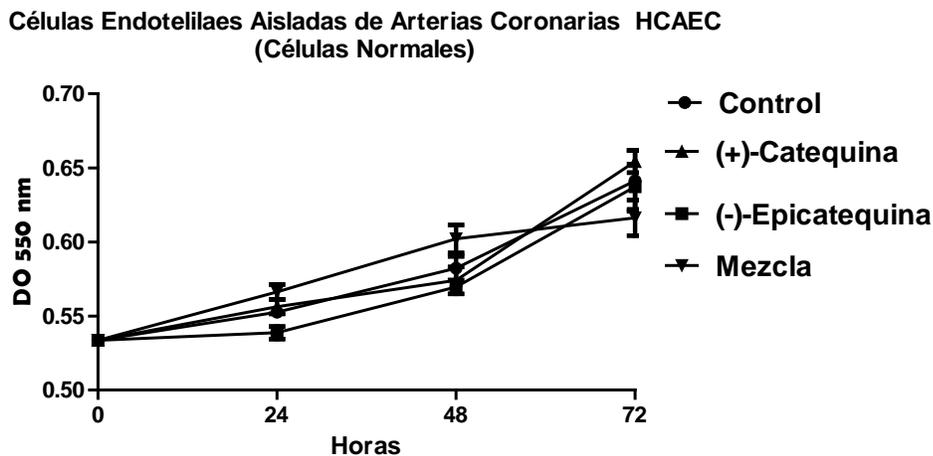
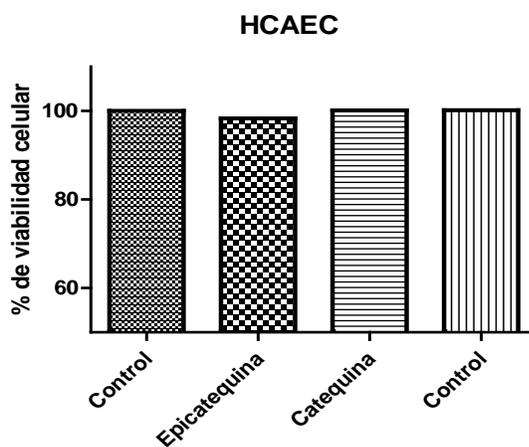


Figura 28. Efecto de (+)-Catequina (350 μM), (-)-Epicatequina (350 μM) y la combinación de ambos compuestos fenólicos sobre la cinética de proliferación en células HCAEC a 24, 48 y 72 hrs. La Densidad Óptica (D.O) representa una relación directamente proporcional de la proliferación celular. Los valores representan el valor promedio de 4 replicas \pm SD y los experimentos fueron realizados por triplicado.

El Área bajo la curva (ABC) fue calculada y normalizada a porcentaje obteniendo la siguiente gráfica.



Gráfica 7 Área bajo la curva de la viabilidad celular de línea HCAEC con (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y su combinación, comparada con el control.

Estos resultados muestran la ausencia de un efecto inhibitorio de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina sobre HCAEC e indican una selectividad hacia células de cáncer de mama.

OBJETIVO 3

7.3 Determinar si el mecanismo de inhibición de la proliferación celular por (+)-Catequina y (-)-Epicatequina involucra una inducción de apoptosis.

Para determinar si el mecanismo de inhibición de la proliferación celular por (+)-Catequina y (-)-Epicatequina involucra una inducción de apoptosis; las líneas MDA-MB-231 y MCF-7 fueron crecidas en presencia de la CI_{50} de estos flavonoides y su combinación (ver sección 6.8). La inducción de apoptosis fue evaluada obteniendo el ADN de las células tumorales incubadas con estos compuestos cada 24 hrs durante 72 hrs.

Como se puede observar (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y la mezcla indujeron una fragmentación del ADN en células MDA MB-231 (Figura 29) y MCF-7 (Figura 30), lo cual es característico de una inducción de apoptosis. Interesantemente,

cuando la mezcla de flavonoides fue empleada la fragmentación de ADN fue más evidente.

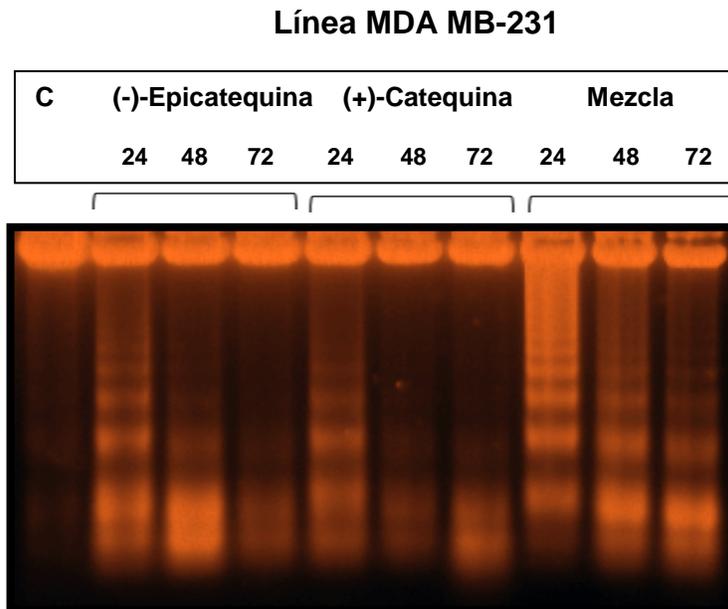


Figura 29. Electroforesis de agarosa al 2%. ADN de la línea MDA MB-231 extraído a las 24, 48 y 72 hrs después del tratamiento con la CI_{50} de (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y la mezcla de los flavonoides.

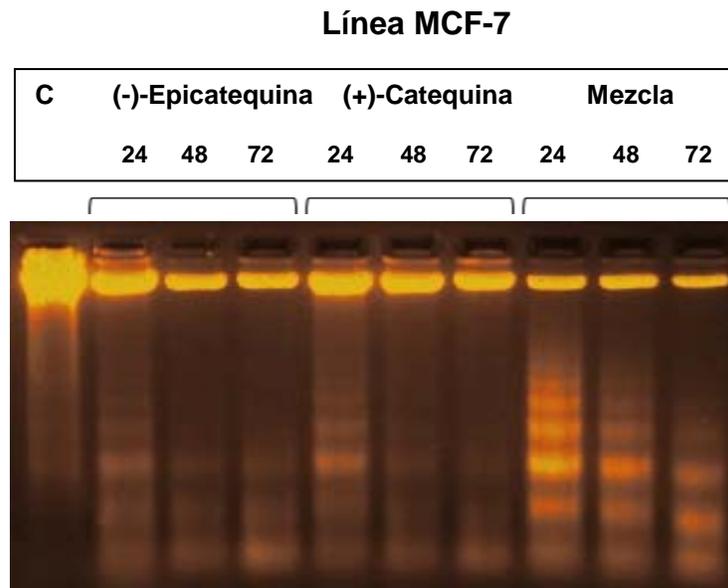


Figura 30. Electroforesis de agarosa al 2%. ADN de la línea MCF-7 extraído a las 24, 48 y 72 hrs después del tratamiento con la CI_{50} de (-)-Epicatequina, (+)-Catequina y la mezcla de los flavonoides.

Debido a que la línea BT-474 solo presentó una inhibición en su proliferación con la mezcla (+)-Catequina y (-)-Epicatequina (CI₅₀), la fragmentación del ADN fue determinada bajo estas condiciones. Como se puede observar en la figura 31, una fragmentación de ADN fue detectada, indicando la inducción de apoptosis. El efecto se pudo observar a partir de las 24 hrs después de la administración de la mezcla.

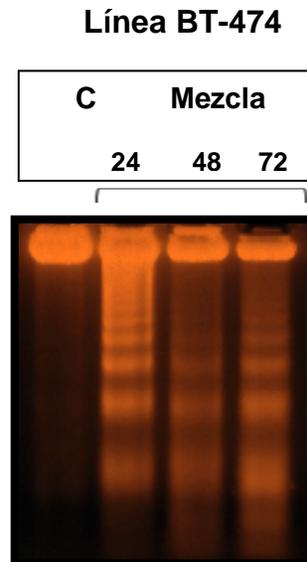


Figura 31. Electroforesis de agarosa al 2%. ADN de la línea BT-474 extraído a las 24, 48 y 72 hrs después del tratamiento con la CI₅₀ de la mezcla de los flavonoides.

OBJETIVO 4

7.4 Demostrar sí (+)-Catequina y (-)-Epicatequina tienen la capacidad de revertir el estado de metilación del gen DAPK1.

Debido a que la metilación del ADN es una alteración epigenética presente en el cáncer de mama que inactiva genes implicados en la regulación de la proliferación celular y teniendo en cuenta que es un evento susceptible a ser revertido por algunos flavonoides, nuestro objetivo fue determinar si el gen supresor de tumor DAPK1 (involucrado en la inducción de apoptosis), el cual, ha sido detectado como metilado en la línea BT-474 ^(Esteller,2001), podría ser modificado por la mezcla (+)-Catequina y (-)-Epicatequina.

Para evaluar esta posibilidad, células BT-474 fueron crecidas con la mezcla de flavonoides y se obtuvo el ADN a las 24 hrs después del tratamiento, tiempo en el cual se observó el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular y la fragmentación del ADN.

El ADN fue analizado por la técnica de MSP, utilizando primers específicos para la detección de DAPK1 (sección 6.9). El resultado obtenido mostró que la CI_{50} de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina tienen la capacidad de revertir el estado de metilación del gen DAPK1 (Figura 32), sugiriendo una re expresión del gen y como consecuencia un efecto inductor de apoptosis.

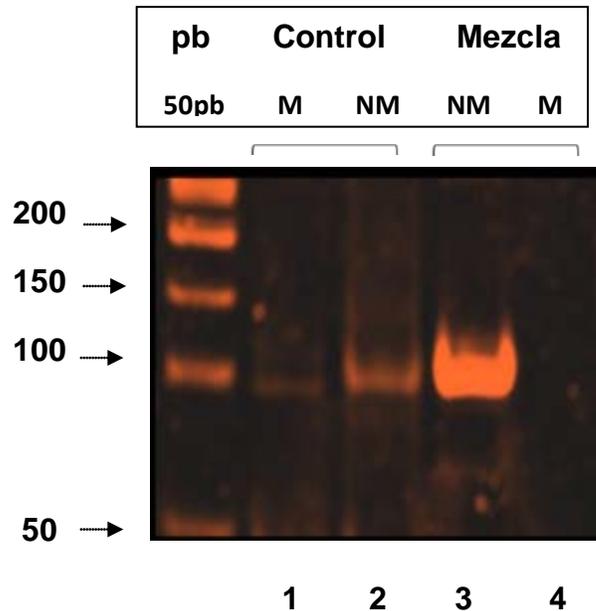


Figura 32. Gel de acrilamida-bisacrilamida al 10%. El carril 1 el marcador de 50 pares de bases, los carriles 2 y 3 corresponden al producto amplificado obtenido de células BT-474 únicamente incubadas con el vehículo. Los carriles 4 y 5, corresponden al producto amplificado de células BT-474 tratadas con la mezcla de los flavonoides. M= Primers específicos para regiones Metiladas. NM= Primers específicos para regiones No metiladas.

Como se puede observar en la figura 32, se detectó en el carril 1 el producto amplificado de 101 pb, correspondiente a DAPK1 en estado metilado, en el carril 2 correspondiente al producto amplificado con los primers específicos de regiones no metiladas se pudo observar una banda de 106 pb, lo que indica que el gen supresor DAPK1 presenta regiones metiladas y no metiladas.

En el carril correspondiente al ADN tratado con la mezcla (carril 3), se pudo observar una banda muy intensa; correspondiente al gen no metilado (106 pb), indicativa de la desmetilación de este gen supresor de tumor en la línea BT-474 por la mezcla (+)-Catequina y (-)-Epicatequina. Interesantemente se puede observar que los primers específicos de regiones metiladas no amplificaron después del tratamiento (carril 4).

VIII. DISCUSIÓN

La metilación del ADN es una de las principales modificaciones epigenéticas que ha venido emergiendo en los últimos años, como un evento temprano en el desarrollo de cáncer y que involucra la inactivación génica de diversas vías que contribuyen al desarrollo y la progresión del tumor. De hecho, las modificaciones epigenéticas se perfilan como un blanco clave en la prevención y la terapia del cáncer.

A efectos de la prevención y la terapia del cáncer, los componentes químicos de frutas y hortalizas han mostrado resultados prometedores. Una amplia variedad de estudios le atribuyen sus propiedades benéficas a la alta concentración de compuestos fenólicos, los cuales han despertado un gran interés por sus propiedades antioxidantes y su capacidad de modular eventos celulares como son la apoptosis, la diferenciación y el ciclo celular, además de estar involucrados en la activación de genes silenciados por metilación.

En este sentido, estudios realizados por Fang y colaboradores en 2003, demostraron que (-)-Epigallocatequina-3-galato (EGCG), el flavonoide más abundante del té verde; provoca una reversión del estado de metilación de los genes *p16* y *RAR* en la línea celular KYSE 510 provenientes de cáncer esofágico.

Interesantemente, los estudios realizados por Lee y Zhu en el 2006, muestran que EGCG, el ácido cafeico y el ácido clorogénico son capaces de inhibir la actividad de las ADN metiltransferasas (DNMTs) y recuperar la expresión de ciertos genes silenciados en células de cáncer de mama, demostrando que estos compuestos

fenólicos inhiben la metilación de la región promotora del gen *RAR* en células MDA MB-231 y MCF-7.

(+)-Catequina y (-)-Epicatequina son los monómeros más abundantes en una amplia variedad de frutas y vegetales y los estudios realizados sobre ellos radican principalmente en sus efectos antioxidantes, es decir, como captadores de radicales libres, ya que modulan el estado redox de la célula, lo que los ha colocado como buenos agentes preventivos frente al daño oxidativo celular (Azam S. y colaboradores en 2008). Pocas son las investigaciones que se han realizado para analizar el efecto o los mecanismos moleculares involucrados en sus propiedades antineoplásicas.

En el presente trabajo se estudió las propiedades antineoplásicas de los monómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina (flavonoides del *Theobroma Cacao*). Los resultados mostraron que son eficientes inhibidores de la proliferación celular, administrados de forma independiente o en combinación en 3 líneas celulares provenientes de cáncer de mama, colocándolos como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer de mama.

Los ensayos de proliferación celular mostraron que (+)-Catequina y (-)-Epicatequina indujeron una inhibición de la proliferación celular dependiente de la dosis e independiente del número de células en las líneas MDA MB-231 y MCF-7. El análisis realizado sobre las pendientes obtenidas de las curvas dosis-respuesta indicaron que (-)-Epicatequina y (+)-Catequina presentan un efecto antineoplásico con similar eficacia y misma CI_{50} .

Cabe mencionar que los monómeros de manera independiente en la línea BT-474 (ductal) no presentaron efecto alguno, lo que sugiere que los monómeros administrados de manera individual presentan un efecto específico para células provenientes de carcinoma Lobulillar.

Los resultados obtenidos al realizar la cinética de proliferación celular empleando la combinación de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina revelaron que la inhibición de la proliferación celular fue mayor, comparada con la administración de los

flavonoides de manera independiente en las líneas provenientes de carcinoma lobulillar, lo que nos llevo a pensar que en la línea BT-474 la combinación podría tener el efecto inhibitorio. Interesantemente, al realizar los experimentos corroboramos nuestra hipótesis, de la cual deducimos que los enantiómeros al ser combinados generan un efecto aditivo, induciendo la inhibición de la proliferación celular en las 3 líneas bajo estudio.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Paluszczak y colaboradores en 2010, donde al evaluar la actividad de una gama de polifenoles, observaron que betanina, un polifenol usado como colorante natural y el ácido siríngico; polifenol abundante en el vino, al ser administrados de manera individual en la línea MCF-7 no presentaron efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, sin embargo al ser administrados en conjunto con otros polifenoles, la inhibición de la proliferación celular fue observada.

Uno de los principales cuestionamientos que se presentaron en la realización de este trabajo era si (+)-Catequina y (-)-Epicatequina, presentaban selectividad hacia células cancerosas, por lo que se plantearon experimentos en células endoteliales no transformadas (HCAEC) y observamos que la proliferación celular no se vio afectada; lo que los coloca como un posible agente terapéutico selectivo para células cancerosas y por lo tanto prometedores candidatos en el tratamiento del cáncer de mama.

El silenciamiento de genes mediado por la hipermetilación del ADN, afecta una amplia gama de genes dentro de los cuales se incluyen los genes supresores de tumor, involucrados con la apoptosis, la cual desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular, permitiendo la eliminación de células fisiológicamente dañadas, afortunadamente innumerables estudios *in vitro*, dentro de los que destacan los realizados por Po-Lin en 2003 y Hsu en 2010, por mencionar algunos, han demostrado que los flavonoides aumentan significativamente la expresión de proteínas asociadas con la vía de transducción de señales implicados en la apoptosis, tal es el caso de la proteína p53, E-Cadherina y β -catenina, la activación de caspasa 3, Fas ligando y el receptor

Fas/APO-1. De hecho, se ha demostrado que otros flavonoides como EGCG pueden alterar los patrones de metilación del ADN, con la consecuente activación de genes silenciados epigenéticamente en diferentes líneas celulares provenientes de cáncer de mama. Uno de los genes que toma gran relevancia es el gen supresor de tumor DAPK1, el cual ha sido intensamente estudiado por Manel Esteller y colaboradores, donde demuestran que este gen supresor de tumor sufre una metilación aberrante de su región promotora que contribuye a su inactivación, favoreciendo el desarrollo y la progresión del cáncer de mama. La proteína cinasa es un filamento de actina asociado a proteínas pro-apoptóticas, induciendo muerte celular programada por varios estímulos incluyendo INF- γ , TNF- α , TNF- β y c-myc. La proteína DAPK suprime el crecimiento del tumor y metástasis incrementando la apoptosis *in vivo*.

Tomando en consideración que la metilación ha demostrado ser un evento altamente susceptible a ser revertido por algunos flavonoides, nuestro objetivo fue determinar si el gen supresor de tumor DAPK1 y el cual ha sido detectado como metilado en la línea BT-474 por Manel Esteller y colaboradores, podría ser modificado por los monómeros en estudio. Por tal motivo, se realizó un análisis epigenético mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación.

Los resultados de nuestro estudio concuerdan con las observaciones de Chung y colaboradores realizadas en 2005, donde agentes bioactivos de la dieta resultaron potentes agentes en la reactivación de genes involucrados en apoptosis silenciados epigenéticamente. Nuestros estudios de PCR Específicos de la metilación sobre el gen DAPK1 en la línea BT-474 mostraron que (+)-Catequina y (-)-Epicatequina revierten el estado de metilación de la región promotora de este gen supresor de tumor, resultados que concuerdan con la inducción de apoptosis observada en las líneas celulares por estos enantiómeros.

La posible expresión y promoción de apoptosis por DAPK1, es soportada por las evidencias que muestran el importante papel que juega en la supresión del tumor. De hecho, la expresión de DAPK1 es perdida en varias líneas celulares

incluyendo BT-474 y tejido tumoral. Además, se ha observado que DAPK1 es capaz de inhibir c-myc, deteniendo una transformación oncogénica. Interesantemente, en un modelo experimental de metástasis, los niveles de expresión de DAPK1 son inversamente correlacionados con la actividad metastásica del tumor y su re expresión suprime la habilidad invasiva del tumor. Finalmente, la evidencias realizadas por Gopisetty y colaboradores realizadas en el 2006, muestran una correlación entre la expresión de DAPK1 y la probabilidad de recurrencia en el cáncer de mama, por lo que metilación aberrante de DAPK1 es propuesta como un marcador de pronóstico en esta patología.

Actualmente, no existe a la fecha literatura que mencione la capacidad de los monómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina para revertir el silenciamiento epigenético de DAPK1, por este motivo, nuestro estudio es el primero en establecer la desmetilación de DAPK1 con la administración de compuestos polifenólicos, permitiendo contribuir al entendimiento de los efectos antineoplásicos de los monómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran el efecto antiproliferativo, inductor de apoptosis, desmetilación de DAPK1 y selectividad de los flavonoides, sin embargo, poco es entendido del mecanismo involucrado. Nosotros postulamos que una posible interacción de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina con alguna proteína acoplada a la membrana podría estar sucediendo, esta conjetura se basa en evidencia presentada en 2008 por Masahito Shimizu y colaboradores; quienes se han dado a la tarea de dilucidar la interacción de otros flavonoides como es EGCG con varios tipos de Receptores Tirosina Quinasa (RTKs). Sus estudios sugieren que los Receptores de Tirosina Quinasa son uno de los receptores fundamentales para que EGCG pueda inhibir el crecimiento de células cancerosas. De hecho, EGCG inhibe la activación de EGFR (ErbB1), HER2 (neu/erbB2) y también HER3 (neu/erbB3). Además, se ha propuesto que EGCG puede alterar la organización de los lípidos de la membrana y por lo tanto, impedir la dimerización y la activación de EGFR, inhibiendo la vía de Ras/MAPK y las vías de señalización PI3K/Akt, además de la activación de AP-1 y NF- κ B, los cuales

están íntimamente relacionados con la modulación de la expresión de genes asociados con la inducción de apoptosis, el control del ciclo celular, así como el control de la expresión y actividad funcional de genes supresores de tumor. De manera similar nosotros proponemos que (+)-Catequina y (-)-Epicatequina, podrían estar interactuando con un receptor, lo cual podría generar una cascada de señalización que podría dar como resultado una inactivación de DNMT y como consecuencia una desmetilación de DAPK1 y la inducción de apoptosis. Otra posibilidad es que la interacción flavanol-receptor podría estar estimulando vías de señalización involucradas con la activación de desmetilasas, si bien, esta hipótesis es probable se debe tener en consideración que esta actividad ha sido puesta de manifiesto pero no así las proteínas.

Finalmente, nuestros hallazgos abren la posibilidad de que estos agentes bioactivos pudieran ser utilizados de manera coadyuvante en la terapia contra el cáncer de mama, donde actualmente existe una urgente necesidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos capaces de ser eficaces y específicos contra la célula tumoral.

A pesar de que una amplia variedad de componentes bioactivos de la dieta, han demostrado un gran potencial en la prevención y tratamiento de varios tipos de cáncer, mas estudios son necesarios, orientados a entender los procesos celulares involucrados, así como estudios dirigidos en animales de experimentación con estos compuestos o posibles combinaciones sinérgicas con otros agentes antitumorales para mejorar su eficacia en la terapia del cáncer.

IX. CONCLUSIONES

- (+)-Catequina y (-)-Epicatequina resultaron ser eficientes inhibidores de la proliferación celular, administrados de forma independiente o en combinación en 3 líneas celulares de cáncer de mama.
- Efecto que no fue observado en células normales (HCAEC), lo que los coloca como excelentes agentes selectivos para células cancerosas.

- Interesantemente el efecto inhibitorio de la proliferación celular sobre la línea BT-474 solo fue observado cuando la mezcla de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina fue empleada.
- Los estudios de PRC Específicos de la Metilación sobre el gen DAPK1 en la línea BT-474 mostraron que (+)-Catequina y (-)-Epicatequina modifican la metilación de este gen supresor de tumor, causando una desmetilación de la región promotora de DAPK1.
- Estos resultados concuerdan con la inducción de apoptosis observada en las líneas celulares por estos enantiómeros.

X. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en este trabajo, las perspectivas de experimentos futuros se orientan en las siguientes direcciones.

En un primer plano, estarían los estudios destinados a complementar la capacidad de los enantiómeros (+)-Catequina y (-)-Epicatequina como potentes activadores de genes silenciados epigenéticamente, aunado a esto, evaluar en células no transformadas, si estos compuestos polifenólicos no alteran el patrón de metilación observado en nuestros estudios. Otro punto que sería interesante complementar son estudios *in vitro*, donde es necesario determinar la expresión del ARNm de aquellos genes en los cuales se module la metilación de su región promotora por los compuestos fenólicos, así como la expresión de la proteína.

Un segundo plano, consistiría en extrapolar los resultados *in vitro* a estudios *in vivo*, donde sería muy interesante evaluar la capacidad de (+)-Catequina y (-)-Epicatequina como agentes quimiopreventivos y/o quimioterapéuticos.

Tercero, la identificación del farmacóforo responsable de la actividad biológica y la consecuente modificación de la molécula con la finalidad de desarrollar un producto con mayor actividad, mejor biodisponibilidad y/o que aumente la potencia de sus acciones farmacológicas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamse S, Kloots W and Amelsvoort J. **Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat.** Nutrition Research 2005. 25: 305-317.
- Armstrong K, Moye E, Williams S, Berlin J and Reynolds E. **Screening mammography in women 40 to 49 years of age: a systematic review for the American College of Physicians.** Annals of Internal Medicine.2007. 146:516-526.
- Arts, I. C., van de Putte, B. & Hollman, P. C. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **48**,1746-1751 (2000).
- Azam S, Hady N and Khan N. **Prooxidant property of green tea polyphenols EC, EGC and C.** Toxicol. 2008. 18: 555-567.
- Balch C, Nephew K, Huang, T and Bapat S. **Epigenetic Bivalently market procces of cancer stem cell-driven tumorogenesis.** Bioesays. 2007. 29: 842-845.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. **DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumor supresor.** Oncogen 2007. 26:7773-7779.
- Baylin S and Herman J. **DNA Hypermethylation in Tumorigenesis: epigenetics joins genetics.** Trends Genet. 2000.16:168-174.
- Berdasco M and Esteller M. **Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry.** 2010. 4656:765-786.
- Berletch J, Liu C, Love W, Andrews L, Katiyar S and Tollefsbol T. **Epigenetic and genetic mechanisms contribute to telomerase inhibition by EGCG.** J Cell Biochem. 2008.103:509-519.
- Boyle P and Ferlay J. **Cancer incidence and mortality in Europe, 2004.** Annals of Oncology 2005.16:481-488.
- Boyle P. **Risks and Benefits of Estrogen plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. Principal Results From the Women's**

Health Initiative Randomized Controlled Trial. JAMA. 2002. 288:321-333.

- Caldas C and James D. **Sizing miRNAs as cáncer genes.** Nature. 2005.11:1-7.
- Carlson R, Allred D, Anderson B, Burstein H, Carter W and Edge S. **Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology.** J Natl Compr Canc Netw. 2009.7:122-192.
- Chen W and Colditz G. **Risk factors and hormone-receptor status: epidemiology, risk-prediction models and treatment implications for breast cancer.** Nature Clinical Practice Oncology. 2007. 4:415-23.
- Chen Z and Riggs A. **DNA methylation and demethylation in mammals.** J Biol Chem. 2011.123: 342-354.
- Cheng D, Yoon S, Lauwers G and Patel D. **Case 22-2007: A Women with a family history of gastric and breast cancer.** NEJM. 2007. 357:281-91.
- Denizot F and Lang R. **Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, sensitivity and reliability.** J. Immunol. Methods 1986. 89: 271-277.
- DiSaia P and Creasman W. **Clinical Gynecologic Oncology.** 5th Ed. 1997: 385-91.
- Egger G, Liang G, Aparicio A and Jones P. **Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.** Nature. 2004. 429:457-63.
- Essel D, Jeanne H, Inmaculada I, Tahseen A and Paul C. **Tumor Suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Serum of Breast Cancer Patients.** Clinical cancer research. 2004.10:6189-6211.
- Esteller M. **Epigenetic in cancer.** N. Engl. J. Med. 2008. 358:1148-1159.
- Esteller M and Corn P. **Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer.** Cancer Research. 2001. 61:3225-3229.
- Esteller M. **Epigenetics in evolution and disease.** Developmental Cell. 2008. 373:698-711.

- Fang M, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W and Yang C. **Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines.** *Cancer Res.* 2003.63:7563-7570.
- Ferlay J, Bray F, Pisan P and Parkin D. **Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide.** *Globocan.* 2002. IARC Cancer Base No 5, version 2.0. IARC Press: Lyon, 2004.
- Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin D . **GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer.** International Agency for Research on Cancer; Year. 2010.
- Foley D, Jeffrey M, Morley R, Craig J, Dwyer t and Smith K. **Prospects for Epigenetic Epidemiology.** *American Journal of Epidemiology.* 2009.169: 389-400.
- Foley D, Jeffrey M, Morley R, Craig J,Dwyer T and Smith K. **Prospects for Epigenetic Epidemiology.** *American Journal of Epidemiology.* 2009. 169: 389-400.
- Fostira F, Thodi G, Sandaltzopoulos R, Fountzilias G and Yannoukakos D. **Mutational spectrum of APC and genotype-phenotype correlations in Greek FAP patients.** *BMC Cancer.*2010.22;312-389.
- Frieden T, Jaffe H, Stephens J, Thacker S and Zaza S. **Cancer survivorsUnited States, 2007.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011.60:269-272.
- Gehring M, Wolf R and Steven H. **DNA demethylation by DNA repair.** *Cell Press.* 2009. 90:82-90
- Genevie´ve P, Morgan R and James R. **Epigenetic Control.** *J. Cell. Physiol.* 2009. 219: 243-250.
- Gennari R, Veronesi U, Andreoli C, Betka J, Castelli A and Gatti F. **Early detection of cancer: Ideas for a debate.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2007. 61: 97-103.
- Goll F, Kirpekar K, Maggert J and Yoder L. **Methylation of tRNAAsp by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2.** *Science.* 2006.311:395-

398.

- Gong C, Yao H, Liu Q, Chen J, Shi J, Su F and Song E. **Markers of tumor-initiating cells predict chemoresistance in breast cancer.** Breast Tumor Center. 2009. 243: 675-687.
- Hanahan D and Weinberg R. **The hallmarks of cancer.** Cell. 2000. 100:57-70.
- Hegi M, Sciuscio D, Murat A and Marc L. **Epigenetic deregulation of DNA and its potential for therapy.** Clinical cancer research. 2009.15:5026-5032.
- Hinshelwood R and Clark S. **Breast Cancer Epigenetics: Normal Human Mammary Epithelial Cells as a Model System.** J Mol Med. 2008.86:1315-1328.
- Hore T, Rapkins R and Graves J. **Construction and evolution of imprinted loci in mammals.** Research School of Biological Sciences. 2009. 1223: 324-351.
- Hsu Y and Liou Y. **The anti-cancer effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the signaling pathways associated with membrane receptors in MCF-7 cells.** Cell Physiol. 2010. 13:323-341.
- Inas A, Carsten M, Thanaa H, Hamed R, Amal I, Amal A and Nikolaus B, **Epigenetic alterations by methylation of RASSF1A and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA.** Cancer Genetics and Cytogenetics.2010.111:96-100.
- INEGI. Serie Estadísticas Vitales. Edición 2008. **World Health Organization 2006. Cancer Control. Knowledge into action.** Revisado el 29 de enero de 2010.
- Joensuu H, Kellokumpu L and Bono P. **Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer.** N Engl J Med. 2006. 35:809-820.
- Jones P and Baylin S. **The epigenomics of cancer.** Cell.2007. 128:683-692.

- Keen C. **Chocolate: Food as Medicine/Medicine as Food.** American College of Nutrition. 2001. 20:436-439.
- Keith Robertson. **DNA methylation and human disease.** Nature. 2005.6:507-610.
- Kristina Subik. **The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.** Cence. 2006. 311:395-8.
- Kristina Subik. **TRDMT1 tRNA aspartic acid methyltransferase 1 (Homo sapiens).** Entrez Gene.2010.11:-1123-1134.
- Kulis M and Esteller M. **DNA methylation and cancer.** Adv Genet. 2010.70:27-56.
- Lazcano P, Tovar G, Alonso R, Romieu I y López C. **Cáncer de mama. Un hilo conductor histórico, presente y futuro.** Instituto Nacional de Salud Pública, México. 1996. 38:139-152.
- Lee W, Shim J and Zhu B. **Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids.** Mol Pharmacol. 2005. 68:1018–1030.
- Li X, Lewis M, Huang J, Gutierrez C and Osborne C. **Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy.** J Natl Cancer Inst. 2008. 100: 672–679.
- Lippi D. **Chocolate in health and disease.** Maturitas.2010.67:195-196.
- Loss L, Anguraj S, Steffen D, Shivani N, Diane F, Victoria E, Martin M, Yontao L, Joe W and Bahram P. **Prediction of epigenetically regulated genes in breast cancer cell lines.** BMC Bioinformatics. 2010. 11:305-311.
- Loss L, Sadanandam A, Durinck S, Nautiyal S, Flaucher D, Carlton V, Moorhead M and Lu Y. **Prediction of Epigenetically Regulated Genes in Breast Cancer Cell Lines.** BMC Bioinformatics. 2010. 11:305-325.
- Loudon JA. **Cancer: a novel "no-nonsense" approach to treatment.** Oncol Cancer. 2010.19:55-66.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C and Jimenez L.

Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr.2004. 79:727-747.

- Michael B, Kischkel F and Hoheisel D. **High-Definition DNA Methylation Profiles from Breast and Ovarian Carcinoma Cell Lines with Differing Doxorubicin Resistance.** PLoS One. 2010. 5: 66-76.
- Morgan H, Santos F, Green K and Dean W. **Epigenetic reprogramming in mammals.** Hum Mol Genet. 2005.15;14-23.
- Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay.** J. Immunol. Methods 1993. 65: 55-63.
- Okpanyi V, Schneider D, Zahn S, Sievers S, Calaminus G, Nicholson J, Palmer R, Leuschner I, Borkhardt A and Schönberger S. **Analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in childhood and adolescent germ cell tumors.** Pediatr Blood Cancer. 2011. 56:384-391.
- Ostrow K, Park H, Hoque M, Kim M, Liu J, Argani P, Westra W, Van C and Sidransky D. **Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced genes in breast cancer.** Clin Cancer Res. 2009.15:1184-1191.
- Pandey M and Bhooshan K. **Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2009. 2: 270-278.
- Pandey M, Shukla S and Gupta S. **Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate.** Cancer Cells.2010. 126:2520–2533.
- Piccart G, Procter M and Leyland J. **Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.** N Engl J Med 2005. 353:1659-1672.
- Piwen W, Susanne M and David H. **Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of**

Green Tea Polyphenols. 2008. 23;234-245.

- Po L and Chun C. **Green Tea Constituent (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits Hep G2 Cell Proliferation and Induces Apoptosis through p53-Dependent and Fas-Mediated Pathways.** Biomedical Science. Biomed Sci. 2003.10:219-227.
- Ptak C and Petronis A. **Epigenetics and Complex Disease: From Etiology to New Therapeutics.** Ann Rev of Pharmacology and Toxicology. 2008. 48: 257-276.
- Ptak C and Petronis A. **Epigenetics and Complex Disease: From Etiology to New Therapeutics.** Ann Rev of Pharmacology and Toxicology. 2008. 48: 257-276.
- Ravdin P, Cronin K, Howlander N, Berg C, Chlebowski R and Feuer E. **The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States.** New England Journal of Medicine. 2007. 356:1670-1674.
- Reddy A, Jiang W, Kim M, Benoit N and Taylor R. **Death-associated protein kinase promoter hypermethylation in normal human lymphocytes.** Cancer Res. 2003. 15:7694-7688.
- Rice E, Miller N and Paganga G. **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** Free Radic Biol Med. 1996. 20:933-956.
- Rinaldo D, Batista J, Rodrigues J, Benfatti A, Rodrigues C, Dos Santos L, Furlan M and Villegas W. **Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD.** Chirality. 2010.22:726-733.
- Romond E, Perez E and Bryant J. **Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.** N Engl J Med 2005. 353:1673-1684.
- Ross J and Kasum C. **Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety.** Annu Rev Nutr 2002. 22:19-34.
- Sánchez C, Sánchez E and Gerson R. **Tratado de las enfermedades de la glándula mamaria.** 2008.159-166.

- Schroeder P, Klotz L and Sies H. **Amphiphilic properties of γ -epicatechin and their significance for protection of cells against peroxynitrite.** Biochem Biophys Res Commun. 2003.307:69-73.
- Secretaría de Salud, Compendio de cáncer. **Registro histopatológico de neoplasias malignas.** 2002.
- Shikhar S, Theresa K and Peter A. Jones. **Epigenetics in cancer.** Carcinogenesis. 2010. 31:27-36.
- Shimizu M, Shirakami Y and Moriwaki H. **Targeting Receptor Tyrosine Kinases for Chemoprevention by Green Tea Catechin, EGCG.** Int. J. Mol. Sci. 2008. 9:1034-1049.
- Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, and Lyko F. **Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines.** Cancer Res. 2006. 66: 2794-2800.
- Syed M, Amiya A and Tollefsbol T. **Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy.** Clin Epigenetics. 2010. 1: 101-116.
- Syed M, Meeran M, Amiya A and Tollefsbol T. **Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy.** Clin Epigenetics. 2010. 1:101–116.
- Van A, Van L, Van D and Dirix L. **Aberrant methylation of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene promoter is associated with the inflammatory breast cancer phenotype.** British Journal of Cancer. 2008 99:1735–1742.
- Van V, Oates N and Whitelaw E. **Epigenetic Mechanisms in the Context of complex Diseases.** Cell Mol Life. 2007. 64:1531-1538.
- Van V, Oates N and Whitelaw E. **Epigenetic Mechanisms in the Context of complex Diseases.** Cell Mol Life. 2007. 64:1531-1538.
- Vasyly' F, Nataliya Y and Olga K. **Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets.** Mol Cancer. 2007.6:1089-1098.

- Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Giuseppe V. **Breast Cancer**. The Lancet. 2005. 365:1727-1741.
- Vogelstein B and Kinzler W. **The multistep nature of cancer**. Trends in Genetics. 1993.11:138-141.
- Watanabe Y and Maekawa M. **Methylation of DNA in cancer**. Adv Clin Chem. 2010.52:145-167.
- Wittemer S, Ploch M and Windeck T. **Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of artichoke leaf extracts in humans**. Phytomedicine. 2005. 2:28-38.
- Wolfgang A, Schulz V and Olusola Y. **DNA Methylation and Human Diseases: An Overview**. 2009.123:234-245.
- Xu X. **Gene promoter methylation is associated with increased mortality among women with breast cancer**. PLoS One.2010. 20;212-223.
- Yen Z, Zyni C and Meyer I. **A cross-species comparison of X-chromosome inactivation in Eutheria** Trends Genet. 2007. 23:440-448.
- Yi Chuan. **DNA methyltransferases: classification, functions and research progress**. Biochemistry.2009. 31:903-12.
- Youdim K, Qaiser M, Begley D, Rice E and Abbott N. **Flavonoid permeability across an in situ model of the blood–brain barrier**. Free Radical Biology and Medicine. 2004. 36:592-604.