



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TIMIDILATO*
SINTASE, *METILENO-TETRAHIDROFOLATO REDUTASE* E *METIONINA*
SINTASE EM TUMORES DA MAMA**

**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES *TIMIDILATO*
SINTASA, *METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA* Y *METIONINA*
SINTASA EN TUMORES DE MAMA**

MIGUEL ÁNGEL CÁCERES DURÁN

**BELÉM – PA
2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

- C118a Cáceres Durán, Miguel Ángel.
Avaliação de Polimorfismos dos Genes Timidilato Sintase, Metileno-Tetrahydrofolato Redutase e Metionina Sintase em Tumores da Mama / Miguel Ángel Cáceres Durán, . — 2019.
96 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.
1. câncer de mama. 2. timidilato sintase. 3. metileno-tetrahydrofolato redutase. 4. metionina sintase. 5. polimorfismo. I. Título.

CDD 571.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

MIGUEL ÁNGEL CÁCERES DURÁN

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TIMIDILATO*
SINTASE, *METILENO-TETRAHIDROFOLATO REDUTASE* E *METIONINA SINTASE*
EM TUMORES DA MAMA**

**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES *TIMIDILATO*
SINTASA, *METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA* Y *METIONINA SINTASA*
EN TUMORES DE MAMA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges (UFPA)

BELÉM - PA
Fevereiro, 2019

MIGUEL ÁNGEL CÁCERES DURÁN

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *TIMIDILATO*
SINTASE, *METILENO-TETRAHIDROFOLATO REDUTASE* E *METIONINA SINTASE*
EM TUMORES DA MAMA**

**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES *TIMIDILATO*
SINTASA, *METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA* Y *METIONINA SINTASA*
EN TUMORES DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Neurociências e Biologia Celular**.

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Matos Carvalho
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Profa. Dra. Maria Lúcia Harada
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

BELÉM - PA
Fevereiro, 2019

A todos los venezolanos en el exilio.

AGRADECIMIENTOS

Aprovecho este espacio para agradecer a todos aquellos que de alguna u otra manera contribuyeron al desarrollo y término de este trabajo.

A mi orientadora, Profa. Bárbara Borges, por abrirme las puertas del laboratorio, sin siquiera conocerme, y permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones, por sus enseñanzas, ayuda y consejos cada vez que los necesité.

A mis padres, Miguel Cáceres y Yurancy Durán, por todo su apoyo incondicional, no solo durante el transcurso de este programa, sino a lo largo de toda mi vida. Mi agradecimiento y amor infinito hacia ustedes.

A mi familia, hermanos, tíos y primos por su cariño y palabras de aliento cada vez que lo necesité.

A Alberto Urquiola, por ser mi compañía, tanto presencial como en la distancia, durante todo este recorrido, por toda su ayuda, aliento y palabras y, sobre todo, por confiar plenamente en mí.

A Fernanda Rodríguez, por su amistad incondicional, por su apoyo, compañía, consejos y por todos los gratos momentos vividos durante este tiempo.

A Yetsenia Sánchez, mi gran amiga desde hace años. La vida nos volvió a reunir para afianzar más nuestros lazos.

A Cristian Neira, por sus palabras, apoyo y consejos durante este tiempo.

A Melquizedec Pinheiro, por ser ese amigo incondicional que me dio este país, por todo su apoyo y ayuda cuando lo precisé.

A Raphael Ramos y familia, por su amistad y ayuda durante este tiempo.

A la banca examinadora, Profs. Carlos Eduardo Matos y Maria Lúcia Harada, por sus aportes a este trabajo.

A la Profa. Iracilda Sampaio, por ser esa mano amiga con la cual siempre contar en cada momento.

A mis amigos de la gran comunidad latina de la OEA-PAEC, por todos los momentos vividos.

A mis compañeros de laboratorio, Mariana, Anna, Francisco, Raissa y todos los demás, por los momentos gratos que pasé con ellos.

A la Organización de los Estados Americanos (OEA) y al grupo Coimbra de universidades brasileñas, por haberme elegido para la realización de este programa de posgrado.

A la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), especialmente a la Dirección de Formación de Personal Académico (D.F.P.A.) y a la Sección de Anatomía Microscópica del Departamento de Ciencias Morfológicas del Decanato de Ciencias de la Salud, por todo su apoyo para mi formación académica.

Al programa de posgrado en Neurociencias y Biología Celular, por todo lo aprendido en él.

A la Universidad Federal de Pará (UFPA) por haberme permitido el honor de pertenecer a ella.

A Belém do Pará y a Brasil, por ser mi hogar durante este tiempo. Ha sido una experiencia que jamás olvidaré.

Y, por supuesto, a mi país, Venezuela, por darme las fuerzas para seguir luchando por un mejor futuro. La esperanza es lo último que se pierde.

Obrigado!

*Llevo tu luz y tu aroma en mi piel
y el cuatro en el corazón,
llevo en mi sangre la espuma del mar
y tu horizonte en mis ojos...*

(Venezuela - Pablo Herrero)

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	xv
RESUMEN	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	20
1.1. Cáncer.....	20
1.2. Cáncer de mama.....	22
1.2.1. Estadísticas del cáncer de mama.....	23
1.3. Gen <i>timidilato sintasa (TYMS)</i> y enzima timidilato sintasa (TS).....	25
1.3.1. Polimorfismos del gen <i>TYMS</i>	28
1.3.2. Polimorfismo T _{SER} (rs34743033).....	28
1.3.3. Polimorfismo <i>1494del6</i> (rs34489327).....	31
1.3.4. Otros polimorfismos del gen <i>TYMS</i>	31
1.4. Gen y enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR).....	33
1.4.1. Polimorfismos del gen <i>MTHFR</i>	34
1.4.2. Polimorfismo C677T (rs1801133).....	35
1.4.3. Polimorfismo A1298C (rs1801131).....	36
1.5. Gen y enzima metionina sintasa (MTR).....	37
1.5.1. Polimorfismo A2756G (rs1805087).....	38
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo general.....	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. JUSTIFICACIÓN	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS	42
4.1. Muestras.....	42
4.2. Extracción de DNA.....	43
4.3. Cuantificación de DNA.....	43
4.4. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	43
4.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	45
4.6. Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida.....	46

4.7. Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).....	46
4.7.1. RFLP para el polimorfismo C677T.....	46
4.8. Secuenciamiento automático.....	47
4.9. Análisis estadístico.....	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Muestras.....	49
5.2. Polimorfismo TSER.....	51
5.2.1. Sistema de PCR 5'-UTR del gen <i>TYMS</i>	51
5.2.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo TSER.....	51
5.2.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TSER del gen <i>TYMS</i>	51
5.3. Polimorfismo <i>1494del6</i>	53
5.3.1. Sistema de PCR 3'-UTR del gen <i>TYMS</i>	53
5.3.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo <i>1494del6</i>	53
5.3.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo <i>1494del6</i> del gen <i>TYMS</i>	53
5.4. Polimorfismo C677T.....	54
5.4.1. Sistema de PCR C677T del gen <i>MTHFR</i>	54
5.4.2. RFLP para el polimorfismo C677T.....	55
5.4.3. Secuenciamiento automático del polimorfismo C677T	55
5.4.4 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen <i>MTHFR</i>	56
5.5. Polimorfismo A1298C.....	57
5.5.1. Sistema de PCR A1298C del gen <i>MTHFR</i>	57
5.5.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo A1298C del gen <i>MTHFR</i>	57
5.5.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A1298C del gen <i>MTHFR</i> ...	58
5.6. Polimorfismo A2756G.....	59
5.6.1. Sistema de PCR A2756G del gen <i>MTR</i>	59
5.6.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo A2756G.....	59
5.6.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A2756G del gen <i>MTR</i>	59
5.7. Análisis estadístico.....	61
5.7.1 Distribución de los genotipos en los grupos evaluados.....	61
5.7.2. Asociación entre los genotipos encontrados y las características de las muestras de pacientes.....	64

5.7.3. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas y la clasificación molecular del tumor..... 65

5.7.4. Combinación de genotipos en los genes *TYMS* y *MTHFR*..... 66

6. DISCUSIÓN..... 68

7. CONCLUSIONES.....83

8. REFERENCIAS..... 84

9. ANEXOS..... 92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Los marcadores del cáncer.....	21
Figura 2. Descripción general del metabolismo del folato.....	25
Figura 3. Localización cromosómica del gen <i>TYMS</i>	26
Figura 4. Polimorfismos del gen <i>TYMS</i>	28
Figura 5. Estructura de la región TSER del gen <i>TYMS</i>	29
Figura 6. Estructura de las repeticiones en tándem en la región 5'-UTR del gen <i>TYMS</i> humano.....	30
Figura 7. Localización cromosómica del gen <i>MTHFR</i>	34
Figura 8. Vista general del metabolismo de un Carbono.....	34
Figura 9. Localización cromosómica del gen <i>MTR</i>	37
Figura 10. Reacción catalizada por MTR.....	37
Figura 11. Electroferograma del genotipo 2R/2R del polimorfismo TSER de <i>TYMS</i>	51
Figura 12. Electroferograma del genotipo 3R/3R del polimorfismo TSER de <i>TYMS</i>	51
Figura 13. Electroferograma del genotipo +6/+6 del polimorfismo <i>1494del6</i> de <i>TYM</i>	53
Figura 14. Electroferograma del genotipo -6/-6 del polimorfismo <i>1494del6</i> de <i>TYMS</i>	53
Figura 15. Electroferograma del genotipo 677CC de <i>MTHFR</i>	55
Figura 16. Electroferograma del genotipo 677CT de <i>MTHFR</i>	55
Figura 17. Electroferograma del genotipo 677TT de <i>MTHFR</i>	55
Figura 18. Electroferograma del genotipo 1298AA de <i>MTHFR</i>	57
Figura 19. Electroferograma del genotipo 1298AC de <i>MTHFR</i>	57
Figura 20. Electroferograma del genotipo 1298CC de <i>MTHFR</i>	57
Figura 21. Electroferograma del genotipo 2756AA de <i>MTR</i>	59
Figura 22. Electroferograma del genotipo 2756AG de <i>MTR</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Genotipos de baja y alta expresión de <i>TYMS</i>	32
Tabla 2. Oligonucleótidos iniciadores usados.....	44
Tabla 3. Componentes de reacción y condiciones de los sistemas de PCR.....	45
Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión de los amplificados del polimorfismo C677T del gen <i>MTHFR</i>	47
Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para secuenciamiento automático.....	47
Tabla 6. Características de las muestras analizadas.....	49
Tabla 7. Número de muestras analizadas para cada polimorfismo.....	50
Tabla 8. Clasificación molecular del tumor en el grupo de pacientes.....	50
Tabla 9. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo TSER del gen <i>TYMS</i>	52
Tabla 10. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo <i>1494del6</i> del gen <i>TYMS</i>	54
Tabla 11. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo C677T del gen <i>MTHFR</i>	56
Tabla 12. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo A1298C del gen <i>MTHFR</i>	58
Tabla 13. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo A2756G del gen <i>MTR</i>	60
Tabla 14. Distribución de los genotipos de los diferentes polimorfismos en los grupos evaluados.....	62
Tabla 15. Asociación de los genotipos y alelos entre los grupos evaluados.....	63
Tabla 16. Asociación entre los genotipos encontrados y las características de las muestras de pacientes.....	64
Tabla 17. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas y la clasificación molecular del tumor.....	65
Tabla 18. Combinación de genotipos en <i>TYMS</i> y <i>MTHFR</i>	66
Tabla 19. Distribución del polimorfismo TSER de <i>TYMS</i> en diferentes poblaciones.....	72
Tabla 20. Distribución del polimorfismo <i>1494del6</i> de <i>TYMS</i> en diferentes poblaciones.....	74
Tabla 21. Distribución del polimorfismo C677T de <i>MTHFR</i> en diferentes poblaciones.....	75
Tabla 22. Distribución del polimorfismo A1298C de <i>MTHFR</i> en diferentes poblaciones.....	76
Tabla 23. Distribución del polimorfismo A2756G de <i>MTR</i> en diferentes poblaciones.....	78

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo T5ER del gen <i>TYMS</i>	52
Gráfico 2. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo <i>1494del6</i> del gen <i>TYMS</i>	54
Gráfico 3. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo C677T del gen <i>MTHFR</i>	56
Gráfico 4. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo A1298C del gen <i>MTHFR</i>	58
Gráfico 5. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo A2756G del gen <i>MTR</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

°C	Grados Centígrados
µl	microlitro
5-FU	5-fluorouracilo
aa	Aminoácido (s)
CM	Cáncer de mama
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
ER	Receptor de estrógeno
IMC	Índice de masa corporal
INCA	Instituto Nacional de Cáncer (Brasil)
mA	Miliamperios
ml	Mililitro
mM	milimolar
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTR	Metionina sintasa
NCI	Instituto Nacional de Cáncer (Estados Unidos)
ng	Nanogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud

OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de base
PGR	Receptor de progesterona
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pmol	Picomoles
RFLP	Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
SNP	Polimorfismo de Simple Nucleótido
TS	Timidilato sintasa (enzima)
TYMS	Timidilato sintasa (gen)
U	Unidades de enzima
UTR	Región no traducida
V	Voltios
W	Vatios

RESUMEN

El cáncer de mama (CM) es el cáncer más común entre las mujeres del mundo y Brasil, después del cáncer de piel no melanoma. Se han asociado polimorfismos en genes involucrados en la vía de los folatos como factores en la etiología de esta enfermedad. *Timidilato sintasa (TYMS)* codifica para la timidilato sintasa, responsable de la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) en desoxitimidina monofosfato (dTMP). *TYMS* tiene una repetición en tándem polimórfica en la región 5'-UTR (TSER), que contiene, generalmente, una triple (3R) o doble (2R) repetición de una secuencia de 28 pb. Se piensa que las variantes de TSER sean funcionalmente relevantes y estén asociadas al riesgo de CM. Otro polimorfismo en *TYMS* es el *1494del6* que consiste en la variación de una secuencia de 6 pb (TTAAAG) en la posición 1494 de la región 3'-UTR. Estas variantes alélicas están estrechamente relacionadas con el nivel de expresión de la enzima. *Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)* codifica para la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa, que regula el equilibrio entre la metilación celular y la síntesis de ácidos nucleicos, proporcionando grupos metilo para la conversión de homocisteína en metionina. Dentro de los polimorfismos de *MTHFR*, los SNPs C677T y A1298C generan una actividad enzimática reducida, afectando la síntesis de ácidos nucleicos y la disponibilidad de grupos metilo para procesos bioquímicos, lo que podría aumentar el riesgo de CM. *Metionina sintasa (MTR)* codifica para la metionina sintasa, que cataliza la remetilación de homocisteína a metionina, aminoácido esencial y precursor de la S-adenosilmetionina, que es un donante universal de grupos metilo involucrado en reacciones de metilación, incluida la metilación del ADN. El papel que tiene este polimorfismo en el riesgo de cáncer aún es controversial. El objetivo de este estudio fue determinar si los polimorfismos de los genes *TYMS*, *MTHFR* y *MTR* aumentan el riesgo de desarrollar CM. Para ello se trabajó con 61 muestras de pacientes y 35 controles, a las cuales se les realizó la extracción y purificación de DNA, la amplificación por PCR de fragmentos de DNA que incluyen los polimorfismos y su posterior análisis directamente a través de la visualización en gel, por PCR-RFLP y/o por secuenciamiento automático. Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas y se relacionaron con las características clínicas de las pacientes y el tipo molecular del tumor. Se realizó un análisis de significancia estadística para evaluar las asociaciones de todos los polimorfismos en estudio con el riesgo de desarrollar CM y las características clínicas de las pacientes. Se encontró que el alelo 3R de TSER y los alelos T y C de C677T y A1298C podrían estar asociados al CM, aunque sin significancia estadística, y que los polimorfismos TSER y *1494del6* de *TYMS* podrían estar relacionados con el riesgo de desarrollar tumores de mama más agresivos, aunque la asociación no sea estadísticamente significativa.

Palabras clave: cáncer de mama, timidilato sintasa, metilentetrahidrofolato reductasa, metionina sintasa, polimorfismo.

RESUMO

O câncer de mama (CM) é tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele não melanoma. Polimorfismos genéticos em genes da via do folato têm sido associados como fatores na etiologia desta doença. *Timidilato sintase (TYMS)* codifica a timidilato sintase, responsável pela conversão de desoxiuridina monofosfato (dUMP) em desoxitimidina monofosfato (dTMP). *TYMS* tem uma repetição em tandem polimórfica na região 5'-UTR (TSER) que contém, geralmente, uma tripla (3R) ou dupla (2R) repetição de uma sequência de 28 pb. Acredita-se que as variantes do TSER sejam funcionalmente relevantes e estejam hipoteticamente associadas ao risco de CM. Outro polimorfismo em *TYMS* é *1494del6*, uma variação de uma sequência de 6 pb (TTAAAG) na posição 1494 da região 3'-UTR. Estas variantes alélicas estão intimamente relacionadas com o nível de expressão da enzima. *Metileno-tetrahidrofolato redutase* codifica a 5,10-metileno-tetrahidrofolato redutase que regula o equilíbrio entre a metilação celular e a síntese de ácidos nucléicos, fornecendo grupos metil para a conversão de homocisteína em metionina. Entre os polimorfismos de *MTHFR* estão os SNPs C677T e A1298C que geram uma atividade enzimática reduzida que afeta a síntese dos ácidos nucleicos e a disponibilidade de grupos metil para processos bioquímicos, que podem aumentar o risco de CM. *Metionina sintase* codifica a metionina sintase, que catalisa a remetilação de homocisteína a metionina, um aminoácido precursor essencial da S-adenosilmetionina, que é um doador de metilo universal envolvido em reações de metilação, incluindo a metilação de DNA. O papel desse polimorfismo no risco de câncer ainda é controverso. O objetivo deste estudo foi determinar se os polimorfismos dos genes *TYMS*, *MTHFR* e *MTR* aumentam o risco de desenvolver CM. Para isso, foram utilizadas 61 amostras de pacientes e 35 de controles para as quais foi realizada a extração e purificação do DNA, a amplificação por PCR dos fragmentos contendo os polimorfismos e sua posterior análise diretamente através da visualização em gel, por PCR-RFLP e/ou por sequenciamento automático. Realizou-se uma análise de significância estatística para avaliar as associações de todos os polimorfismos estudados com o risco de desenvolver CM e as características clínicas das pacientes. Verificou-se que o alelo 3R de TSER e os alelos T e C de C677T e A1298C poderiam estar associados ao CM, mas sem significância estatística, e que os polimorfismos TSER e *1494del6* do *TYMS* poderiam estar relacionados ao risco de desenvolver tumores de mama mais agressivos, embora a associação não seja estatisticamente significativa.

Palavras-chave: câncer de mama, *timidilato sintase*, *metileno-tetrahidrofolato redutase*, *metionina sintase*, polimorfismo.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most common cancer among women in the world and Brazil, after non-melanoma skin cancer. Polymorphisms in genes involved in the folate pathway have been associated as possible etiological factors of this disease. *Thymidylate synthase (TYMS)* codes for the thymidylate synthase, responsible for the conversion of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP). *TYMS* has a polymorphic tandem repeat in the 5'-UTR region (TSER), which generally contains a triple (3R) or double (2R) repeat of a 28 bp sequence. It is thought that the TSER variants are functionally relevant and are associated with BC risk. Another polymorphism in *TYMS* is *1494del6* and consists of the variation of a 6 bp sequence (TTAAAG) at position 1494 of the 3'-UTR region. These allelic variants are closely related to the level of expression of the enzyme. *Methylenetetrahydrofolate reductase* codes for the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, which regulates the balance between cell methylation and nucleic acid synthesis, providing methyl groups for the conversion of homocysteine to methionine. Within the polymorphisms of *MTHFR*, the SNPs C677T and A1298C generate a reduced enzymatic activity, affecting the synthesis of nucleic acids and the availability of methyl groups for biochemical processes, which could increase BC risk. *Methionine synthase (MTR)* codes for the methionine synthase, which catalyzes the remethylation of homocysteine to methionine, an essential amino acid and precursor of S-adenosylmethionine, which is a universal donor of methyl groups involved in methylation reactions, including DNA methylation. The role of this polymorphism in cancer risk is still controversial. The aim of this study was to determine if the polymorphisms of the *TYMS*, *MTHFR* and *MTR* genes increase the BC risk. We worked with 61 samples of patients and 35 controls, it was carried out DNA extraction and purification, PCR amplification of DNA fragments including polymorphisms and their subsequent analysis directly through gel visualization, by PCR-RFLP and/or by automatic sequencing. Genotypic and allelic frequencies were determined and were related to the clinical characteristics of the patients and the molecular type of tumor. An analysis of statistical significance was carried out to evaluate the associations of all the polymorphisms with the risk of developing BC and the clinical characteristics of the patients. It was found that 3R allele of TSER and T and C alleles of C677T and A1298C could be associated to BC, although without statistical significance, and TSER and *1494del6* polymorphisms of *TYMS* could be related to the risk of developing more aggressive breast tumors, although the association is not statistically significant.

Keywords: breast cancer, *thymidylate synthase*, *methylenetetrahydrofolate reductase*, *methionine synthase*, polymorphism.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte debida a enfermedades no transmisibles en todo el mundo, y, por consiguiente, es un problema de salud pública importante, tanto en los países desarrollados como en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo (Dornelles et al., 2015).

Según el Instituto Nacional de Cáncer de Brasil (INCA), cáncer es el nombre dado a un conjunto de más de 100 enfermedades que tienen en común el crecimiento desordenado de células que invaden tejidos y órganos. En los últimos 30 años, los científicos han descubierto que el cáncer es una enfermedad genética a nivel de las células somáticas caracterizada por la presencia de productos génicos derivados de genes mutados o expresados anormalmente. El efecto combinado de numerosos productos génicos anormales lleva a un crecimiento descontrolado y a la expansión de las células cancerígenas. Aunque algunos genes mutados pueden ser heredados, la mayoría de mutaciones ocurren en células somáticas que se dividen y forman tumores (Klug et al., 2016; INCA, 2018).

El cáncer es causado por alteraciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de microRNAs (miRNAs). Esas alteraciones usualmente son eventos somáticos, aunque mutaciones en la línea germinal pueden predisponer a una persona a un cáncer heredable o familiar. Un solo cambio genético no es suficiente para el desarrollo de un tumor maligno. La mayoría de las evidencias apuntan que en las células cancerígenas hay un proceso de alteraciones secuenciales a menudo en oncogenes, genes supresores de tumores o genes de microRNA (Croce, 2008).

Los genes supresores de tumores actúan como frenos celulares, codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y previenen la transformación maligna de las células. Por otro lado, los oncogenes codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y la conversión de una célula a su estado maligno. La mayoría de los oncogenes actúa como aceleradores de la proliferación celular, pero también tienen otras funciones. Los oncogenes pueden ocasionar inestabilidad genética, impedir que una célula se vuelva víctima de la apoptosis o promover la metástasis. Los microRNAs son pequeños RNAs endógenos no codificantes que tienen función en la regulación de la expresión génica. Evidencias convincentes han demostrado que la expresión de los miRNAs está desregulada en cáncer humano a través de varios mecanismos,

incluyendo la amplificación o delección de genes de miRNAs, transcripción anormal de miRNAs, cambios epigenéticos y defectos en la maquinaria de biogénesis de miRNAs. Estos pueden funcionar como oncogenes o como genes supresores de tumores bajo ciertas condiciones (Karp; Iwasa; Marshall, 2015; Peng; Croce, 2016).

Hanahan y Weinberg (2000 y 2011) sugieren que el vasto catálogo de genotipos de células cancerosas es una manifestación de diez alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente dictan el crecimiento maligno (Figura 1): autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), evasión del sistema inmune, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida, relocalización del metabolismo celular, inestabilidad genómica y mutaciones, promoción de la inflamación, invasión y metástasis. Cada uno de estos cambios fisiológicos (capacidades nuevas adquiridas durante el desarrollo del tumor) representa la ruptura exitosa de un mecanismo de defensa anticancerígeno conectado a las células y los tejidos. Así, esos marcadores establecidos llevan al éxito evolutivo de una célula tumoral. Ellos proponen que estas diez capacidades son compartidas por la mayoría, y tal vez, por todos los tipos de tumores humanos.



Figura 1. Los marcadores del cáncer. Esta ilustración abarca las capacidades distintivas propuestas originalmente por Hanahan y Weinberg en el 2000 y revisadas en el 2011. La mayoría, si no todos, los cánceres adquieren el mismo conjunto de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de varias estrategias mecanicistas. Traducido de Hanahan y Weinberg, 2011.

1.2. Cáncer de mama

El Cáncer de Mama (CM) es el tipo de cáncer más común entre las mujeres en el mundo y en Brasil, después del cáncer de piel no melanoma, respondiendo cerca de 28% de casos nuevos cada año. El CM también afecta a los hombres, aunque no es común, representando apenas 1% del total de casos de esta enfermedad (INCA, 2018).

A pesar de ser considerado un tumor con buen pronóstico en la mayoría de los casos, si se diagnostica y trata a tiempo, el CM sigue estando asociado con una alta tasa de mortalidad en Brasil. La causa más probable de este hecho es que la enfermedad es aún diagnosticada en etapas avanzadas, y, se identifican múltiples barreras en el acceso al diagnóstico y tratamiento para la mayoría de las mujeres que confían en el sistema público de salud (Dornelles et al., 2015).

El CM es considerado una enfermedad heterogénea con relación a la clínica y a la morfología. En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó los tumores de mama en más de 20 subtipos diferentes. La mayoría de los tumores se originan del epitelio ductal (aproximadamente el 80%), siendo llamados carcinoma ductal invasivo, sin embargo, existen otros tipos de carcinomas que pueden ser diagnosticados como lobular, tubular, mucinoso, medular, papilar o micropapilar, los cuales son menos comunes (Lakani et al., 2012).

Los tumores de mama son considerados multifactoriales, involucrando factores biológicos/endocrinos, de historia reproductiva, de comportamiento/estilo de vida y genéticos/hereditarios. Los factores de riesgo incluyen envejecimiento (>50 años), historia personal de CM, estimulación estrogénica, historia familiar de cáncer de mama, menarquía precoz (<12 años) y menopausia tardía (> 55 años), primer embarazo después de los 30 y nuliparidad, alta densidad de tejido mamario, además de consumo de alcohol, tabaco, exceso de peso, sedentarismo y exposición a radiación ionizante (OMS, 2018).

La clasificación molecular de los tumores de mama se basa en la inmunohistoquímica, que, a través del análisis de algunos marcadores (receptor de estrógeno-ER, receptor de progesterona-PGR, receptor del factor de crecimiento epidérmico 2-rbB-2/HER-2 (proteína que promueve el crecimiento celular), citoqueratinas 14 y 5/6 y antígeno Ki-67), los subdivide en cuatro subtipos moleculares bien caracterizados: luminal A (ER y PGR positivo, proteína Ki-67 humana <14%, grado histológico 1 o 2 y HER2-negativo), luminal B, (HER2-positivo o negativo, ER-positivo,

PGR <10% o negativo, Ki-67 > 14% y alto grado), HER2-positivo no luminal (ER y PGR-negativo y Ki-67 variable) y TNBC o triple negativo (ER, PGR y HER2-negativo). Esta clasificación se basa en los factores clínico-patológicos del CM invasivo temprano. La enfermedad luminal es sensible a la terapia endocrina y generalmente tiene un pronóstico más favorable. Las enfermedades TNBC y HER2-positivas tienen un resultado clínico pobre. Por otro lado, el subtipo luminal A muestra un mejor pronóstico con mayor sensibilidad endocrina y difiere de los tumores luminal B, que son más agresivos con menos sensibilidad endocrina (Untch et al., 2013; Vuong et al., 2014; Karsli-Ceppioglu et al., 2017).

1.2.1. Estadísticas del cáncer de mama

Según la OMS, la incidencia del CM varía mucho en todo el mundo, con tasas normalizadas por edad de hasta 99,4 por 100.000 en América del Norte. Europa oriental, América del Sur, África Austral y Asia Occidental presentan incidencias moderadas, pero en aumento. La incidencia más baja se da en la mayoría de los países africanos, pero también en ellos se observa un incremento de la incidencia de CM. Las tasas de supervivencia del CM varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos. Las bajas tasas de supervivencia observadas en los países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, que hace que un alto porcentaje de mujeres acudan al médico con la enfermedad ya muy avanzada, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento (OMS, 2018).

El Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI) estimó, para el 2017, 124,9 por 100.000 casos de CM en mujeres, y, el número de muertes estimado fue de 21,2 por 100.000 mujeres. Además, aproximadamente, 12,4% de mujeres serán diagnosticadas con CM en algún momento de su vida. Para el año 2019, la *American Cancer Society* (Sociedad Americana del Cáncer) estima que se diagnosticarán alrededor de 268.600 nuevos casos de CM invasivo en mujeres en Estados Unidos, y, alrededor de 62.930 nuevos casos de carcinoma *in situ*, además, alrededor de 41.760 mujeres morirán de cáncer de mama (NCI, 2018; *American Cancer Society*, 2019).

El INCA predice una estimación, en Brasil, de 59.700 nuevos casos de CM para cada año del bienio 2018-2019, con un riesgo estimado de 56,33 casos cada 100.000 mujeres. Sin considerar

los tumores de piel no melanoma, este tipo de cáncer es el primero y más frecuente en las mujeres de las regiones Sur (73,07/100 mil), Sureste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) y Noreste (40,36/100 mil). En la región Norte es el segundo tumor más incidente (19,21/100 mil) (INCA, 2018).

La susceptibilidad a la mayoría de los CM heredados puede atribuirse a mutaciones en la línea germinal de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, los cuales son responsables del 30-40% del CM hereditario (da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012).

La mayoría de los CM son esporádicos, resultantes de mutaciones genéticas, no corregidas, localizadas en células somáticas y sin relación con la mutación de la línea germinal. Los factores de riesgo para el CM esporádico son a menudo hormonales, aunque puede estar relacionado con otros factores de riesgo como fumar, radiación ionizante y agentes genotóxicos (da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012).

Recientemente, se han descrito muchos polimorfismos genéticos como posibles factores etiológicos de la neoplasia, así como un factor importante en la respuesta y el resultado de la quimioterapia, entre ellos se encuentran polimorfismos en los genes implicados en la vía de los folatos.

Existe evidencia que demuestra que el bajo estado de folato puede ser un factor en la carcinogénesis. Hay dos mecanismos por los cuales la deficiencia de folato puede aumentar el riesgo de malignidad: (1) causando hipometilación del DNA y activando protooncogenes; y (2) induciendo la incorporación incorrecta de uracilo durante la síntesis del DNA, lo que lleva a la reparación catastrófica del DNA, ruptura de la cadena de DNA y daño cromosómico (Sharp et al., 2002).

Polimorfismos en genes que codifican enzimas críticas involucradas en el metabolismo de un carbono como metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), metionina sintasa (*MTR*), metionina sintasa reductasa (*MTRR*) y timidilato sintasa (*TS*), juegan un papel importante en el metabolismo de los folatos (Fig. 2), así, esos polimorfismos pueden influenciar el riesgo de cáncer (Suzuki et al., 2008).

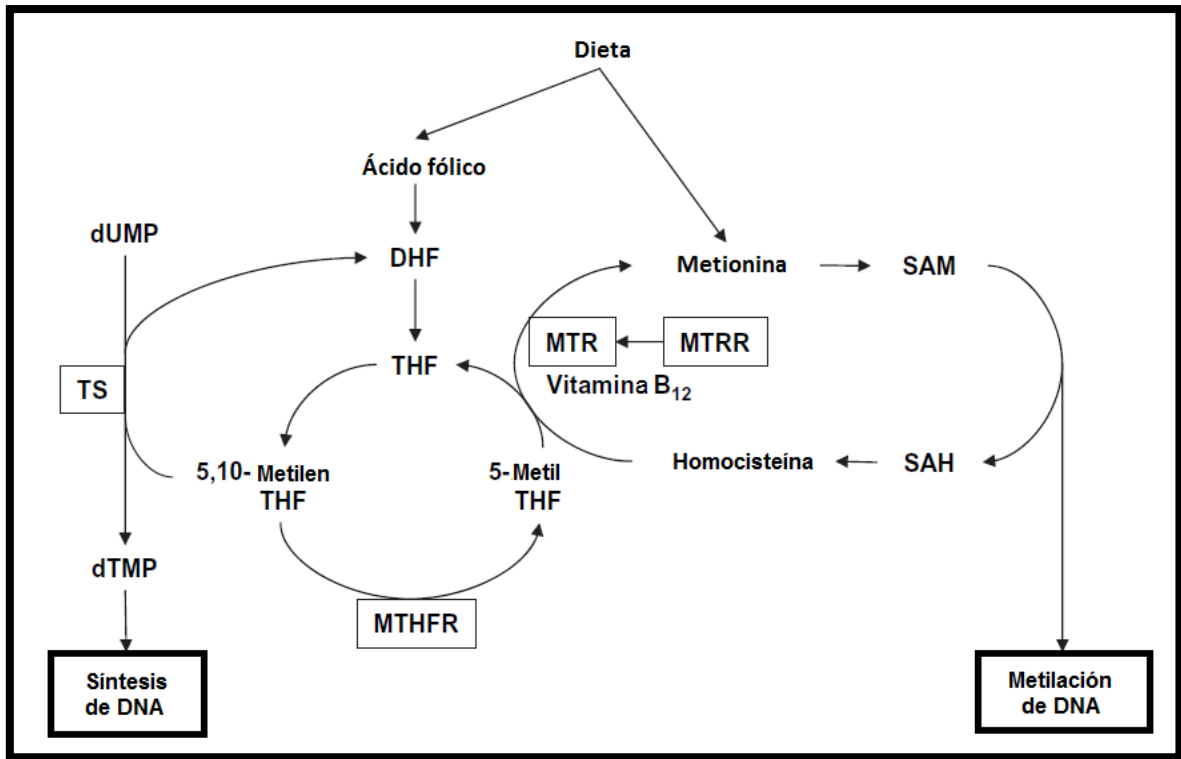


Figura 2. Descripción general del metabolismo del folato. Enzimas con los polimorfismos que han sido estudiados se muestran en cajas: MTHFR: metilentetrahydrofolato reductasa. MTR: metionina sintasa. MTRR: metionina sintasa reductasa. TS: timidilato sintasa. THF: tetrahidrofolato. DHF: dihidrofolato. dUMP: desoxiuridina monofosfato. dTMP: desoxitimidina monofosfato. SAM: S-adenosil metionina. SAH: S-adenosil homocisteína. Traducido de Suzuki et al., 2008.

1.3. Gen timidilato sintasa (*TYMS*) y enzima timidilato sintasa (TS)

El gen timidilato sintasa, *TYMS*, se localiza en el brazo corto del cromosoma 18, en la región 18p11.32 (figura 3) (Hori et al., 1990). La unidad biológicamente activa abarca aproximadamente 16 pares de kilobases (kbp) y está compuesta por siete exones y seis intrones. La región promotora y los principales sitios de inicio transcripcional se localizan dentro de aproximadamente 400 pares de bases (pb) y 160-180 pb, respectivamente, aguas arriba del codón de iniciación ATG. El gen codifica para una enzima llamada también timidilato sintasa (TS). La enzima TS es un homodímero obligado con dos sitios activos, cada uno formado por residuos de ambos monómeros. En cada monómero, hay dos dominios principales: un dominio conservado más grande (residuos 1-98 y

130-313) y un dominio más pequeño y variable (residuos 99-129) (Kaneda, S. et al., 1990; Costi et al., 2005).

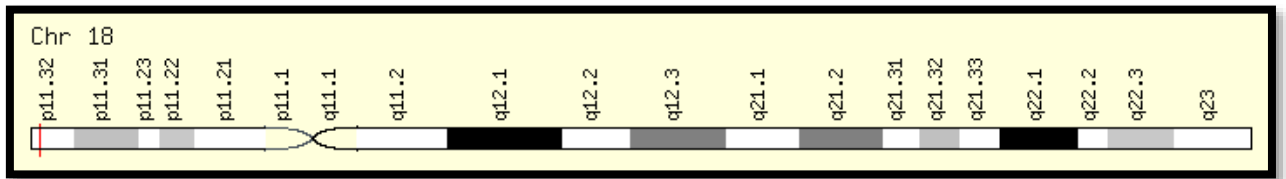


Figura 3. Localización cromosómica del gen *TYMS* (GeneCards Database).

La enzima TS cataliza la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP), usando 5,10-metilentetrahidrofolato como donador de metilo (figura 2). Esta conversión es esencial para la provisión de timina, un nucleótido necesario para la síntesis y reparación del DNA (Henríquez-Hernández et al., 2010).

A través de la vía de los folatos, TS se relaciona con un equilibrio de dNTPs, que es importante en la reparación y replicación del DNA y la proliferación celular. TS funciona como una proteína de unión al RNA y regula su propia expresión, así como también la expresión de otros genes, incluyendo al supresor de tumores *TP53*. La extensión de la expresión de TS puede afectar la carcinogénesis a través de la regulación de la expresión génica, el estado del conjunto de dNTPs necesario para la proliferación de células tumorales y la sensibilidad de fármacos basados en 5-fluorouracilo (5-FU) en pacientes con cáncer (Dong et al., 2010; Sulzyc-Bielicka et al., 2013).

Las características estructurales del gen *TYMS* son únicas en comparación con muchos otros genes, especialmente en el extremo 5' no traducible (5'-UTR), zona reconocida como la "región promotora del gen *TYMS*", allí es donde se encuentran los elementos esenciales que participan en la regulación de su expresión, proceso que, a su vez, esta modulado por varios polimorfismos cuya presencia o ausencia repercuten directamente sobre la tasa de transcripción y traducción de TS, y, cuyas variantes se han vinculado a la eficacia terapéutica de diversos fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer (Villafranca et al., 2001; Edler et al., 2002; Kawakami; Watanabe 2003; Marsh, 2005; Lurje et al., 2009; Hu et al., 2012).

La región promotora de *TYMS* no posee caja TATA ni caja CAAT, las cuales son encontradas en las posiciones -30 y -80, respectivamente, aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción en muchos genes eucariotas. En vez de eso, *TYMS* posee regiones ricas en islas CpG, las cuales son asociadas con regiones promotoras de genes *housekeeping* (Kaneda et al., 1990). También, a lo largo de la región 5'-UTR existen otros elementos menos comunes, pero esenciales para la actividad potenciadora del mismo. Algunos de estos elementos tienen implicación sobre la tasa de transcripción, otros, a su vez, pueden tener repercusión tanto en la tasa de transcripción del gen, como en la traducción. 1) La secuencia consenso GAGGCGGA, reconocida por ser motivo de unión de factores de transcripción de tipo Sp1, los cuales tienen como función promover la expresión génica. 2) La “caja CACCC”, esta secuencia reguladora se encuentra en un gran número de genes, y en un amplio espectro de especies, incluidas las plantas, donde actúa potenciando la transcripción; en humanos se encuentra ubicada a 70 pb aguas arriba del motivo de unión a Sp1, y ha sido ampliamente estudiada en los genes de la beta globina debido a que son sitios de unión de factores de transcripción del tipo EKLF (*Erythroid Kruppel-Like Factor*), los cuales son necesarios para la expresión de estos genes en etapas específicas (Li et al., 2006). 3) Repeticiones en tándem de 28pb, estas últimas consisten en secuencias de 28 pb repetidas en tándem que actúan como un elemento *cis* activador puesto que a lo largo de las mismas existen motivos de unión de factores de transcripción que actúan como un potenciador (*enhancer*) y tienen como función aumentar la señal de transcripción (Kaneda et al., 1990; Horie y Takeishi, 1997; Mandola et al., 2003; Lurje et al., 2009).

Los tres elementos principales del promotor actúan en conjunto para mantener su actividad y son esenciales para modular la expresión de *TYMS* en distintos niveles, por ejemplo, el motivo de unión Sp1 (GAGGCGGA) es considerado como la secuencia central del promotor cuya función, al igual que la caja CACCC es mantener la actividad a nivel transcripcional, lo que genera un efecto positivo sobre la tasa de expresión de TS. Cabe destacar que entre ambas regiones y en una región aguas arriba de la caja CACCC se identifican secuencias reguladoras que, por el contrario, tienen una función negativa sobre la expresión del gen (Horie;Takeishi, 1997).

1.3.1. Polimorfismos del gen *TYMS*

El gen *TYMS* tiene polimorfismos interesantes en las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3', en las que se encuentran elementos reguladores únicos (figura 4). Tres polimorfismos en esas regiones han demostrado tener influencia en la expresión del gen. La sobre expresión de *TYMS* ha sido relacionada a una pobre prognosis de CM, cáncer gástrico y colorrectal. La causa de la variabilidad en la expresión de *TYMS* aún no está clara, sin embargo, se ha sugerido que esos polimorfismos tienen un impacto en la eficacia de tratamiento de quimioterapia (Marsh, 2005).

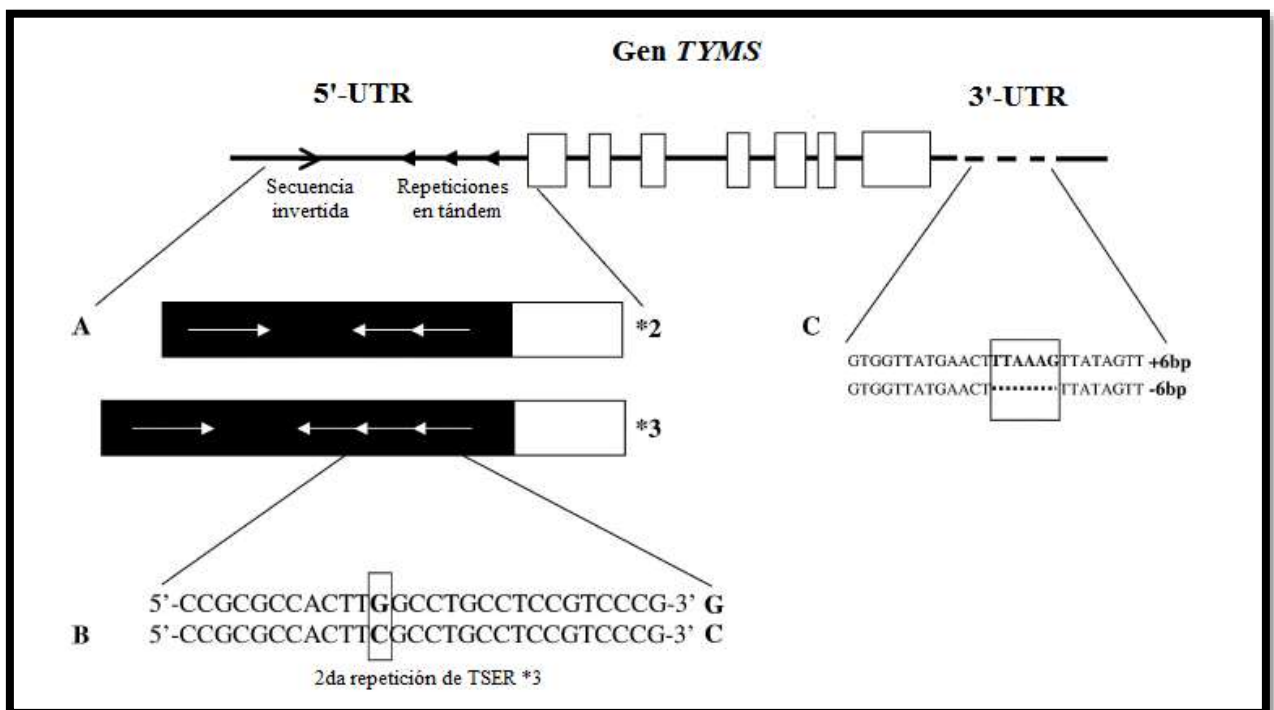


Figura 4. Polimorfismos del gen *TYMS*. (A) TSER, (B) 3RG>C, (C) 1494del6 (Marsh, 2005).

1.3.2. Polimorfismo TSER (rs34743033)

Se ha identificado una repetición en tándem polimórfica en la región potenciadora (TSER) la cual contiene una triple (3R) o una doble (2R) repetición de una secuencia de 28 pb, también hay alelos que raramente contienen cuatro, cinco, seis o nueve repeticiones. Estas variantes de la región TSER del gen *TYMS* despiertan la curiosidad sobre su origen evolutivo, así como sobre su actividad y papel en la expresión del gen. Se cree que las variantes TSER son funcionalmente

relevantes y están hipotéticamente asociadas con el riesgo de CM, así como un factor genético importante en la respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU (Dong et al., 2010; Henríquez-Hernández et al., 2010).

Se ha demostrado que las repeticiones en tándem polimórficas de 28 pb descubiertas en 5'-UTR de la región potenciadora de *TYMS* influyen en la expresión génica. En condiciones normales, TS, en su otra función como proteína de unión al RNA, puede unirse a la estructura del tallo-bucle en 5'-UTR de su propio mRNA para inhibir la traducción de proteínas; sin embargo, la presencia de repeticiones en tándem adicionales altera la secundaria estructura del tallo-bucle al acercar la región promotora al sitio de iniciación, lo que impide la inhibición de retroalimentación adecuada y conduce a niveles de expresión aumentados de enzima activa (Figura 5) (Gibson, 2006).

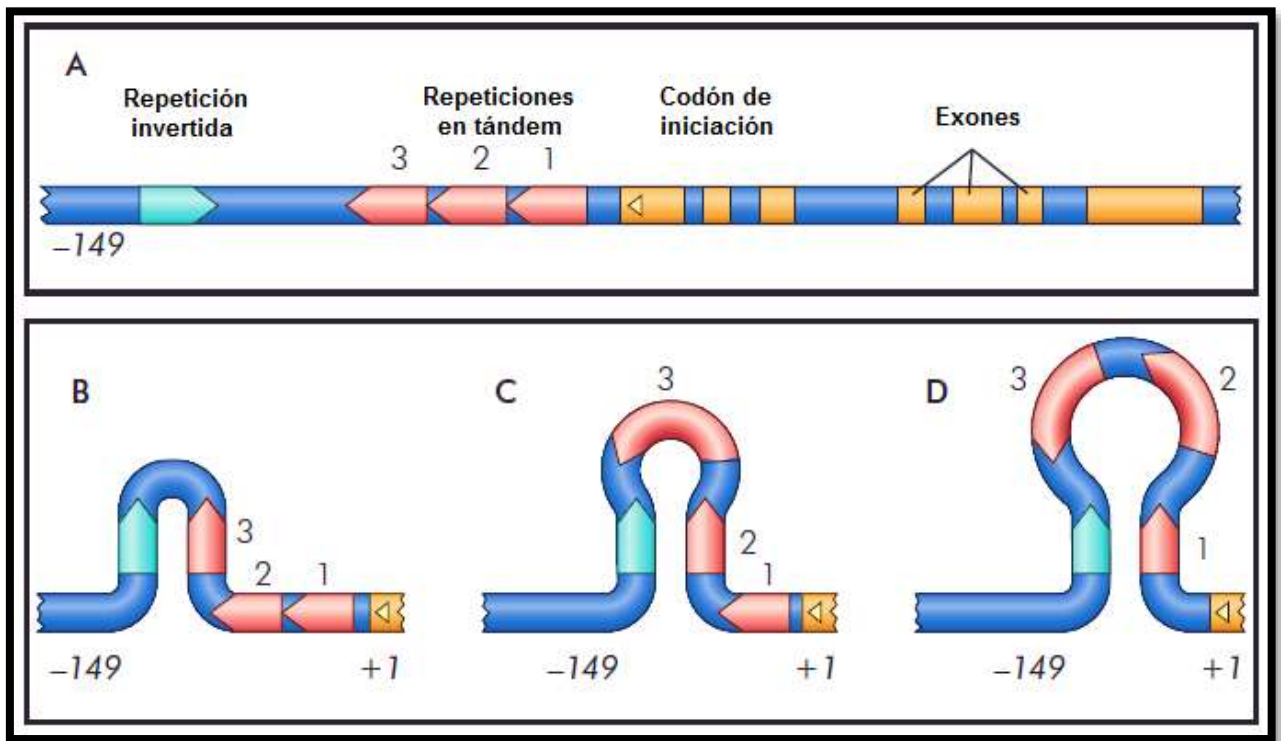


Figura 5. Estructura de la región TSER del gen *TYMS*. A) Región limitante 5'-UTR del mRNA de *TYMS*, elementos próximos al codón de iniciación. B-D) Formación de estructuras de tallo-bucle en la región limitante 5'-UTR del mRNA de *TYMS*. Traducido de Gibson, 2006.

Estudios de expresión *in vitro* han demostrado que la presencia de tres repeticiones en tándem (3R) da como resultado un aumento de 2,6 veces en la expresión de mRNA en comparación

con dos repeticiones en tándem (2R). Un análisis retrospectivo en 52 pacientes con cáncer colorrectal metastásico detectó un aumento de 3,6 veces en los niveles de mRNA de *TYMS* en individuos homocigotos para 3R versus 2R y un aumento de 2,1 veces para aquellos que fueron heterocigotos para 2R/3R versus homocigotos para 2R. Por tanto, las repeticiones en tándem 3R confieren una mayor estabilidad del mRNA y eficacia traduccional en comparación con las repeticiones dobles en tándem 2R (Gibson, 2006; Dong et al., 2010).

Sin embargo, las secuencias de 28 pb repetidas en tándem de la región 5'-UTR de *TYMS* no son idénticas. Mandola et al. (2003) demostraron que hay dos cambios básicos únicos en la última repetición de 28 pb de los genotipos 2R y 3R, además que estas diferencias de secuencia también existen en las últimas repeticiones de los alelos 4R y 5R. Las consecuencias de estos cambios de base en la expresión del gen *TYMS*, así como la frecuencia de estos cambios de base, no se han examinado. Estos autores verificaron la presencia de los dos cambios de bases en las últimas repeticiones de 2R y 3R, e identificaron un nuevo y potencial polimorfismo de simple nucleótido (SNP) dentro de la segunda repetición de 3R (figura 6, asteriscos).

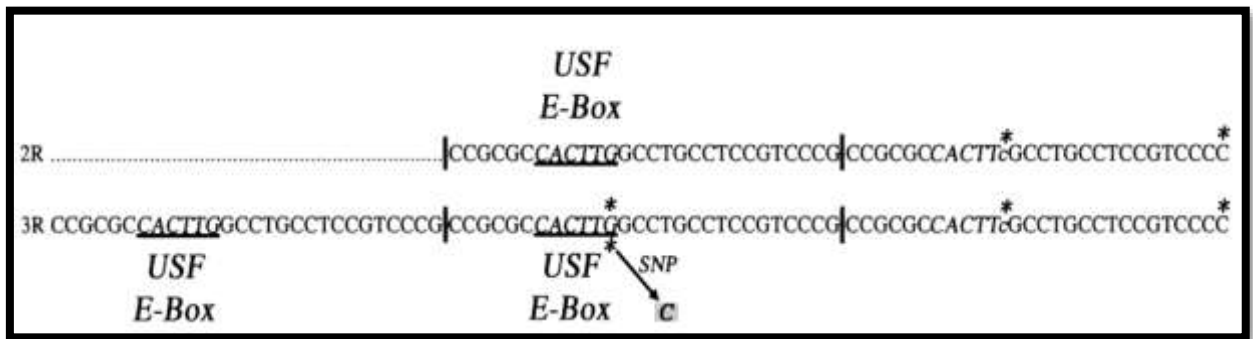


Figura 6. Estructura de las repeticiones en tándem en la región 5'-UTR del gen *TYMS* humano. Un polimorfismo potenciador en 5'-UTR del gen *TYMS* consiste en dos o tres repeticiones de 28 pb. Se ha identificado un supuesto sitio de unión de E-box para el factor estimulante aguas arriba (USF-1/USF-2), que está subrayado y en negrita dentro de cada repetición. Repetición uno y dos de 3R y repetición uno de 2R contienen elementos de consenso de USF (subrayados), mientras que la última repetición en cualquiera de los constructores contiene una secuencia de consenso imperfecta o variante debido al cambio de base G-C (asteriscos) que interrumpe el E-box putativo. El último nucleótido de la repetición final en 2R y 3R también conlleva un cambio de base de G-C (Mandola et al., 2003).

1.3.3. Polimorfismo 1494del6 (rs34489327)

Otro de los polimorfismos identificados en el gen *TYMS* consiste en la variación de una secuencia de 6 pb (TTAAAG) en la posición 1494 de la región 3'-UTR, y recibe el nombre de *1494del6*, y, cuya presencia o ausencia se identifica como inserción (+6pb o *ins*) y delección (-6pb o *del*). Estas variantes alélicas están estrechamente relacionadas con el nivel de expresión de TS. Se ha determinado que el alelo -6pb en 3'-UTR está vinculado con inestabilidad del mRNA *in vitro*, niveles bajos del mismo y menor expresión enzimática intratumoral inferior *in vivo*. También, este polimorfismo puede ser una herramienta de selección útil para predecir la expresión de mRNA del gen *TYMS* (Ulrich et al., 2002; Mandola et al., 2004).

Este polimorfismo está asociado con afecciones inflamatorias (artritis reumatoide) y varias malignidades, como carcinomas colorrectales y pulmonares y linfoma no Hodgkin. También se encontró que aumenta el riesgo de malformaciones del desarrollo como la espina bífida (Skibola et al., 2004; Shi et al., 2005; Gallegos-Arreola et al., 2008; Mo et al., 2016).

Pullman, et al. (2006) describen que la causa de la inestabilidad del mRNA se debe a que la ausencia de las 6 pb aumenta la afinidad entre éste y el factor regulador AUF1, una ribonucleoproteína que actúa como desestabilizador del mRNA.

1.3.4. Otros Polimorfismos del Gen *TYMS*

Además de las repeticiones en tándem en 5'-UTR, se ha descrito otro polimorfismo en esta región de *TYMS* que puede ocurrir solo en el caso de estar presente el alelo 3R y consiste en la sustitución de una guanina por una citosina G>C en la posición número 12 de la segunda repetición (TSER 3 G>C, rs2853542), lo que da lugar a dos nuevas formas alélicas: 3RG (alelo silvestre) y 3RC (variante) (Mandola et al., 2003). Este SNP cambia un residuo crítico en el factor de consenso E-box del factor estimulador en sentido ascendente (CACTTG>CACTTC). Esto suprime un E-box en el alelo 3R, lo que conduce a una disminución en la transcripción de *TYMS*, de modo que 3RC tiene una actividad transcripcional inferior a 3RG, pero una actividad similar a 2R (Mandola et al., 2003, Thomas et al., 2010).

Mandola et al. (2003) demostraron que ese SNP dentro del alelo 3R puede anular su actividad transcripcional aumentada en relación con el 2R, además que las variaciones de secuencia dentro de las repeticiones en tándem tienen significado funcional. Las repeticiones en tándem

TSER de 28 pb contienen elementos que se unen al factor estimulante aguas arriba (USF) y que la unión del ligando por USF-1 y USF-2 potencia la actividad transcripcional del gen *TYMS*. El SNP G>C dentro de la segunda repetición del alelo 3R conduce a una disminución de la capacidad de unión de USF en la repetición y, por lo tanto, a una menor actividad transcripcional de la variante genética 3R. Estos polimorfismos alteran la estabilidad del mRNA, y, consecuentemente, la actividad enzimática. Los autores también demostraron que, mientras que el USF-1 fosforilado se unía a la secuencia consenso normal, la sustitución G a C suprimía la unión, y, mediante análisis de transcripción *in vitro* demostraron que el alelo TSER 3RC causaba una tasa de transcripción menor que la variante TSER 3RG, comparable con el genotipo TSER 2R/2R (Mandola et al., 2003; Mandola et al., 2004; Kawakami; Watanabe, 2003; Gibson, 2006).

Este polimorfismo 3RG>C modifica la actividad traduccional de *TYMS* siendo 3 veces mayor la actividad en la forma alélica 3G que en los alelos 2RC, 2RG y 3RC, por lo que se han clasificado como genotipos de baja expresión a 2R/2R, 2R/3RC, 3RC/3RC y como genotipos de alta expresión a 2R/3RG 3RC/3RG y 3RG/3RG, (tabla 1) (Kawakami; Watanabe, 2003, Yawata, 2005).

Tabla 1. Genotipos de baja y alta expresión de *TYMS*

Clasificación de genotipo	Genotipo
Baja expresión	2R/2R
	2R/3RC
	3RC/3RC
Alta expresión	2R/3RG
	3RC/3RG
	3RG/3RG

(Kawakami; Watanabe, 2003, Yawata, 2005)

En el 2006 se describió un raro SNP G> C en el alelo 2R de *TYMS*, que lleva un cambio de base G> C en el 12° nucleótido de las dos repeticiones de 28 pb (2RC). Un estudio funcional demostró que la actividad transcripcional del promotor de alelo 2RC es la más baja entre los alelos conocidos, lo que es consistente con el SNP que altera el único E-box del alelo 2R. Este fue el

primer reporte de esa variante alélica 2R en humanos, con ambas repeticiones con ese cambio (Gusella et al., 2006).

Lincz et al. (2007), identificaron también un SNP G>C en la primera repetición del alelo 2R de *TYMS*, el cual, efectivamente suprime el único sitio de unión funcional de la proteína USF. Además, también identificaron una inserción de 6 pb (TCCCCG) en la segunda repetición del alelo 2R. Alternativamente, la inserción adicional de 6 pb en la última repetición y/o la estructura propuesta de tallo-bucle formada por la asociación de las repeticiones invertidas puede afectar negativamente la unión de las moléculas reguladoras a esta región.

Meulendijks et al. (2016) realizaron el primer análisis de relevancia clínica del SNP G>C en la posición 12 de la primera repetición de 28 pb del alelo 2R de *TYMS*, y reportaron una disminución significativa de la expresión génica *in vitro* de *TYMS*, suprimiendo el sitio de unión de USF-1.

La relación entre los polimorfismos del gen *TYMS* y el cáncer se ha investigado en muchos estudios. Se han estudiado genotipos y haplotipos combinados del SNP G>C y la inserción/delección +6pb/-6pb y genotipos combinados de TSER y +6pb/-6pb en cáncer gástrico y otros tipos de cáncer. El genotipo combinado 2R/2R, +6pb/+6pb confiere un riesgo significativo de cáncer gástrico (Dong et al., 2000).

1.4. Gen y enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)

El gen metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), se localiza en el cromosoma 1, en la región 1p16.22 (figura 7), tiene 11 exones y codifica para la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La expresión de *MTHFR* es específica de tejido, como se muestra por estudios cuantitativos y cualitativos. La enzima MTHFR tiene 656 aminoácidos, y es una flavoenzima citoplásmica que regula el equilibrio entre la metilación celular y la síntesis de ácidos nucleicos mediante la canalización de la distribución de folato. Por lo tanto, la enzima cataliza la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato para aumentar la abundancia de esta forma de folato en circulación y para proporcionar una fuente de grupos metilo para la metilación de homocisteína a metionina. La metionina posteriormente se convierte en S-adenosilmetionina, que es el donador de metilo universal para las reacciones biológicas, incluida la metilación de proteínas y ácidos nucleicos (Figura 8) (Goyette et al., 1994; Gaughan et al., 2000; Duthie, 1999; Rezende et al., 2017).

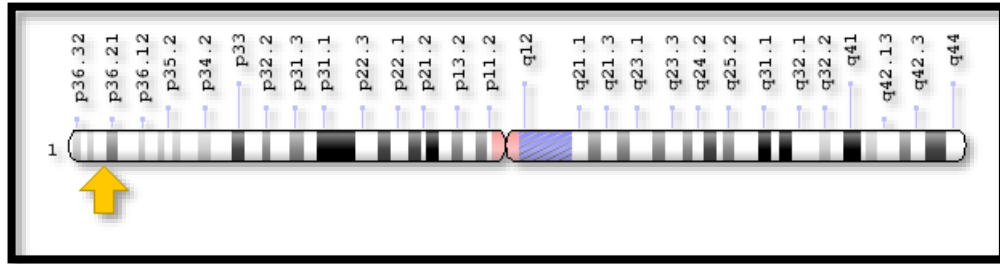


Figura 7. Localización cromosómica del gen *MTHFR* (Genetics Reference).

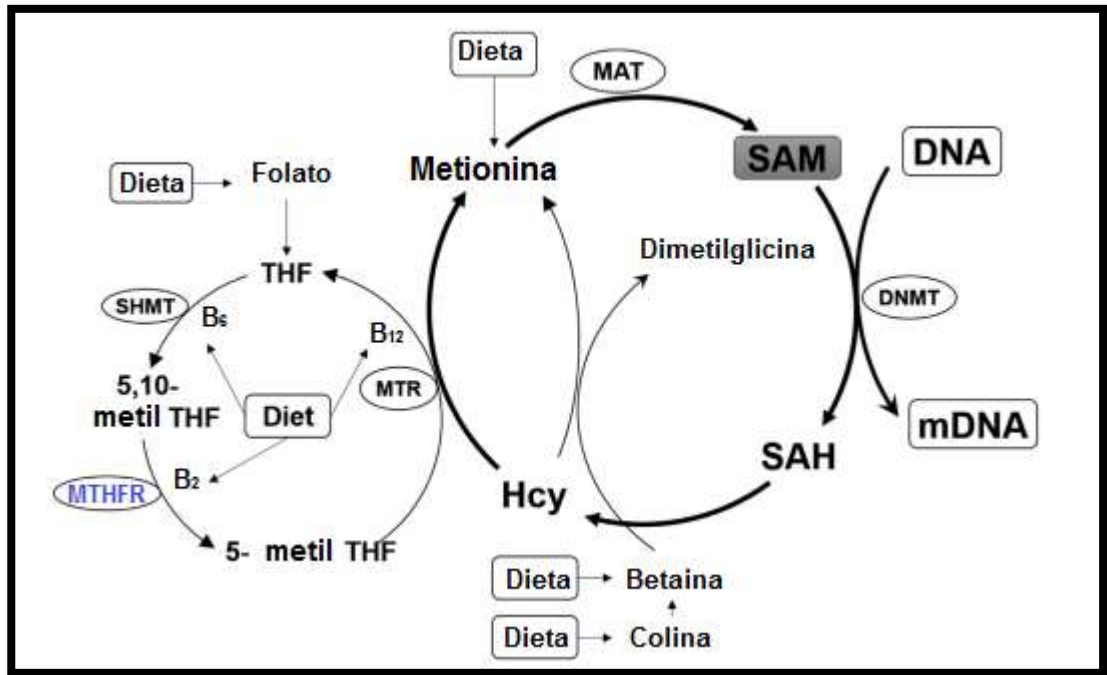


Figura 8. Vista general del metabolismo de un Carbono. 5,10-metilentetrahidrofolato es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos, 5-metilentetrahidrofolato es necesario para la formación de metionina a partir de homocisteína (Hcy). La metionina, en forma de donante de metilo, S-adenosilmetionina (SAM), es esencial para muchas reacciones de metilación. MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa. SHMT: serina hidroximetil transferasa. MTR: metionina sintasa. THF: tetrahidrofolato. MAT: metionina adenosil transferasa. DNMT: DNA metiltransferasa. mDNA: DNA metilado. Traducido y modificado de Zhang, 2015.

1.4.1. Polimorfismos del gen *MTHFR*

Hay dos polimorfismos en *MTHFR*, C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131), que reducen la actividad enzimática hasta en un 30% para los alelos 677T y 1298C. Como resultado, los sustratos de la vía de *MTHFR* se acumulan, alterando la homeostasis y aumentando la

predisposición a las enfermedades. Esta acumulación afecta la síntesis de ácidos nucleicos y la disponibilidad de grupos metilo para procesos bioquímicos celulares (Lievers et al., 2001; Kim et al., 2011).

1.4.2. Polimorfismo C677T (rs1801133)

El polimorfismo C677T es un SNP común en el exón 4 en el sitio de unión del folato del gen *MTHFR* que da como resultado la sustitución de alanina por valina en el codón 222, en el dominio catalítico N-terminal, sitio de unión para el flavín adenín dinucleótido. Esta sustitución genera una enzima termolábil y se asocia con concentraciones elevadas de homocisteína, especialmente en aquellos individuos con bajo nivel de folato. Se ha demostrado que los individuos con el genotipo *MTHFR* 677TT tienen solo un 30% de actividad de la enzima *MTHFR in vitro* en comparación con el tipo salvaje (Frosst et al., 1995; Castro, 2004; Henríquez-Hernández et al., 2010; Rezende et al., 2017).

El genotipo homocigoto 677TT se ha asociado con aproximadamente 70% de pérdida de función enzimática, y, en heterocigotos 677CT con 35% de pérdida de función, en comparación con homocigotos de tipo silvestre 677CC (100% de actividad enzimática completa) (Frosst et al., 1995).

Los individuos con el genotipo 677TT tienen niveles de homocisteína significativamente elevados, con una disminución en la metilación de homocisteína a metionina en el plasma, que canaliza adversamente el metabolismo de la homocisteína en una ruta de transulfuración, conduciendo a toxicidades. De este modo, estos polimorfismos predisponen a los individuos a múltiples enfermedades como trombosis, enfermedad arterial coronaria, infarto de miocardio, enfermedades renales, anormalidades congénitas, cáncer, entre otras (Uleand et al., 2001; Gonzales; Yu; Shiao, 2017).

La relación entre el polimorfismo *MTHFR* C677T y diversas enfermedades implica dos aspectos. En primer lugar, la enfermedad puede influir en las concentraciones de homocisteína y puede haber modificación del efecto por el polimorfismo *MTHFR*. En segundo lugar, el genotipo podría estar asociado con el riesgo de enfermedad, posiblemente mediado por el metabolismo alterado de folatos y de homocisteína (Uleand et al., 2001).

Semenza et al. (2003) indican que los individuos con al menos una variante polimórfica de *MTHFR* (heterocigotos y homocigotos combinados) tienen un mayor riesgo de desarrollar CM premenopáusico. López-Cortés et al. (2013) encontraron una asociación significativa entre los genotipos 677CT y 677TT con el riesgo al cáncer de próstata.

1.4.3. Polimorfismo A1298C (rs1801131)

En comparación con el polimorfismo *MTHFR* C677T, la relevancia funcional de la variante *MTHFR* A1298C está menos definida y su función enzimática es menos anormal. Este polimorfismo está localizado en el exón 7 del gen *MTHFR*. Este cambio de base resulta en la sustitución de un residuo de glutamato por uno de alanina en la posición 429 de la enzima *MTHFR*, donde puede estar involucrado en la estabilización de la proteína y dando como resultado una actividad enzimática disminuida (van der Put et al., 1998; Weisberg et al., 1998).

El genotipo 1298CC, homocigoto, se ha asociado con 30% de pérdida de función, y el 1298AC, heterocigoto, tiene 15% de pérdida de función en actividad enzimática en comparación con el 1298AA de tipo salvaje (100% de actividad enzimática completa) (Weisberg et al., 1998).

Estudios con *MTHFR* demuestran que el genotipo 677TT está asociado con un estado de metilación del ADN significativamente menor. Los homocigotos 1298CC también muestran un estado de metilación de ADN inferior. El genotipo 1298CC, independientemente de la disponibilidad de folato, y el genotipo 677TT con niveles de folato inadecuado, podrían ser factores de riesgo potenciales de estados patológicos asociados con el estado de hipometilación del ADN (Castro et al., 2004).

1.5. Gen y enzima metionina sintasa (MTR)

El gen metionina sintasa (*MTR*), se localiza en el cromosoma 1, región 1q43 (figura 9), tiene una longitud de 105.24 kb y está formado por 33 exones. Codifica para una enzima de 1265 aminoácidos del mismo nombre, metionina sintasa (MTR) que cataliza la remetilación de homocisteína a metionina en una reacción en la que metilcobalamina sirve como un cofactor portador de metilo intermediario. Esto ocurre por transferencia del grupo metilo de 5-metiltetrahidrofolato a la enzima ligada cob (I) alamina para formar metilcobalamina con transferencia posterior del grupo metilo a la homocisteína para formar metionina (figura 10). Con

el tiempo, cob (I) alamina puede oxidarse en cob (II) alamina, lo que hace que la enzima quede inactiva. La regeneración de la enzima funcional se produce a través de la metilación de la cob (II) alamina mediada por metionina sintasa, en la que se utiliza S-adenosilmetionina como donador de metilo. (Leclerc et al., 1996; Al Farra, 2010; Elshihawy et al., 2014).

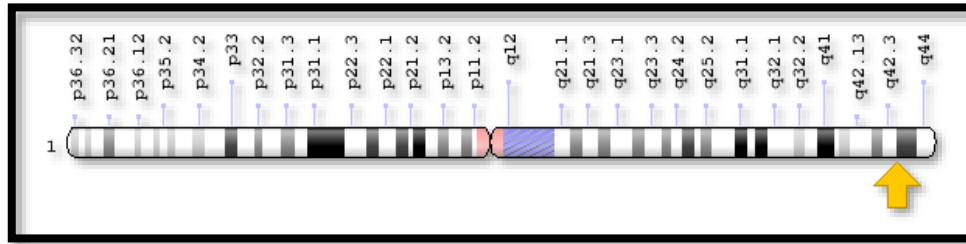


Figura 9. Localización cromosómica del gen *MTR* (Genetics Reference).

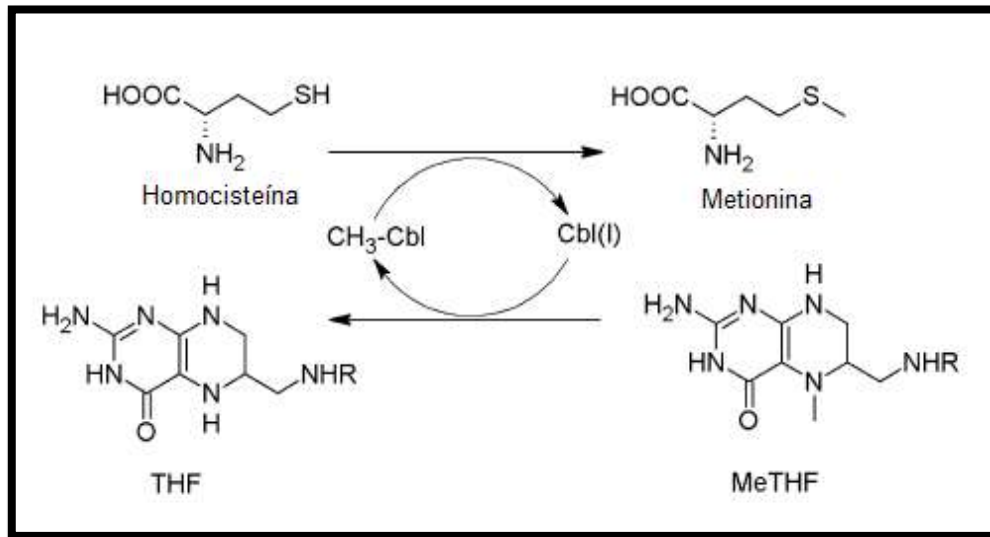


Figura 10. Reacción catalizada por MTR. THF: tetrahidrofolato. MeTHF: metiltetrahidrofolato. Cbl: Cobalamina (Elshihawy et al., 2014).

La metionina sintasa es una enzima dependiente de la vitamina B12, que cataliza la remetilación de homocisteína a metionina y la desmetilación simultánea de 5-metiltetrahidrofolato a tetrahidrofolato. La metionina sintasa tiene un papel clave en el mantenimiento de las

concentraciones adecuadas de folato intracelular, metionina y homocisteína normal. La metionina es un aminoácido esencial y precursor de la S-adenosilmetionina, que es un donante universal de grupos metilo involucrado en reacciones de metilación, incluida la metilación del ADN (Yu et al., 2010; Hosseini, 2013).

1.5.1. Polimorfismo A2756G (rs1805087)

El polimorfismo común MTR A2756G, ubicado en el exón 26, da como resultado un cambio de aminoácido de aspartato a glicina en la posición 919 de la proteína, y se ha demostrado que contribuye a las alteraciones en los niveles plasmáticos de homocisteína y ácido fólico (Zhu et al., 2003; Lu; Wang; Qiu, 2010; de Cássia et al., 2012).

Se pensó inicialmente que este polimorfismo se asociaba con una actividad enzimática menor que el genotipo MTR 2756AA, lo que causaba una elevación de la homocisteína y una hipometilación del ADN. Sin embargo, en investigaciones posteriores, algunos estudios sugirieron una asociación inversa modesta entre el polimorfismo 2756GG y los niveles de homocisteína, lo que indica un aumento de la actividad enzimática del genotipo variante (Yu et al., 2010). Además, Paz et al. (2002), encontraron que los individuos con el genotipo 2756GG muestran una menor frecuencia de hipermetilación de islas CpG en genes supresores de tumores. Por ello, se están realizando un gran número de estudios para evaluar el rol de este polimorfismo en diferentes tipos de neoplasmas, sin embargo, las asociaciones entre este polimorfismo y el cáncer aún es controversial (Ke et al., 2010).

En un metaanálisis realizado por Ke et al. (2010) encontraron que el polimorfismo A2756G puede reducir el factor de riesgo para el cáncer en poblaciones europeas, especialmente para el cáncer colorrectal. Sin embargo, la posible asociación entre este polimorfismo en poblaciones asiáticas, puede ser espurio, debido a que ha sido asociado tanto a un riesgo incrementado como a un riesgo reducido al cáncer, lo cual no es claro, siendo necesarios muchos más estudios para interpretar esas asociaciones

Este polimorfismo ha sido asociado a defectos en el tubo neural, autismo, enfermedades cardiovasculares, cáncer de próstata, retinoblastoma, entre otros. Aunque hay algunos estudios que evalúan este polimorfismo y el riesgo de CM, hay pocos estudios que consideraron la combinación

de este polimorfismo con los del polimorfismo de *MTHFR* en el riesgo de esta enfermedad (Yu et al., 2010; de Lima, 2010; de Cássia et al., 2012; Wang, et al., 2015; Haghiri et al., 2016; Raina et al., 2016; Ebrahimi; Hosseinzadeh; Karimian, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la asociación de los polimorfismos de los genes timidilato sintasa (*TYMS*), metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) y metionina sintasa (*MTR*) con el riesgo de desarrollar cáncer de mama en la población paraense.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos TSER en la región 5'-UTR del gen *TYMS* y del polimorfismo *1494del6* en la región 3'-UTR del mismo gen, en muestras de pacientes con cáncer de mama y de un grupo control;
- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* en muestras de pacientes con cáncer de mama y de un grupo control;
- Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A2756G del gen *MTR* en muestras de pacientes con cáncer de mama y de un grupo control;
- Determinar las combinaciones de los polimorfismos TSER/*1494del6* en el gen *TYMS* y C677T/A1298C en el gen *MTHFR* en muestras de pacientes con cáncer de mama y de un grupo control;
- Relacionar la presencia de estos polimorfismos con el riesgo de desarrollar cáncer de mama;
- Verificar posibles asociaciones de estos polimorfismos con la clasificación molecular del tumor y con datos relacionados a la edad, hábitos alimentarios, tabaquismo y alcoholismo.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el CM es el principal tipo de cáncer que afecta a las mujeres en Brasil y en el mundo, según datos del INCA (2018), aparte de que sigue estando asociado a una alta tasa de mortalidad en el país como consecuencia de un diagnóstico en etapas avanzadas, se hace necesario realizar estudios que permitan la obtención de conocimiento para comprender aún más los factores involucrados en el desarrollo de esta enfermedad, además de lograr una prevención y un diagnóstico más amplio y acertado sobre esta patología.

Se sospecha que el desarrollo y crecimiento neoplásico está influenciado por la disponibilidad y el metabolismo del folato debido a los efectos en la expresión génica a través de la metilación del DNA y en la integridad del genoma a través de la síntesis y reparación del DNA, y los reguladores enzimáticos involucrados en la vía de los folatos tienen un papel clave. Los polimorfismos involucrados en genes que codifican enzimas del metabolismo de los folatos son un gran foco en el estudio del cáncer de mama debido a los roles de esas enzimas en la metilación del DNA y en la síntesis y reparación del DNA (da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012).

Los genes *TYMS*, *MTHFR* y *MTR* han sido involucrados en el desarrollo de distintas enfermedades, incluyendo el CM. Aunque las variantes de *MTHFR* se asocian con una disminución del riesgo de cáncer de colon, existen datos contradictorios sobre su asociación con el cáncer de mama. (Semenza et al., 2003; de Cássia et al., 2012; Yin et al., 2012; Liu et al., 2016).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestras

Las muestras se obtuvieron de biopsias de pacientes que fueron sometidas a tratamiento quirúrgico después del diagnóstico de CM entre los años 2005 y 2011. Todos los tumores eran de carcinoma ductal invasivo localmente avanzado y estaban en estadio III (A o B) de acuerdo con la escala TNM (Sobin et al., 2011). Fueron tomados como criterios de exclusión problemas cardíacos, presencia de metástasis a distancia, embarazo y lactancia.

Todas las pacientes seleccionadas hicieron su tratamiento en el Hospital Ophir Loyola, en Belém do Pará, y recibieron quimioterapia neoadyuvante con Adriamicina (Doxorrubicina 60 mg/m²) más Cytoxan (Ciclofosfamida 600 mg/m²), por vía endovenosa por cuatro ciclos cada 21 días. Después de la colecta, las muestras fueron fijadas con formol 10% e incrustadas en parafina para su posterior análisis histopatológico con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímico a través de la técnica de hibridación *in situ* (FISH) y se clasificaron en los cuatro subtipos moleculares correspondientes: luminal A, luminal B, HER2-positivo no luminal y TNBC o triple negativo. Además, se colectaron datos epidemiológicos como edad, raza, índice de masa corporal, así como características de historia reproductiva, historia familiar y de estilo de vida como consumo de tabaco y alcohol. Las pacientes o sus acompañantes firmaron un término de consentimiento informado “*Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*” (en anexo) en donde permitieron el uso de las muestras para el presente estudio.

Las muestras de control fueron obtenidas del Laboratorio de Análisis Clínico de la Universidad Federal do Pará (LAC), extraídas de sangre de mujeres seleccionadas sin histórico de neoplasias. Las muestras fueron colectadas en un tubo al vacío con EDTA y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de extracción del DNA. En total, se trabajó con 61 muestras de pacientes y 35 muestras de control.

El proyecto de investigación al cual está vinculado este trabajo fue aprobado por el “*Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Ophir Loyola*”, protocolo N° 184.445/2013.

4.2. Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído tanto con el kit comercial *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante, así como también con el método clásico de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico descrito por Sambrook y Russell (2001).

4.3. Cuantificación de DNA

La concentración de DNA fue determinada mediante análisis espectrofotométrico (Espectrofotómetro Nanodrop 1000, *Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL*). Para verificar la integridad del DNA genómico extraído, todas las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 1% coloreado con GelRed™ (UNISCIENCE) y expuestas a luz ultravioleta para la visualización de los fragmentos (ver sección 4.5).

4.4. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA extraído fue sometido a PCR para amplificar las regiones 5'-UTR y 3'-UTR del gen *TYMS*, un fragmento que incluye el codón 222 del gen *MTHFR*, un fragmento que incluye el codón 429 del gen *MTHFR* y un fragmento que incluye el codón 929 del gen *MTR*. Se empleó un termociclador *Applied Biosystem 2720* para todos los sistemas de PCR. Los oligonucleótidos iniciadores y el tamaño de los fragmentos amplificados se muestran en la tabla 2, y, los componentes de la mezcla de reacción y las condiciones para cada sistema de PCR se muestran en la tabla 3. El volumen final para cada reacción fue de 25µl. Para descartar falsos positivos se realizaron reacciones sin agregar DNA (controles negativos).

Tabla 2. Oligonucleótidos iniciadores usados

Iniciador	Secuencia	Tamaño del fragmento	Referencia
TS 5'-UTR F	5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCCC-3'	215 y 243 pb	Ulrich et al., 2002
TS 5'-UTR R	5'-GGCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG-3'		
TS 3'-UTR F	5'-TTCCCTCAAATCTGAGGGAGCTG-3'	169 y 175 pb	Diseñados
TS 3'-UTR R	5'-CTGCTCAGTTCCTTCTAAAATA-3'		
MTHFR 677 F	5'-AAGCAGAGGACTCTCTGCCC-3'	365 pb	Araújo et al., 2015
MTHFR 677 R	5'-CCCCCAGCCTGTGCGAGGACGGT-3'		
MTHFR 1298 F	5'-CCATTCCGGTTTGGTTCTCC-3'	293 pb	Al-Motassem et al., 2018
MTHFR 1298 R	5'-TGCTTGTGGTTGACCTGGGA-3'		
MTR F	5'-TTAGCACAGTTGGTGAAGGGAG-3'	392 pb	
MTR R	5'-AAGACACTGAAGACCTCTGATTTGA-3'		

Tabla 3. Componentes de reacción y condiciones de los sistemas de PCR

Componentes de la mezcla de reacción	Tampón PCR 10X	MgCl ₂ 1,5 mM	dNTPs 10 mM	Iniciadores 10 pmol	DMSO	Taq polimerasa 1U	H ₂ O	DNA 100 ng	Condiciones de la PCR
TSER 5'-UTR TYMS	2,5 µl	0,8 µl	4,0 µl	1,0 µl	3,0 µl	0,2 µl	12,5 µl	1,0 µl	94°C →5'
									94°C →30''
									60°C →30''
									72°C →30''
									72°C →5'
1494del6 3'-UTR TYMS	2,5 µl	1,0 µl	4,0 µl	1,0 µl	1,5 µl	0,2 µl	13,8 µl	1,0 µl	95°C →15'
									94°C →30''
									62°C →40''
									72°C →30''
									72°C →10'
C677T MTHFR	2,5 µl	1,0 µl	4,0 µl	1,0 µl	2,0 µl	0,2 µl	13,3 µl	1,0 µl	94°C →5'
									94°C →40''
									57°C →30''
									72°C →40''
									72°C →5'
A1298C MTHFR	2,5 µl	1,0 µl	4,0 µl	1,0 µl	1,0 µl	0,2 µl	14,3 µl	1,0 µl	95°C →5'
									94°C →30''
									64°C →30''
									72°C →30''
									72°C →5'
A2756G MTR	2,5 µl	1,0 µl	4,0 µl	1,0 µl	0 µl	0,2 µl	15,3 µl	1,0 µl	95°C →5'
									94°C →30''
									64°C →30''
									72°C →30''
									72°C →5'

4.5. Electroforesis en geles de agarosa

Por medio de la técnica de electroforesis en geles de agarosa se visualizaron todos los amplificados de los sistemas de PCR. La concentración de los geles de agarosa fue de 1% y 2%, y fueron preparados según las especificaciones del fabricante.

El volumen de muestra por pozo fue de 4 µl del amplificado mezclado con 2 µl de tampón de carga Blue (ver anexo) y 2 µl de *GelRed*TM (UNISCIENCE). Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 100 V, 300 mA, 30 W durante 30 minutos. La visualización de los fragmentos se observó bajo luz ultravioleta.

4.6. Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida

Para obtener una mejor visualización de las bandas de los fragmentos amplificados de las regiones 5'-UTR y 3'-UTR del gen *TYM* y determinar los genotipos se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida al 12% según protocolo de Cruz et al. (2015), con respectivas modificaciones. Los genotipos del polimorfismo TSER, en la región 5'-UTR, 2R/2R, 2R/3R y 3R/3R, se determinaron dependiendo del número de repeticiones, y, por consiguiente, de acuerdo al tamaño del fragmento amplificado, (215 y 243 pb). Los genotipos del polimorfismo *1494del6*, en la región 3'-UTR, +6/+6, +6/-6 y -6/-6 y también fueron determinados de acuerdo al tamaño del fragmento amplificado (175 y 169 pb).

La metodología empleada para realizar los geles al 12% fue la siguiente:

Inicialmente se preparó una mezcla de acrilamida-bisacrilamida 30% (29:1). Para preparar los geles se tomaron 25 ml de agua destilada, 5 ml de tampón TBE 1X, 20 ml de poliacrilamida 30%, 80 µl de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina -Sigma-) y 750 µl de persulfato de amonio 10%. Esta mezcla fue vertida en una lámina soporte a la cual se le insertó un peine para la formación de los pozos donde posteriormente se colocó la muestra. Una vez polimerizado el gel, se sumergió en la cámara electroforética y se retiró el peine. Seguidamente las muestras fueron cargadas en los pozos. La cantidad de muestra por pozo fue de 5 µl del amplificado mezclado con 3 µl de tampón de carga Blue y 3 µl de *GelRed*TM (UNISCIENCE). Las muestras se sometieron a un campo eléctrico de 100 V, 300 mA, 30 W, por espacio de 120 minutos. La visualización de los fragmentos se observó bajo luz ultravioleta.

4.7. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

4.7.1. RFLP para el polimorfismo C677T

Para determinar el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* se realizó la digestión con la enzima *HinfI* (*Biolabs*). El polimorfismo genera un sitio de corte para esta enzima (Van Amerogen et al., 1998). Las condiciones de la digestión se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión de los amplificadores del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*

Componentes	Cantidad (µl)
Tampón 1X	1
Enzima 1U	0,1
H ₂ O	3,9
DNA amplificado	5
Volumen final	10

Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 1 h y los resultados fueron visualizados en geles de agarosa 3%.

4.8. Secuenciamiento automático

Para verificar los genotipos obtenidos en las muestras analizadas se realizó el secuenciamiento automático de todas las muestras de pacientes y del grupo control.

Se utilizó el kit de secuenciamiento *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de *Applied Biosystems*, (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción se muestra en la tabla 5, se secuenció por el método Sanger en un secuenciador automático *ABI PRISM® 3100* de *Applied Biosystems* (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias fueron analizadas en el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versión 7.0.5.3.

Tabla 5. Componentes de la mezcla de reacción para secuenciamiento automático

Componentes	Cantidad (µl)
Tampón	1,5
Iniciador <i>Forward</i>	1,0
<i>BigDye Terminator</i>	1,0
H ₂ O	5,5
DNA amplificado	1,0
Volumen final	10

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de significancia estadística para evaluar las asociaciones de los polimorfismos con el riesgo de desarrollar CM. También se determinó si había significancia estadística entre la presencia de los polimorfismos con los datos moleculares, la edad, historia familiar y reproductiva, IMC, alcoholismo y tabaquismo. Se aplicaron los test de ji-cuadrado (X^2), test G, test exacto de Fisher y *Odds Ratio* (OR) en los programas BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007) y *GraphPad Prism 5 version 5.01* (*GraphPad Software, Inc.*). Valores de p menores que 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Muestras

El número total de muestras usadas en el estudio fue de 61 pacientes y 35 controles. De las muestras de pacientes fueron colectados datos epidemiológicos, así como características de historia reproductiva, historia familiar de CM y de estilo de vida como tabaquismo y alcoholismo (tabla 6).

Tabla 6. Características de las muestras analizadas

Característica		Pacientes	Control	
Edad	<50	36 (59,02%)	8 (22,86%)	OR= 4,86 <i>p</i> = 0,001
	≥50	25 (40,98%)	27 (77,14%)	
	Media	47,90 ± 10,57	57,17±9,68	
Color	Blancas	18 (29,51%)		<i>p</i> = 0,137
	Negras	12 (19,67%)		
	Pardas	31 (30,82)		
IMC	≤24,9	18 (29,51%)		<i>p</i> = 0,005
	25-29,9	23 (37,70%)		
	30-34,9	16 (26,23%)		
	35-39,9	4 (6,54%)		
	≥40	0 (0%)		
Menarquía	≤12 años	22 (36,1%)		<i>p</i> = 0,029
	>12 años	39 (63,9%)		
Gestación	Nulíparas	5 (8,2%)		<i>p</i> < 0,0001
	Múltiparas	56 (91,8%)		
Menopausia	Sí	23 (37,7%)		<i>p</i> = 0,001
	No	38 (62,3%)		
Historia familiar	Sí	20 (32,79%)		<i>p</i> = 0,007
	No	41 (67,21%)		
Tabaquismo	Sí	10 (16,39%)		<i>p</i> < 0,0001
	No	51 (83,61%)		
Alcoholismo	Sí	4 (6,56%)		<i>p</i> < 0,0001
	No	57 (93,44%)		

Dependiendo del polimorfismo evaluado, el número de muestras analizadas varió, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Número de muestras analizadas para cada polimorfismo

Gen	Polimorfismo	Muestras de pacientes	Muestras de control
<i>TYMS</i>	TSER	61	35
	1494del6	61	35
<i>MTHFR</i>	C677T	61	35
	A1298C	61	16
<i>MTR</i>	A2756G	33	16

Además, también se obtuvo la clasificación molecular del tumor basado en la inmunohistoquímica a través de la técnica de hibridación *in situ* (FISH) en estudios previos, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Clasificación molecular del tumor en el grupo de pacientes.

Clasificación Inmunohistoquímica	Número de pacientes	Porcentaje (%)
Luminal A	7	11,48
Luminal B	28	45,90
HER2-positivo no luminal	9	14,75
TNBC	17	27,87
Total	61	100

$p= 0,0005$

Fueron estandarizados todos sistemas de PCR, y se amplificaron todas las muestras de pacientes y del grupo control. Se realizó también el análisis de restricción para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* y se realizó el secuenciamiento de todas las muestras empleadas. Se determinaron también las frecuencias genotípicas y alélicas para todos los polimorfismos a evaluar. El número total de muestras varió para cada polimorfismo (tabla 7) debido a problemas en la amplificación y en el agotamiento del tejido y sangre para realizar próximas extracciones de DNA.

5.2. Polimorfismo TSER

5.2.1. Sistema de PCR 5'-UTR del gen *TYMS*

Todas las muestras en estudio permitieron la amplificación de 215 y 243 pb correspondientes a la región 5'-UTR del gen *TYMS*. Las muestras con tamaño de 215 pb corresponden a 2 repeticiones, las de 243 pb a 3 repeticiones y las que presentaron las dos bandas corresponden a los heterocigotos 2R/3R. Solo una muestra (1,64%) del grupo experimental amplificó una banda de 271 pb y 243 pb, correspondiendo al genotipo heterocigoto 3R/4R.

5.2.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo TSER

A través del secuenciamiento automático se verificaron los genotipos homocigotos para los alelos 2R y 3R, comprobándose la presencia de las repeticiones dobles y triples de 28 pb (figuras 11 y 12).

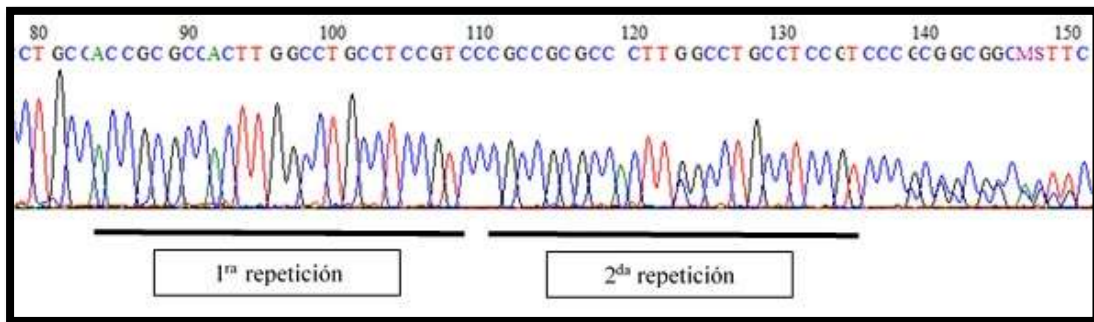


Figura 11. Electroferograma del genotipo 2R/2R del polimorfismo TSER de *TYMS*

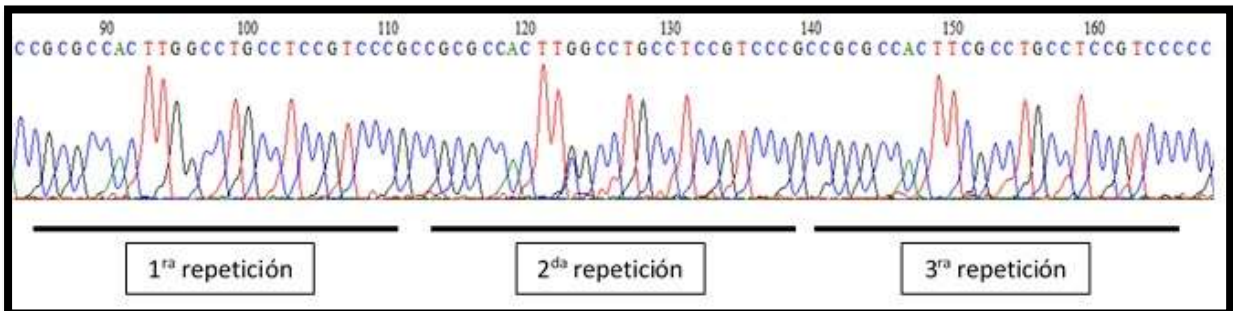


Figura 12. Electroferograma del genotipo 3R/3R del polimorfismo TSER de *TYMS*

5.2.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TSER del gen *TYMS*

Se analizaron 61 muestras de pacientes con CM y 35 muestras de control. De las 61 muestras de pacientes, 11,48% presentó el genotipo homocigoto 2R/2R, 40,98% el genotipo

homocigoto 3R/3R, 45,90% el genotipo heterocigoto 2R/3R, y, 1,64% el genotipo heterocigoto 3R/4R. En las muestras control la distribución de las frecuencias genotípicas fue de 11,43%, 31,43% y 57,14% para las variantes 2R/2R, 3R/3R y 2R/3R, no se encontró el genotipo 3R/4R en el grupo control (gráfico 1). La distribución de los genotipos tanto en el grupo de pacientes como en el grupo de control se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2=0,04$; $p=0,84$ y $X^2=1,27$; $p=0,26$).

Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo 2R presentó una frecuencia de 0,34 en las muestras de pacientes y 0,40 en el grupo de control. El alelo 3R presentó una frecuencia de 0,65 en las muestras de pacientes y 0,60 en el grupo de control. El alelo 4R presentó una frecuencia de 0,01% en las muestras de pacientes (tabla 9).

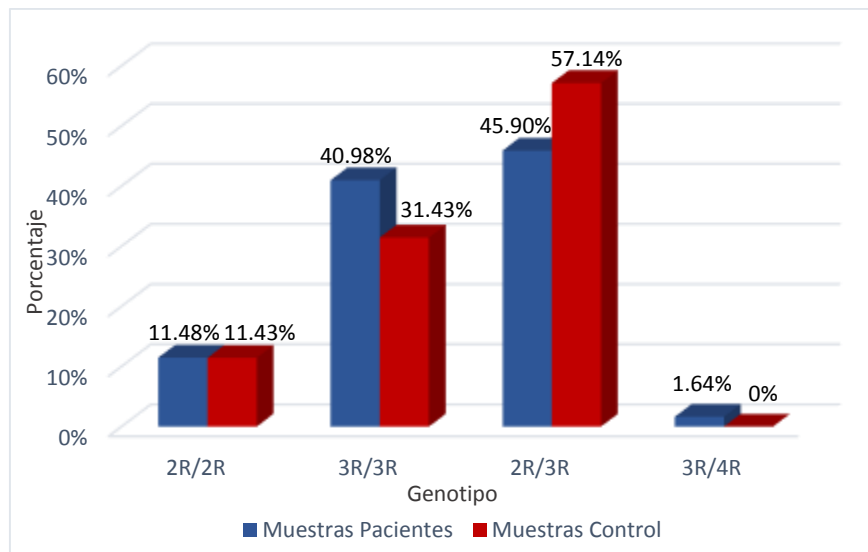


Gráfico 1. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo TSER del gen *TYMS*

Tabla 9. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo TSER del gen *TYMS*

Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
Genotipo	Muestras pacientes n= 61 (%)	Muestras control n= 35 (%)	Alelo	Muestras pacientes n= 61	Muestras control n= 35
2R/2R	7 (11,48%)	4 (11,43%)	2R	0,34	0,40
3R/3R	25 (40,98%)	11 (31,43%)	3R	0,65	0,60
2R/3R	28 (45,90%)	20 (57,14%)	4R	0,01	0,0
3R/4R	1 (1,64%)	0 (0%)			

5.3. Polimorfismo *1494del6*

5.3.1. Sistema de PCR 3'-UTR del gen *TYMS*

Todas las muestras en estudio permitieron la amplificación de 169 y 175 pb correspondientes a la región 3'-UTR del gen *TYMS*. Las muestras con tamaño de 169 pb corresponden a los homocigotos con la delección de 6 pb, las muestras de 175 pb corresponden a aquellas que no tienen la delección de 6 pb, y las que presentaron las dos bandas corresponden a los heterocigotos +6/-6 pb.

5.3.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo *1494del6*

A través del secuenciamiento automático se verificaron, los genotipos homocigotos para los alelos +6 y -6 del polimorfismo *1494del6* (figuras 13 y 14).

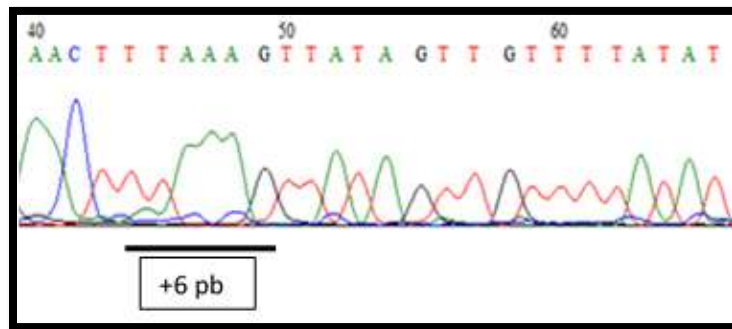


Figura 13. Electroferograma del genotipo +6/+6 del polimorfismo *1494del6* del gen *TYMS*

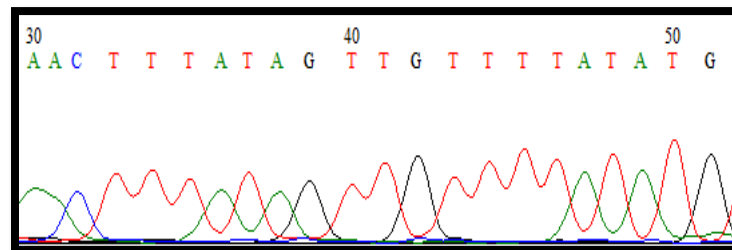


Figura 14. Electroferograma del genotipo -6/-6 del polimorfismo *1494del6* del gen *TYMS*

5.3.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *1494del6* del gen *TYMS*

Fueron analizadas 61 muestras de pacientes con CM y 35 muestras de control. De las 61 muestras de pacientes, 42,63% presentó el genotipo homocigoto +6/+6, 39,34% el genotipo heterocigoto +6/-6, y 18,03% el genotipo homocigoto -6/-6. En las muestras de control la

distribución de las frecuencias genotípicas fue de 25,71%, 51,43%, y 22,86% para las variantes +6/+6, +6/-6 y -6/-6 (gráfico 2). La distribución de los genotipos tanto en el grupo experimental como en el grupo control se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2=1,61$; $p=0,20$ $X^2=0,03$ y $p=0,86$).

Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo +6 presentó una frecuencia de 0,62 en las muestras de pacientes y 0,51 en el grupo de control. El alelo -6 presentó una frecuencia de 0,38 en las muestras de pacientes y 0,49 en el grupo de control (tabla 10).

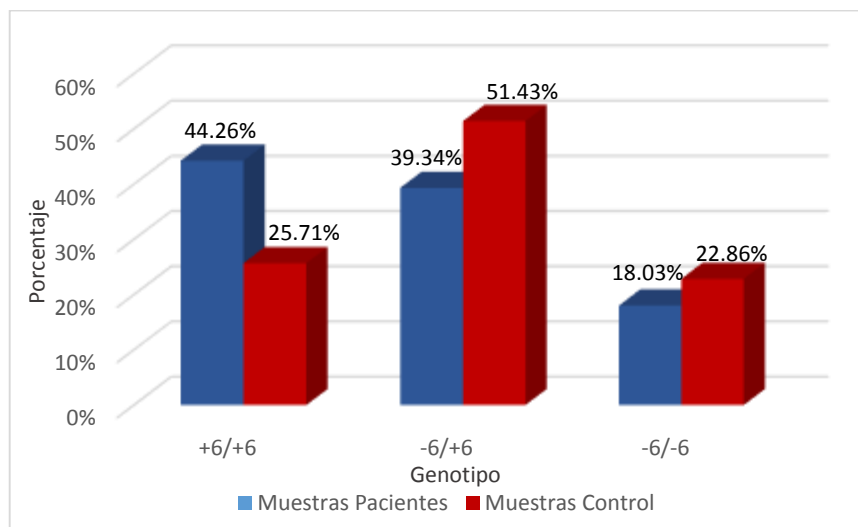


Gráfico 2. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo *1494del6* del gen *TYMS*

Tabla 10. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo *1494del6* del gen *TYMS*

Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
Genotipo	Muestras pacientes n= 61 (%)	Muestras control n= 35 (%)	Alelo	Muestras pacientes n= 61	Muestras control n= 35
+6/+6	26 (42,63%)	9 (25,71%)	+6	0,62	0,51
+6/-6	24 (39,34%)	18 (51,43%)			
-6/-6	11 (18,03%)	8 (22,86%)	-6	0,38	0,49

5.4. Polimorfismo C677T

5.4.1 Sistema de PCR C677T del gen *MTHFR*

Todas las muestras en estudio permitieron la amplificación de 365 pb correspondientes a la región que incluye el codón 222 del gen *MTHFR*.

5.4.2 RFLP para el polimorfismo C677T

Los amplificados de 365 pb fueron sometidos a digestión con la enzima *HinfI*. La presencia de T en lugar de C en la posición 677 genera un sitio de corte para esta enzima. La digestión con *HinfI* genera fragmentos de los siguientes tamaños: 9 y 356 pb para los homocigotos 677CC; 9, 165, 191 y 356 pb para los heterocigotos 677CT y 9, 165 y 191 pb para los homocigotos 677TT. El fragmento de 9 pb no se consideró debido a su tamaño y posición dentro del iniciador *forward*.

5.4.3. Secuenciamiento automático del polimorfismo C677T

A través del secuenciamiento automático se comprobaron los genotipos 677CC, 677CT y 677TT del polimorfismo C677T (figuras 15, 16 y 17).

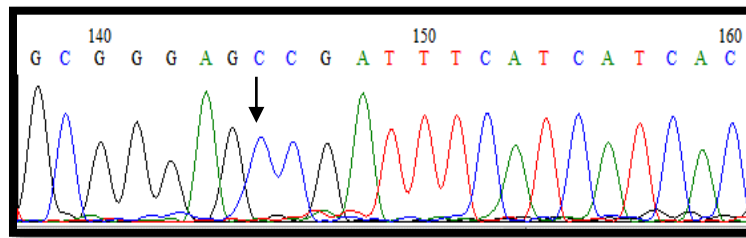


Figura 15. Electroferograma del genotipo 677CC del gen *MTHFR*

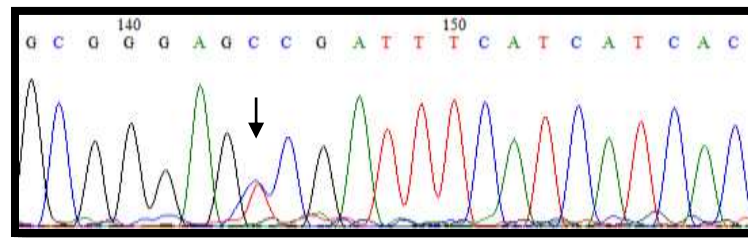


Figura 16. Electroferograma del genotipo 677CT del gen *MTHFR*

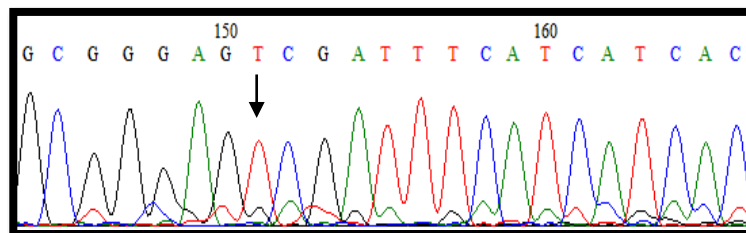


Figura 17. Electroferograma del genotipo 677TT del gen *MTHFR*

5.4.4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*

Se analizaron 61 muestras de pacientes con CM y 35 muestras de control. De las 61 muestras de pacientes, el 50,82% presentó el genotipo homocigoto 677CC, 39,34% el genotipo heterocigoto 677CT y el 9,84% el genotipo homocigoto 677TT. En las muestras control la distribución de las frecuencias genotípicas fue de 51,42% y 48,57% para 677CC y 677TT, no hubo presencia del genotipo 677TT en el grupo de control (gráfico 3). La distribución de los genotipos tanto en el grupo de pacientes como en el grupo de control se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2=0,18$ $p=0,67$ y $X^2=3,6$ $p=0,05$).

Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo C presentó una frecuencia de 0,70 en las muestras experimentales y 0,76 en el grupo control, y el alelo T presentó una frecuencia de 0,30 en las muestras experimentales y 0,24 en el grupo control (tabla 11).

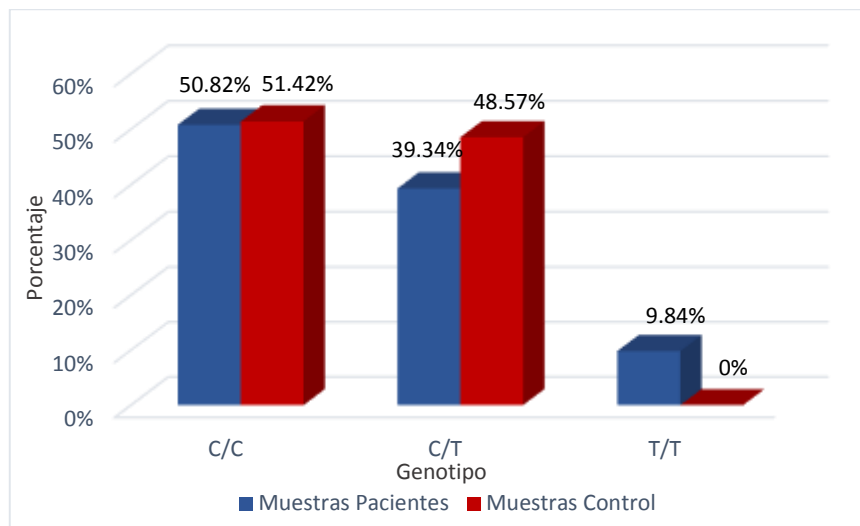


Gráfico 3. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*

Tabla 11. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*

Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
Genotipo	Muestras pacientes n= 61 (%)	Muestras control n= 35 (%)	Alelo	Muestras pacientes n= 61	Muestras control n= 35
677CC	31 (50,82%)	18 (51,42%)	C	0,70	0,76
677CT	24 (39,34%)	17 (48,57%)			
677TT	6 (9,84%)	0 (0%)	T	0,30	0,24

5.5. Polimorfismo A1298C

5.5.1. Sistema de PCR A1298C del gen *MTHFR*

Todas las muestras en estudio permitieron la amplificación de 293 pb correspondientes a la región del exón 7 del gen *MTHFR*.

5.5.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR*

Con el secuenciamiento automático de los amplificados se comprobaron los genotipos 1298AA, 1298AC y 1298CC del polimorfismo A1298C (figuras 18, 19 y 20).

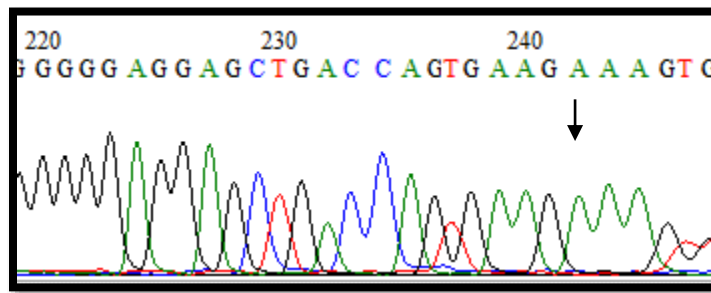


Figura 18. Electroferograma del genotipo 1298AA del gen *MTHFR*

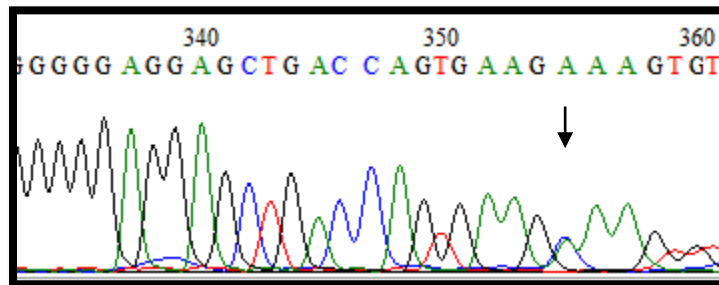


Figura 19. Electroferograma del genotipo 1298AC del gen *MTHFR*

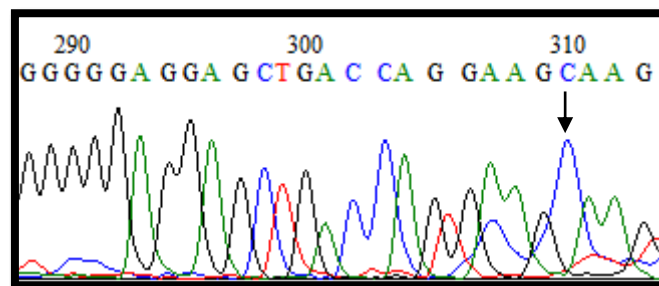


Figura 20. Electroferograma del genotipo 1298CC del gen *MTHFR*

5.5.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR*

Se analizaron 61 muestras de pacientes con CM y 16 muestras de control. De las 61 muestras de pacientes, 40,98% presentó el genotipo homocigoto 1298AA, 54,10% el genotipo heterocigoto 1298AC, y 4,92% el genotipo homocigoto 1298CC. En las muestras de control la distribución de las frecuencias genotípicas fue de 43,75% y 56,256% para las variantes 1298AA y 1298AC, no hubo presencia del genotipo 1298CC en los controles (gráfico 4). La distribución de los genotipos tanto en el grupo experimental como en el grupo control se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2=3,62$; $p=0,06$ $X^2=2,45$ y $p=0,12$).

Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo A presentó una frecuencia de 0,68 en las muestras de pacientes y 0,32 en el grupo de control. El alelo C presentó una frecuencia de 0,32 en las muestras de pacientes y 0,28 en el grupo de control (tabla 12).

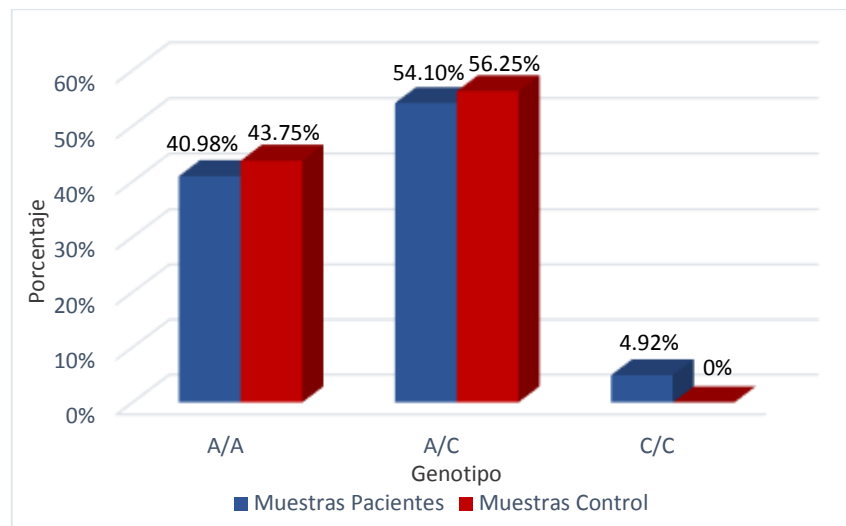


Gráfico 4. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR*

Tabla 12. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR*

Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
Genotipo	Muestras pacientes n= 61 (%)	Muestras control n= 16 (%)	Alelo	Muestras pacientes n= 61	Muestras control n= 16
1298AA	25 (40,98%)	7 (43,75%)	A	0,68	0,72
1298AC	33 (54,10%)	9 (56,25%)			
1298CC	3 (4,92%)	0 (0%)	C	0,32	0,28

5.6. Polimorfismo A2756G

5.6.1. Sistema de PCR A2756G del gen *MTR*

Todas las muestras en estudio permitieron la amplificación de un fragmento de 392 pb que incluye parte del exón 26 del gen *MTR*.

5.6.2. Secuenciamiento automático del polimorfismo A2756G

A través del secuenciamiento automático de los amplificados se comprobaron los genotipos 2756AA y 2756AGC del gen *MTR*. No hubo presencia del genotipo 2756GG ni en las muestras de pacientes ni en el grupo control (figuras 21 y 22).

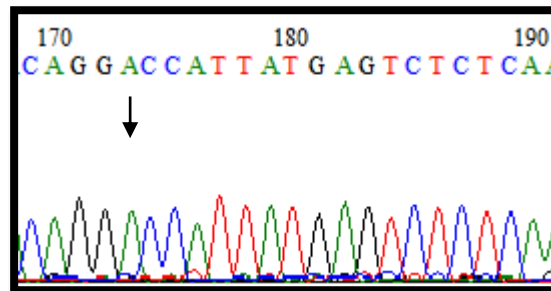


Figura 21. Electroferograma del genotipo 2756AA del gen *MTR*

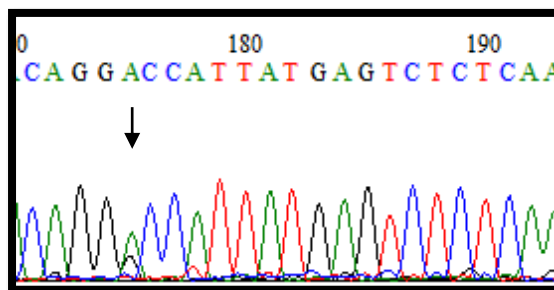


Figura 22. Electroferograma del genotipo 2756AG del gen *MTR*

5.6.3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A2756G del gen *MTR*

Se analizaron 33 muestras de pacientes con CM y 16 muestras de control. De las 33 muestras de pacientes, 96,97% presentó el genotipo homocigoto 2756AA y 3,03% el genotipo heterocigoto 2756AG. No hubo presencia del genotipo homocigoto 2756GG en el grupo de pacientes. En las muestras control la frecuencia genotípica fue de 100% para los homocigotos

2756AA, no se encontraron los genotipos 2756AG ni 2756GG en este grupo (gráfico 5). La distribución de los genotipos en las pacientes se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($X^2=0,01$ $p=0,93$), sin embargo, en el grupo control no fue determinado debido a la ausencia de muestras con los genotipos heterocigotos y homocigotos recesivos.

Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo A presentó una frecuencia de 0,98 en las muestras de pacientes y 1,0 en el grupo de control. El alelo G presentó una frecuencia de 0,02 en las muestras de pacientes (tabla 13).

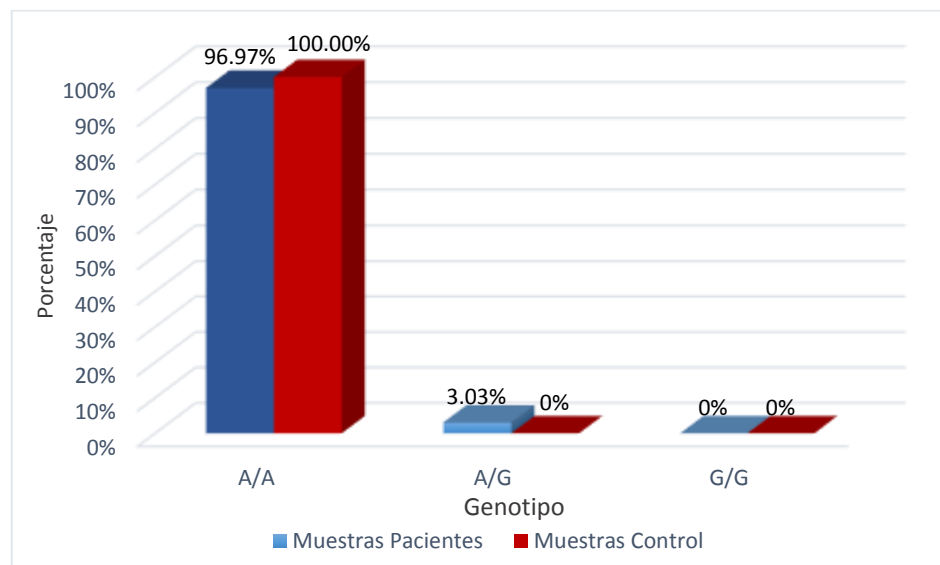


Gráfico 5. Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo A2756 del gen *MTR*

Tabla 13. Frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo A2756G del gen *MTR*

Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica		
Genotipo	Muestras pacientes n= 33 (%)	Muestras control n= 16 (%)	Alelo	Muestras pacientes n= 33	Muestras control n= 16
2756AA	32 (96,97%)	16 (100%)	A	0,98	1,0
2756AG	1 (3,03%)	0 (0%)			
2756GG	0 (0%)	0 (0%)	G	0,02	0

5.7. Análisis estadístico

Una vez determinadas las frecuencias genotípicas y alélicas de todos los polimorfismos en estudio, se procedió a evaluar las asociaciones de los mismos con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, así como también, a determinar si había significancia estadística entre la distribución de los polimorfismos y alelos con los datos moleculares del tumor, características clínicas de las pacientes, edad, IMC, historia reproductiva, alcoholismo y tabaquismo. Además, se combinaron los genotipos y alelos de los polimorfismos en los genes *TYMS* y *MTHFR* para determinar si juntos tenían también significancia estadística.

Fueron aplicados los test de ji-cuadrado (X^2), test G, test exacto de Fisher y *Odds Ratio* (OR) en los programas BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007) y *GraphPad Prism 5 version 5.01* (*GraphPad Software, Inc.*). Se consideraron valores de *p* menores que 0,05 como estadísticamente significativos.

5.7.1 Distribución de los genotipos en los grupos evaluados

Se realizó un análisis de distribución aplicando el test de ji-cuadrado (X^2) para determinar si había diferencias significativas en la distribución genotípica de los distintos polimorfismos entre los grupos de pacientes y de control. Además, se calculó el *OR* y se aplicó el test G y el test exacto de Fisher para determinar si había alguna asociación entre los genotipos y alelos con la presencia de la enfermedad.

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con cáncer de mama y el grupo control (tabla 14). Tampoco se encontró asociación significativa entre los distintos genotipos y alelos con los grupos evaluados (tabla 15.)

Tabla 14. Distribución de los genotipos de los diferentes polimorfismos en los grupos evaluados

Polimorfismo/Genotipo	Pacientes	Controles	
TSER			
2R/2R	7	4	$X^2=1,68$
2R/3R	25	11	$p=0,642$
3R/3R	28	20	
1494del6			
+6/+6	26	9	$X^2=2,75$
+6/-6	24	18	$p=0,253$
-6/-6	11	8	
C677T			
CC	31	18	$X^2=3,89$
CT	24	17	$p=0,143$
TT	6	0	
A1298C			
AA	25	7	$X^2=0,821$
AC	33	9	$p=0,663$
CC	3	0	
A2756G			
AA	32	16	$X^2=0,495$
AG	1	0	$p=0,482$
GG	0	0	

Tabla 15. Asociación de los genotipos y alelos entre los grupos evaluados

TSER		
3R/3R vs 2R/2R	OR=1,247	<i>p</i> =0,949
3R/3R vs 2R/3R	OR=1,505	<i>p</i> =0,516
3R/3R vs (2R/3R + 2R/2R)	OR=1,455	<i>p</i> =0,538
2R/3R vs 2R/2R	OR=0,823	<i>p</i> =0,946
(3R/3R+2R/3R) vs 2R/2R	OR= 1,442	<i>p</i> =0,851
3R vs 2R	OR= 1,194	<i>p</i> =0,677
1494del6		
-6/-6 vs +6/+6	OR=0,351	<i>p</i> =0,476
-6/-6 vs +6/-6	OR=1,03	<i>p</i> =0,822
-6/-6 vs (+6/-6 + +6/+6)	OR=0,760	<i>p</i> =0,743
-6/+6 vs +6/+6	OR=0,462	<i>p</i> =0,184
(-6/-6 + +6/-6) vs +6/+6	OR=0,466	<i>p</i> =0,151
-6 vs +6	OR=0,641	<i>p</i> =0,188
C677T		
TT vs CC	OR= -	<i>p</i> =0,092
TT vs CT	OR= -	<i>p</i> =0,074
TT vs (CC+CT)	OR= -	<i>p</i> =0,083
CT vs CC	OR=0,812	<i>p</i> =0,809
(TT+CT) vs CC	OR=1,025	<i>p</i> =0,877
T vs C	OR= 1,305	<i>p</i> =0,541
A1298C		
CC vs AA	OR= -	<i>p</i> =1,00
CC vs AC	OR= -	<i>p</i> =1,00
CC vs (AA+AC)	OR= -	<i>p</i> =0,600
AC vs AA	OR=1,09	<i>p</i> =0,893
(CC+AC) vs AA	OR=1,120	<i>p</i> =0,932
C vs A	OR=1,201	<i>p</i> =0,839
A2756G		
AA vs AG	OR= -	<i>p</i> = -
G vs A	OR= -	<i>p</i> = -

5.7.2. Asociación entre los genotipos encontrados y las características de las muestras de pacientes

Cuando se realizó el análisis de asociación entre los genotipos encontrados y las características de las muestras de pacientes, aplicando el test de ji-cuadrado (X^2), solo se encontró significancia estadística en las distribuciones del polimorfismo TSER y la edad, el polimorfismo C677T y el consumo de cigarro, y el polimorfismo A2756G y el consumo de cigarro y alcohol (tabla 16).

Tabla 16. Asociación entre los genotipos encontrados y las características de las muestras de pacientes

Característica	TSER	1494del6	C677T	A1298C	A2756G
Edad	$X^2= 6,743$	$X^2= 4,402$	$X^2= 2,029$	$X^2= 1,674$	$X^2= 1,805$
	$p= 0,034$	$p= 0,111$	$p= 0,363$	$p= 0,433$	$p= 0,614$
Color	$X^2= 0,921$	$X^2= 3,784$	$X^2= 2,972$	$X^2= 4,317$	$X^2= 2,750$
	$p= 0,922$	$p= 0,436$	$p= 0,563$	$p= 0,365$	$p= 0,253$
IMC	$X^2= 6,945$	$X^2= 4,312$	$X^2= 4,424$	$X^2= 7,889$	$X^2= 1,472$
	$p= 0,326$	$p= 0,635$	$p= 0,610$	$p= 0,246$	$p= 0,688$
Menarquía	$X^2= 2,325$	$X^2= 0,522$	$X^2= 1,310$	$X^2= 3,712$	$X^2= 0,516$
	$p= 0,3013$	$p= 0,770$	$p= 0,519$	$p= 0,156$	$p= 0,473$
Gestación	$X^2= 1,004$	$X^2= 1,256$	$X^2= 0,627$	$X^2= 1,528$	$X^2= 0,067$
	$p= 0,605$	$p= 0,534$	$p= 0,731$	$p= 0,156$	$p= 0,797$
Menopausia	$X^2= 2,533$	$X^2= 4,863$	$X^2= 0,595$	$X^2= 1,871$	$X^2= 1,238$
	$p= 0,282$	$p= 0,088$	$p= 0,743$	$p= 0,393$	$p= 0,266$
Historia familiar	$X^2= 4,667$	$X^2= 2,035$	$X^2= 0,441$	$X^2= 1,046$	$X^2= 0,448$
	$p= 0,097$	$p= 0,362$	$p= 0,802$	$p= 0,593$	$p= 0,503$
Tabaquismo	$X^2= 1,668$	$X^2= 0,582$	$X^2= 8,437$	$X^2= 0,668$	$X^2= 4,641$
	$p= 0,434$	$p= 0,748$	$p= 0,015$	$p= 0,716$	$p= 0,031$
Alcoholismo	$X^2= 2,095$	$X^2= 2,049$	$X^2= 0,545$	$X^2= 3,632$	$X^2= 10,31$
	$p= 0,351$	$p= 0,359$	$p= 0,761$	$p= 0,163$	$p= 0,001$

5.7.3. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas y la clasificación molecular del tumor

Al aplicar el test de ji-cuadrado (X^2) solo se encontró significancia estadística en la distribución de los alelos +6 y -6 del polimorfismo *1494del6* del gen *TYMS* (tabla 17).

Tabla 17. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas y la clasificación molecular del tumor

Clasificación molecular	Genotipos			Alelos	
	2R/2R	2R/3R	3R/3R	2R	3R
Luminal A	2 (3,33%)	3 (5,00%)	2 (3,33%)	7 (5,83%)	7 (5,83%)
Luminal B	4 (6,67%)	13 (21,67%)	11 (18,33%)	21 (17,50%)	35 (29,17%)
HER-2 Positivo	1 (1,67%)	3 (5,00%)	4 (6,66%)	5 (4,17%)	11 (9,17%)
TNBC	1 (1,67%)	8 (13,33%)	8 (13,33%)	10 (8,33%)	24 (20,00%)
			$X^2= 2,664$	$p= 0,850$	$X^2= 2,096$
1494del6					
	+6/+6	+6/-6	-6/-6	+6	-6
Luminal A	6 (9,84%)	1 (1,64%)	0 (0,00%)	13 (10,66%)	1 (0,82%)
Luminal B	11 (18,03%)	12 (19,68%)	5 (8,20%)	34 (27,87%)	22 (18,03%)
HER-2 Positivo	1 (1,64%)	5 (8,20%)	3 (4,92%)	7 (5,74%)	11 (9,02%)
TNBC	8 (13,11%)	6 (9,84%)	3 (4,92%)	22 (18,03%)	12 (9,84%)
			$X^2= 7,262$	$p= 0,298$	$X^2= 9,909$
C677T					
	CC	CT	TT	C	T
Luminal A	2 (3,28%)	4 (6,56%)	1 (1,64%)	8 (6,56%)	6 (4,92%)
Luminal B	16 (26,23%)	8 (13,12%)	4 (6,56%)	40 (32,79%)	16 (13,11%)
HER-2 Positivo	5 (8,20%)	3 (4,92%)	1 (1,64%)	13 (10,66%)	5 (4,10%)
TNBC	8 (13,11%)	9 (14,75%)	0 (0,00%)	25 (20,49%)	9 (7,38%)
			$X^2= 5,652$	$p= 0,463$	$X^2= 1,400$
A1298C					
	AA	AC	CC	A	C
Luminal A	3 (4,92%)	4 (6,56%)	0 (0,00%)	10 (8,20%)	4 (3,28%)
Luminal B	9 (14,76%)	18 (29,50%)	1 (1,64%)	36 (29,52%)	20 (16,39%)
HER-2 Positivo	4 (6,56%)	3 (4,92%)	2 (3,28%)	11 (9,02%)	7 (5,74%)
TNBC	9 (14,75%)	8 (13,11%)	0 (0,00%)	26 (21,31%)	8 (6,56%)
			$X^2= 9,345$	$p= 0,155$	$X^2= 1,945$
A2756G					
	AA	AG	GG	A	G
Luminal A	3 (9,10%)	1 (3,03%)	0 (0,00%)	7 (10,61%)	1 (1,52%)
Luminal B	15 (45,45%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	30 (45,45%)	0 (0,00%)
HER-2 Positivo	4 (12,12%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	8 (12,12%)	0 (0,00%)
TNBC	10 (30,30%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	20 (30,30%)	0 (0,00%)
			$X^2= 7,477$	$p= 0,582$	$X^2= 7,362$
$p= 0,061$					

5.7.4. Combinación de genotipos en los genes *TYMS* y *MTHFR*

Al realizar la distribución de las combinaciones de los genotipos de los polimorfismos TSER/1494del6 de *TYMS* y C677T/A1298C de *MTHFR*, tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de pacientes y el grupo control cuando se aplicó el test de ji-cuadrado (X^2) (tabla 18).

Tabla 18. Combinación de genotipos en *TYMS* y *MTHFR*

Combinación	Pacientes	Controles	
Todos TSER con +6/+6			
2R/2R,+6/+6	5 (8,20%)	2 (5,71%)	$X^2= 0,801$
2R/3R,+6/+6	13 (21,31%)	3 (8,57%)	$p= 0,670$
3R/3R,+6/+6	8 (13,11%)	4 (11,43%)	
Todos TSER con +6/-6			
2R/2R,+6/-6	2 (3,28%)	0 (0,00%)	$X^2= 5,590$
2R/3R,+6/-6	9 (14,75%)	3 (8,57%)	$p= 0,133$
3R/3R,+6/-6	12 (19,67%)	15 (42,86%)	
3R/4R,+6/-6	1 (1,64%)	0 (0,00%)	
Todos TSER con -6/-6			
2R/2R,-6/-6	1 (1,64%)	2 (5,71%)	$X^2= 1,223$
2R/3R,-6/-6	8 (13,11%)	4 (11,43%)	$p= 0,542$
3R/3R,-6/-6	2 (3,28%)	2 (5,71%)	
677CC con A1298C			
CC,AA	10 (16,39%)	2 (12,5%)	$X^2= 0,569$
CC,AC	19 (31,14%)	5 (31,25%)	$p= 0,752$
CC,CC	2 (3,28%)	0 (0,00%)	
677CT con A1298C			
CT,AA	11 (18,03%)	5 (31,25%)	$X^2= 0,544$
CT,AC	12 (19,67%)	4 (25%)	$p= 0,762$
CT,TT	1 (1,64%)	0 (0,00%)	
677TT con A1298C			
TT,AA	4 (6,56%)	0 (0,00%)	$X^2= -$
TT,AC	2 (3,28%)	0 (0,00%)	$p= -$

Una vez realizados los análisis estadísticos, se procedió a reevaluar aquellos resultados que fueron estadísticamente significativos, como la distribución del polimorfismo TSER respecto a la edad de las pacientes, la distribución de los polimorfismos C677T y A2756G respecto al consumo de tabaco, la distribución del polimorfismo A2756G con el consumo de alcohol y la distribución del polimorfismo *1494del6* en los diferentes tipos moleculares del tumor.

Se evaluó la distribución del alelo 3R del polimorfismo TSER con la edad en el grupo de pacientes, obteniéndose un $OR=2,364$; $p=0,164$. Igualmente, se evaluó la distribución del alelo T del polimorfismo C677T con respecto al consumo de tabaco, encontrando un $OR=5,273$; $p=0,074$. Para el caso de la distribución del alelo G del polimorfismo 2756AG con respecto al consumo de tabaco y alcohol, no se encontró asociación significativa ($p=0,182$ y $p=0,09$).

En cuanto a la distribución de los alelos +6 y -6 del polimorfismo *1494del6* de *TYMS* con la clasificación molecular del tumor, se compararon los tipos de tumores de peor pronóstico (HER2-positivos + TNBC) con los de mejor pronóstico (luminales A y B), encontrándose un $OR=1,621$; $p=0,274$. En el caso del polimorfismo TSER de *TYMS*, para la distribución de los alelos 2R y 3R, se encontró un $OR= 1,623$; $p=0,606$. Igualmente, se realizó el mismo análisis para todos los polimorfismos, sin embargo, los resultados no arrojaron factores de riesgo estadísticamente significativos.

6. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en las mujeres, con más de 2 millones de casos mundiales por año (*International Agency for Research on Cancer*, 2018), sin embargo, hoy en día, ha habido un cambio significativo en la etapa de CM recién diagnosticado, y se ha refinado el conocimiento de la biología de la enfermedad, por lo que la estratificación del riesgo por subtipos moleculares permite definir terapias menos tóxicas. El enfoque clínico multidisciplinario para el tratamiento del CM (cirugía, radiología, patología, oncología médica, radioterapia y cirugía reconstructiva), así como el enfoque traslacional de la investigación del cáncer de mama, son ahora los modelos para otros tipos de cáncer (Ganz; Goodwin, 2015).

Los avances en investigación epidemiológica y clínica de los últimos años, han permitido identificar una serie de factores de riesgo del CM relacionados con la historia reproductiva, estilo de vida de las mujeres y otros de origen diverso que incrementan la posibilidad de presentar la enfermedad (Pérez; Sandoval; Tapia, 2009).

Recientemente, se ha demostrado la asociación de polimorfismos en algunos genes como posibles factores en la etiología de la enfermedad. Marcadores moleculares relacionados al CM se han descrito como posibles factores de riesgo, siendo estudiados como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y prevención. Entre ellos se encuentran el gen *TYMS*, y, posiblemente, los genes *MTHFR* y *MTR* (da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012; He; Shen, 2017; Lissowska et al., 2007).

En este estudio se evaluó la distribución de los polimorfismos TSER y *1494del6* del gen *TYMS*, los polimorfismos C677T y A1298C del gen *MTHFR* y el polimorfismo A2756G del gen *MTR*, en pacientes con tumores de mama en la población paraense para determinar si había asociación entre alguno de ellos y la presencia de la enfermedad.

Cuando se comparó la distribución de la edad en el grupo de pacientes con cáncer de mama y el grupo control, se encontró que ser mayor de 50 años de edad es un factor de riesgo para esta enfermedad (OR= 4,86, $p= 0,001$) concordando con la literatura, que reporta la edad como uno de los principales factores de riesgo para el cáncer de mama, sobre todo para aquellas mujeres mayores o iguales a 50 años, por ello, la OMS recomienda realizar exámenes de detección precoz, ya que, cuando es detectado en fases iniciales aumenta la posibilidad de tratamientos menos agresivos y con tasas de éxito satisfactorias (INCA, 2017; *American Cancer Society*, 2017).

En cuanto a la raza de las mujeres, no se encontró diferencia significativa en la distribución en el grupo de pacientes ($p= 0,137$). Para el caso del IMC, más del 70% de las pacientes presentó sobrepeso ($p= 0,005$). Se ha observado mayor riesgo de cáncer de mama en aquellas mujeres con pobre consumo de frutas y vegetales, consumo excesivo de carnes rojas y de grasas saturadas, sobrepeso u obesidad y por un estilo de vida sedentario, esto es explicado por varios mecanismos como el incremento de niveles de estrógeno y testosterona, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, incremento en la inflamación y depresión en la función inmune (Stephenson; Rose, 2003; Pérez; Sandoval; Tapia, 2009).

Los factores reproductivos también son considerados como factores de riesgo para el CM. En este estudio, la mayoría de las pacientes no presentó menarquía temprana (63,9%) y aún no habían entrado a la menopausia (62,3%), además, la mayoría de ellas reportó ser multíparas (91,8%). Estas tendencias encontradas son contrarias a las reportadas, sin embargo, esta tendencia podría ser revertida aumentando el tamaño de la muestra. Menarquía precoz, menor o igual a 12 años de edad, menopausia tardía, nuliparidad, ausencia de lactancia materna, uso de anticonceptivos y reposición hormonal por más de cinco años son considerados factores de riesgo para esta enfermedad. Estudios sugieren que el uso reciente de anticonceptivos orales (estrógeno y progesterona) está asociado a un incremento en el CM, particularmente en mujeres que los usan antes de los 20 años de edad, o antes de su primer embarazo. En comparación con la nuliparidad, una mayor paridad se ha asociado con un riesgo sustancialmente menor de CM luminal A (INCA, 2017, *American Cancer Society*, 2017; Barnard; Boeke; Tamimi, 2015).

Otro de los factores de riesgo para el CM es el histórico familiar. La presencia de casos de CM en la familia, incluso en hombres, y cáncer de ovario, aumentan la posibilidad de presentar esta enfermedad (INCA, 2017). No obstante, en este estudio la mayoría de las pacientes (67,21%) reportó no haber tenido casos de CM en su familia.

Según la *American Cancer Society* (2017) un gran número de investigaciones indican que fumar puede aumentar levemente el riesgo de CM, particularmente el tabaquismo intenso a largo plazo y entre las mujeres que comienzan a fumar antes de su primer embarazo. También, numerosos estudios han confirmado que el consumo de alcohol aumenta el riesgo de CM en las mujeres en aproximadamente un 7% -10% por cada 10 g (aproximadamente una bebida) de alcohol consumido por día en promedio. Las mujeres que toman 2-3 bebidas alcohólicas por día tienen un riesgo 20% mayor de CM en comparación con las no bebedoras. Además, hay evidencia de que el consumo de

alcohol antes del primer embarazo puede afectar particularmente el riesgo. Uno de los mecanismos por los cuales el alcohol aumenta el riesgo es aumentando los niveles de estrógeno y andrógeno (*American Cancer Society*, 2017). Solo el 16,38% y 6,56% de las pacientes reportó haber tenido hábitos de consumo de tabaco y alcohol, sin embargo, esos resultados reportados en la ingesta de alcohol podrían no ser tan ciertos, debido a que muchas personas no consideran el consumo social de alcohol como hábito, por tanto, debe hacerse un abordaje más minucioso durante la entrevista.

El CM presenta un grupo de tumores que tiene un comportamiento biológico diferente. Las características clínicas histológicas han sido utilizadas para la definición de los diferentes factores pronósticos y de tratamiento; sin embargo, esta clasificación histológica no refleja la heterogeneidad de los tumores en su comportamiento biológico, ni permite identificar los pacientes que presentarán mejores respuestas y beneficios con las diferentes modalidades terapéuticas. Los estudios inmunohistoquímicos del CM revelan la expresión de determinadas proteínas en las células tumorales, por lo que se podrían considerar un reflejo de la biología molecular tumoral, así como una posible alternativa a los estudios genéticos. En nuestras muestras, 11,48% presentó el subtipo luminal A, 45% el subtipo luminal B, 14,75% el subtipo HER2-positivo y 27,87% el subtipo TNBC. El carcinoma de tipo luminal A es un subtipo con mejor pronóstico con mayor sensibilidad endocrina, en tanto que el tipo luminal B tiene un mal pronóstico. Los carcinomas de tipo HER2-positivo y TNBC son aún de peor pronóstico, siendo este último el que presenta el comportamiento más agresivo (Untch et al., 2013; Vuong et al., 2014; Bonilla; Matute; Severiche, 2015; Karsli-Ceppioglu et al., 2017).

De acuerdo a la *American Cancer Society* (2017) la mayoría de los CM pertenecen al subtipo luminal A (71%), seguidos por los subtipos luminal B y TNBC (12% cada uno) y, por último, el menos común, el subtipo HER2-positivo (5%). Las distribuciones en nuestro estudio arrojaron una mayor presencia de los subtipos luminales (A y B, 57,38%), seguido del TNBC y HER2-positivo. Estudios en poblaciones colombianas y brasileras también reportan porcentajes similares (Bonilla; Matute; Severiche, 2015; Carvalho et al., 2014).

Con respecto a los polimorfismos evaluados en este estudio, en el gen *TYMS*, en la región 5'-UTR, se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TSER. El genotipo más frecuente encontrado en el grupo de pacientes fue el heterocigoto para dos y tres repeticiones (2R/3R) con una frecuencia de 45,90%, seguido del genotipo con tres repeticiones (3R/3R) con 40,98%, y el homocigoto para dos repeticiones (2R/2R) con 11,48%, además, en una

de las muestras de pacientes se encontró el genotipo heterocigoto de tres y cuatro repeticiones (3R/4R, 1,64%). Las frecuencias genotípicas en los controles fueron de 11,43%, 31,43% y 57,14% para las variantes 2R/2R, 3R/3R y 2R/3R. No se encontró diferencia significativa en la distribución de los genotipos entre el grupo de pacientes y controles.

Los diferentes genotipos de TSER están distribuidos de manera variable en los distintos grupos poblacionales (tabla 19). En la población china se ha reportado que los homocigotos 3R/3R tienen una frecuencia de 67%; los heterocigotos 2R/3R tienen frecuencia de 31% y los homocigotos 2R/2R, 2% (Marsh et al., 1999). Gao et al. (2012) reportan frecuencias muy similares en la población china (66%, 29,4% y 4,6%, respectivamente). En el sureste asiático los homocigotos 3R/3R presentan una frecuencia de 40%, los heterocigotos 2R/3R frecuencia de 44% y los homocigotos 2R/2R, 16%. En caucásicos, las frecuencias reportadas fueron de 38%, 43% y 19% para los tres genotipos correspondientes (Marsh et al., 1999; Gao et al., 2012).

Estudios en el estado de Texas, USA, reportaron frecuencias genotípicas de 29%, 48% y 23% para 3R/3R, 2R/3R y 2R/2R, respectivamente (Zhang et al., 2004). Otro estudio en caucásicos americanos reportó frecuencias genotípicas de 27% para 3R/3R, 54% para 2R/3R, y 19% para 2R/2R. Poblaciones africanas presentan frecuencias respectivas de 29%, 48% y 14%, el otro 9% está representados por repeticiones 4R y 9R (Marsh et al., 2000).

En Latinoamérica, en una población chilena, las frecuencias para estos tres genotipos fueron de 29%, 48% y 23% (Acuña; Eaton; Massardo, 2006). En un estudio en México se encontraron frecuencias de 36%, 48% y 16% para los tres genotipos correspondientes, y, en Brasil, se reportaron frecuencias de 36%, 37% y 27% (Quintero-Ramos et al., 2014; da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012).

En general, la distribución de las frecuencias genotípicas encontradas en nuestro estudio se corresponde a la mayoría de las frecuencias reportadas (a excepción en China), en la que el genotipo 2R/3R es el más común, seguido del homocigoto para 3R y por último el homocigoto para 2R. Además, en nuestro grupo de pacientes se encontró un alelo 4R en condición heterocigota, 3R/4R, esto puede ser debido al aporte del continente africano en Brasil y el proceso de mestizaje, ya que el alelo 4R se ha reportado, con altas frecuencias, en poblaciones africanas (Marsh et al., 2000).

Las frecuencias alélicas encontradas en nuestro estudio fueron de 0,60 y 0,65 para el alelo 3R y 0,40 y 0,34 para el 2R en el grupo control y de pacientes, respectivamente. El alelo 4R se presentó en una frecuencia de 0,01 en el grupo de pacientes. La distribución de las frecuencias

alélicas en nuestro estudio es comparable a la distribución de los mismos alelos en diferentes poblaciones, como en caucásicos y poblaciones del Sudeste Asiático, China y Japón, así como en México, Chile y Brasil, en donde el alelo 3R está presente en mayor proporción que el 2R (Marsh et al., 1999; Gao et al., 2012; Kumagai et al., 2003 (Acuña; Eaton; Massardo, 2006; Quintero-Ramos et al., 2014; da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012, Araujo et al, 2015).

Tabla 19. Distribución del polimorfismo TSER de *TYMS* en diferentes poblaciones

Población	2R/2R	2R/3R	3R/3R	Referencia
China	2%	31%	67%	Marsh et al. (1999)
China	4,6%,	29,4%	66%	Gao et al. (2012)
Sudeste asiático	16%	44%	40%	Marsh et al. (1999)
Caucásicos	19%	43%	38%	Marsh et al. (1999)
Texas, USA	23%	48%	29%	Zhang et al., 2004
Africanos	14%	48%	29%	Marsh et al., 2000
Chile	23%	48%	29%	Acuña; Eaton; Massardo (2006)
México	16%	48%	36%	Quintero-Ramos et al. (2014)
Brasil	27%	37%	36%	da Silva; de Lima; Bertuzzo (2012)
Presente estudio	11,43%	57,14%	31,43%	

*Todas las comparaciones se realizaron entre los grupos controles.

Para el polimorfismo *1494del6* del gen *TYMS* también fueron calculadas las frecuencias genotípicas y alélicas, obteniéndose, en pacientes y controles, frecuencias de 42,63% y 25,71% para el genotipo homocigoto +6/+6, 39,34% y 51,43% para el genotipo heterocigoto +6/-6, y 18,03% y 22,86% para el genotipo homocigoto -6/-6. Estas distribuciones no presentan diferencias significativas entre pacientes y controles.

La distribución de los genotipos relacionados con este polimorfismo varía de acuerdo a la población (tabla 20); así, en una población china el genotipo +6pb/+6pb se encontró con una frecuencia de 9,8%, el genotipo +6pb/-6pb con frecuencia de 44,9% y el genotipo -6pb/-6pb con frecuencia de 45,3% (Gao et al., 2002) Otros estudios reportan, en China, frecuencias de 5%, 39% y 56% para esos tres genotipos (Mandola et al., 2004). En Japón, las frecuencias respectivas para

esos genotipos fueron de 55%, 41% y 4% (Fujishima et al., 2010). En la India, las frecuencias halladas fueron de 90,55% y 9,44% para los genotipos +6/+6 y +6/-6 (Kalyana; Mohana; Kaiser, 2009). En muestras poblacionales de Portugal, el genotipo +6pb/+6pb se encontró con una frecuencia de 37,3%; el genotipo +6pb/-6pb con frecuencia de 51,8% y el y el genotipo -6pb/-6pb con frecuencia de 10,9% (Carmona et al., 2008). En España se reportaron frecuencias de 44,5%, 40% y 15,5% para los genotipos +6pb/+6pb, +6pb/-6pb y -6pb/-6pb, respectivamente (Patiño-García, 2009). Para poblaciones caucásicas, las frecuencias de los tres genotipos fueron de 40%, 38% y 22%, en hispanos 58%, 33% y 9% y en afroamericanos 25%, 46% y 29% (Mandola et al., 2004).

Para Latinoamérica, en un estudio en Venezuela se encontraron frecuencias de 39%, 45% y 16% para los genotipos +6pb/+6pb, +6pb/-6pb y -6pb/-6pb, respectivamente, y, en México, las frecuencias de estos genotipos fueron de 46%, 43% y 11%, (Villegas et al., 2015; Gallegos-Arreola et al., 2008).

Las distribuciones de las frecuencias genotípicas de nuestro estudio se corresponden con las encontradas en las poblaciones afroamericanas y poblaciones de Portugal y de Venezuela, en donde el genotipo predominante es el heterocigoto, seguido del genotipo +6/+6 y por último el genotipo -6/-6.

Con respecto a las frecuencias alélicas, en nuestro estudio el alelo dominante fue el +6, con frecuencias de 0,62 y 0,51 en las muestras de pacientes y controles, respectivamente. El alelo -6 presentó frecuencias respectivas de 0,38 y 0,49 en pacientes y controles. Esas distribuciones son comparables a la distribución en poblaciones caucásicas, hispanas, afroamericanas, brasileras, portuguesas y venezolanas, en donde también predomina el alelo +6. Sin embargo, en poblaciones chinas, el alelo -6 se encuentra en mayor frecuencia que el +6 (Mandola et al., 2004; Carmona et al., 2008; Villegas et al., 2015; Araujo et al, 2015; Gao et al., 2002).

Tabla 20. Distribución del polimorfismo *1494del6* de *TYMS* en diferentes poblaciones

Población	+6/+6	+6/-6	-6/-6	Referencia
China	9,8%	44,9%	45,3%	Gao et al. (2012)
China	5%	39%	56%	Mandola et al. (2004)
Japón	55%	41%	4%	Fujishima et al. (2010)
India	91%	9%	0%	Kalyana; Mohana; Kaiser (2009)
Portugal	37%	52%	11%	Carmona et al.2(008)
España	45%	40%	15%	Patiño-García2(009).
Caucásicos	40%	38%	22%,	Mandola et al. (2004)
Hispanos	58%	33%	9%	Mandola et al. (2004)
Afroamericanos	25%	46%	29%	Mandola et al. (2004)
Venezuela	39%	45%	16%	Villegas et al. (2015)
México	46%	43%	11%	Gallegos-Arreola et al., 2008).
Presente estudio	26%	51%	23%	

*Todas las comparaciones se realizaron entre los grupos controles.

Fueron determinadas también las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*, en donde el genotipo homocigoto 677CC se encontró en mayor proporción tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control, con frecuencias de 50,82% y 51,42%, respectivamente. Le siguió, en proporción, el genotipo heterocigoto 677CT, con frecuencias de 39,34% y 48,57% en el grupo de pacientes y control y, por último, el genotipo homocigoto 677TT, con frecuencia de 9,84% en el grupo de pacientes y ausente en los controles. Todas estas distribuciones no presentan diferencias significativas entre pacientes y controles.

En la tabla 21 se muestra la distribución de los genotipos del polimorfismo C677T en diferentes poblaciones. El genotipo 677CC presenta frecuencias de 45,1% en caucásicos, 46,5% en asiáticos del este, 73% en asiáticos del sur, 41,8% en Oriente Medio, 44,3% en norteamericanos, 49,4% en brasileros, 29,5% en colombianos y 38% en ecuatorianos. Otro estudio en la región Sudeste de Brasil reporta una frecuencia de 49% para este genotipo. El genotipo 677CT, para esas mismas poblaciones presenta frecuencias de 43,6%, 41,3%, 24%, 44,6%, 43,1%, 40%, 50%, 61% y 40,2% respectivamente. Las frecuencias para el genotipo 677TT respectivas para esas poblaciones son 11,3%, 12,2%, 3%, 13,6%, 12,6%, 10,7%, 20,5%, 1% y 10,8%. En poblaciones

árabes, turcas e italianas, las frecuencias de los homocigotos 677CC fue de 64,2%, 48,7 y 29,2%, la frecuencia de los heterocigotos 677CT fue de 32,1%, 40% y 48,7%, y la frecuencia de los homocigotos 677TT fue de 3,7%, 11,3% y 22,1% (Gonzales; Yu; Shiao, 2017; Rengifo; Gaviria, 2014; Barbosa et al., 2016; López-Cortés et al., 2013; Raina et al., 2016).

En el presente estudio, la mayor frecuencia genotípica encontrada fue en los homocigotos 677CC, al igual que en poblaciones caucásicas, asiáticas, norteamericanas y brasileñas, presentando diferencias con las poblaciones colombianas y ecuatorianas, en donde el genotipo heterocigoto es el que se encuentra con mayor frecuencia. El genotipo homocigoto 677TT se presentó en menor frecuencia en todas las poblaciones mencionadas, y, en nuestro estudio, este genotipo solo se encontró en las muestras de pacientes más no en el grupo control, esto pudo deberse a que el número de muestras no fue suficiente para encontrar este genotipo recesivo en ese grupo, comparado con el muestreo en los estudios mencionados.

Para el caso de las frecuencias alélicas, éstas fueron muy similares en el grupo de pacientes y controles, con frecuencias respectivas de 0,70 y 0,76 para el alelo C y 0,30 y 0,24 para el alelo T. Estudios en Colombia y Brasil también reportan al alelo C como el más frecuente, de igual modo lo reportan como más frecuentes en poblaciones de la India, Arabia y Turquía (Rengifo; Gaviria, 2014; Araujo et al., 2015; Raina et al., 2016).

Tabla 21. Distribución del polimorfismo C677T de *MTHFR* en diferentes poblaciones

Población	CC	CT	TT	Referencia
Caucásicos	45,1%	43,6%	11,3%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Este asiático	46,5%	41,3%	12,2%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Sudeste asiático	73%	24%	3%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Oriente Medio	41,8%	44,6%	13,6%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Norte América	44,3%	43,1%	12,6%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Brasil	49,4%	40%	10,7%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Sudeste de Brasil	49%	40,2%	10,8%	Barbosa et al. (2016)
Colombia	29,5%	50%	20,5%	Rengifo; Gaviria (2014)
Ecuador	38%	40,2%	1%	López-Cortés et al. (2013)
Arabia	64,2%	32,1%	3,7%	Raina et al. (2016)
Turquía	48,7%	40%	11,3%	Raina et al. (2016)
Italia	29,2%	48,7%	22,1%	Raina et al. (2016)
Presente estudio	51,42%	48,57%	0%	

*Todas las comparaciones se realizaron entre los grupos controles.

Para el polimorfismo A1298C de *MTHFR* también fueron determinadas las frecuencias genotípicas y alélicas, encontrándose, sin diferencias significativas en la distribución entre los grupos de pacientes y controles, frecuencias de 40,98% y 43,75% en los homocigotos 1298AA, 54,10% y 56,25% en heterocigotos 1298AC y 4,92% en homocigotos 1298CC en las pacientes.

En la tabla 22 se muestra la distribución de los genotipos del polimorfismo A1298C en diferentes poblaciones. El genotipo 1298AA presenta frecuencias de 42,9% en caucásicos, 60,1%, en asiáticos del este, 56,5%, en asiáticos del sur, 45,2% en Oriente Medio, 52,3% en norte americanos, 54% en brasileiros, 66,5% en colombianos y 98% en ecuatorianos. El genotipo 1298AC, para esas mismas poblaciones presenta frecuencias de 42,5%, 34,4%, 38,2%, 44,2%, 39,3%, 40,9%, 33% y 1% respectivamente. Las frecuencias respectivas para el genotipo 1298CC en esas poblaciones son 14,6%, 5,6%, 5,3%, 10,6%, 8,4%, 5,1%, 0,5% y 1% (Gonzales; Yu; Shiao, 2017; Rengifo; Gaviria, 2014; López-Cortés et al., 2013). Otros estudios reportan, en una población china, frecuencias de 56,57% para homocigotos 1298AA, 38,89% heterocigotos 1298AC, y 4,55% homocigotos 1298CC. En otro estudio norteamericano, las frecuencias para esos genotipos fueron de 48,86%, 41,17% y 9,97% (Liu et al., 2016).

Nuestras distribuciones genotípicas se corresponden a las reportadas en los estudios antes mencionados, en donde el genotipo homocigoto 1298AA es el más frecuente en todas las poblaciones. De igual modo se corresponden las distribuciones de las frecuencias alélicas, siendo, el alelo A el más frecuente en todos los estudios mencionados.

Tabla 22. Distribución del polimorfismo A1298C de *MTHFR* en diferentes poblaciones

Población	AA	AC	CC	Referencia
Caucásicos	42,9%	42,5%	14,6%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Este asiático	60,1%	34,4%	5,6%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Sudeste asiático	56,5%	38,2%	5,3%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Oriente Medio	45,2%	44,2%	10,6%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Norte América	52,3%	39,3%	8,4%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Brasil	54%	40,9%	5,1%	Gonzales; Yu; Shiao (2017)
Colombia	66,5%	33%	0,5%	Rengifo; Gaviria (2014)
Ecuador	98%	1%	1%	López-Cortés et al. (2013)
China	56,57%	38,89%	4,55%	Liu et al., 2016
Presente estudio	44%	56%	0%	

*Todas las comparaciones se realizaron entre los grupos controles.

Se determinaron también las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A2756G del gen *MTR*. El genotipo homocigoto 2756AA presentó frecuencias de 96,97% y 100% en los grupos de pacientes y control, y el genotipo heterocigoto 2756AG fue encontrado solo en una muestra (3,03%) en el grupo de pacientes. No fue encontrado en ningún grupo el genotipo homocigoto 2756GG. Solo la distribución de genotipos en el grupo de pacientes se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los resultados obtenidos en nuestro grupo control pueden deberse en parte por el pequeño tamaño de la muestra empleado en este análisis y a la baja frecuencia del genotipo recesivo en la población en general.

En la tabla 23 se muestra la distribución de los genotipos del polimorfismo A2756G en diferentes poblaciones. La frecuencia genotípica de este polimorfismo en una población iraní fue de 61,54% para los homocigotos 2756AA, 32,31% para los heterocigotos 2756AG y 6,15% para los homocigotos 2756GG (Haghiri et al., 2016). En una población china, las frecuencias genotípicas correspondientes reportadas por Qin, et al. (2012) fueron de 82%, 17,1% y 0,9%, mientras que Wang, et al. (2015) en otro estudio en China, reportó frecuencias de 62,14%, 32,5% y 5,36%, respectivamente. En India, las frecuencias encontradas fueron de 54,58% para 2756AA y 45,42% para 2756AG (Raina et al., 2016). En Brasil se ha reportado una frecuencia genotípica de 61,11% para 2756AA, 34,72% para 2756AG y 4,17% para 2756GG (Zara-Lopes et al., 2016). Otro estudio en Brasil reportó frecuencias respectivas para estos tres genotipos de 64,2%, 25,3% y 1,05% (de Lima et al., 2010). En Ecuador se reportaron frecuencias de 92%, 6% y 2%, respectivamente (López-Cortés et al., 2013).

Las distribuciones genotípicas encontradas se comparan con las reportadas en diversos estudios, en donde el genotipo homocigoto 2756AA es el más frecuente, seguido por el heterocigoto 2756AG, y en menor proporción el homocigoto 2756CC. Respecto a la distribución de los alelos, el alelo A presentó una frecuencia de 0,98 en las pacientes y 1,0 en los controles, y el alelo G presentó una frecuencia de 0,02 en las muestras de pacientes. En todos los estudios mencionados el alelo A también se encontró en mayor frecuencia que el alelo G.

Tabla 23. Distribución del polimorfismo A2756G de *MTR* en diferentes poblaciones

Población	AA	AG	GG	Referencia
Irán	61,54%	32,31%	6,15%	Haghiri et al. (2016)
China	82%	17,1%	0,9%	Qin, et al. (2012)
China	62,14%	32,5%	5,36%	Wang, et al. (2015)
India	54,58%	45,42%	0%	Raina et al. (2016)
Brasil	61,11%	34,72%	4,17%	Zara-Lopes et al. (2016).
Brasil	64,2%	25,3%	1,05	de Lima et al. (2010).
Ecuador	92%	6%	2%	López-Cortés et al. (2013)
Presente estudio	100%	0%	0%	

*Todas las comparaciones se realizaron entre los grupos controles.

En cuanto a la distribución de los alelos de riesgo para el polimorfismo TSER de *TYMS*, la presencia del alelo 3R en condición homocigota reveló un aumento en la posibilidad de desarrollar CM cuando fue comparado con los homocigotos 2R, y heterocigotos 2R/3R aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (OR=1,247; $p=0,949$; 1,505; $p=0,516$). Del mismo modo, se encontró que la presencia del alelo T del polimorfismo C677T y del alelo C de A1298C de *MTHFR* podrían aumentar el riesgo de desarrollar CM (OR= 1,305; $p=0,541$ y OR=1,201; $p=0,839$), pero también fue sin diferencia significativa.

Cuando se evaluó la distribución de los alelos de riesgo 3R del polimorfismo TSER de *TYMS* respecto a la edad de las pacientes, se encontró que la condición homocigota de este alelo en las pacientes mayores de 50 años podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, la asociación no fue estadísticamente significativa (OR=2,364; $p=0,164$). Del mismo modo, en aquellas pacientes que presentan, al menos, un alelo T del polimorfismo C677T de *MTHFR* podrían aumentar la probabilidad de desarrollar cáncer de mama cuando tienen hábitos de fumar, mas sin asociación significativa (OR=5,273; $p=0,074$). Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa entre los alelos de riesgo del polimorfismo A2756G de *MTR* con los hábitos de tabaquismo y etilismo de las pacientes ($p=0,182$ y $p=0,09$). En un metanálisis realizado por Wang; Wang y Di (2011) no se encontró heterogeneidad estadística para el polimorfismo TSER, y asociaron el alelo 2R con el riesgo de CM en comparación con alelos no 2R, sin embargo, aunque el tamaño de las muestras evaluadas fue alto (1969 casos y 2290 controles), el OR determinado fue de 1.09.

Para el caso de la distribución alélica del polimorfismo *1494del6* de *TYMS* con la clasificación molecular del tumor, se realizó una comparación entre los tipos de tumores más agresivos (HER2-positivos + TNBC) y los menos agresivos (luminales A y B), encontrándose que la presencia del alelo -6 podría aumentar la probabilidad de desarrollar este tipo de tumores más agresivos, aunque la asociación no sea estadísticamente significativa (OR=1,621; $p=0,274$). Del mismo modo se aplicó el test de *Odds Ratio* para el resto de los polimorfismos, encontrándose que el alelo 3R del polimorfismo TSER de *TYMS* también podría ser un factor de riesgo para desarrollar tumores de tipo HER-2 positivo y TNBC, aunque la asociación tampoco fue estadísticamente significativa (OR= 1,623; $p=0,606$).

Se ha postulado que el número de repeticiones en tándem en TSER puede ser un determinante de los niveles de expresión de la enzima TS. El alelo 3R tiene un mRNA más estable y una mejor eficacia traduccional que el alelo 2R, esto resulta en una mayor actividad de la enzima TS, por tanto, el genotipo heterocigoto 2R/3R debería tener una actividad intermedia. Como TS compete con MTHFR en el ciclo del metabolismo del ácido fólico por la disponibilidad de 5,10-metilentetrahidrofolato, los niveles de éste último disminuyen, por lo tanto, la variante 3R puede afectar los niveles de 5,10-metilentetrahidrofolato llevando a una disminución en la concentración celular de S-adenosilmetionina, y una subsecuente disminución en la metilación del DNA. Así, la hipometilación de DNA puede aumentar la susceptibilidad a mutaciones génicas y alterar la expresión de oncogenes y supresores de tumores. Esto podría resultar en cambios epigenéticos que pueden iniciar el proceso de carcinogénesis. Además, cuando se comparan los niveles de mRNA y de proteína entre los alelos 3R y 2R, en muestras tumorales, los homocigotos para tres repeticiones tienen un aumento en los niveles intratumorales y mayor expresión enzimática, también, se ha propuesto que a menores niveles de mRNA de TS hay mejor respuesta al tratamiento con 5-FU (Mandola et al., 2002; Quintero-Ramos et al., 2014; da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012; Schwarzenbach et al., 2010).

Debido a esa relación existente entre el alelo 3R y el aumento de la eficiencia en la transcripción y traducción de *TYMS*, la indagación del genotipo en este tipo de pacientes resulta en una herramienta de gran utilidad para el médico tratante, ya que brinda información potencial acerca de la selección de la terapia, monitoreo de la enfermedad y pronóstico de la misma (Villegas et al., 2015).

El polimorfismo *1494del6* varía mucho dentro de las diferentes poblaciones étnicas. Se ha determinado una frecuencia de 30% en poblaciones caucásicas y está en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo TSER en 5'-UTR. El alelo con la deleción puede causar inestabilidad en el mRNA lo que llevaría a una menor expresión de TS (Ulrich et al., 2000; Mandola et al., 2004).

Este polimorfismo se ha asociado significativamente con los pacientes con CM, y podría ser un biomarcador útil para la toxicidad de 5-FU, pudiendo aumentar el riesgo de cáncer de mama. Esta asociación ha sido más evidente en los tumores ER/PR positivos en pacientes premenopáusicas con CM. Sin embargo, otros estudios reportan que su asociación con esta enfermedad aún es controversial, siendo asociado con afecciones inflamatorias y varias enfermedades como cáncer colorrectal y pulmonar y linfoma no Hodgkin. (Skibola et al., 2004; Shi et al., 2005; Gallegos-Arreola et al., 2008; Kumar; Vamsy; Jamil, 2010; da Silva; de Lima; Bertuzzo, 2012; Mo et al., 2016).

Estudios recientes han informado que el polimorfismo *1494del6* puede afectar el nivel de mRNA de *TYMS*, y que el genotipo +6/+6 aumenta significativamente los niveles de mRNA en comparación con el genotipo -6/-6. El efecto funcional de este polimorfismo aún no se ha comprendido completamente, los datos disponibles sugieren que el alelo -6 podría asociarse con una disminución de la estabilidad de *TYMS in vitro*, menor expresión de *TYMS* intratumoral *in vivo* y quizás con un mayor riesgo de cáncer. Un estudio de China sugiere que los genotipos de las variantes homocigóticas +6 se asociaron con una disminución significativa del riesgo de CM en su población; el efecto protector fue más evidente en las mujeres posmenopáusicas, además, en un metanálisis realizado por Wang; Wang y Di (2011) reportaron que el alelo con la deleción puede incrementar la susceptibilidad a desarrollar CM. (Kumar; Vamsy; Jamil, 2010).

La enzima MTHFR juega un rol central en el direccionamiento del folato hacia la remetilación de homocisteína para metionina a expensas de la síntesis de purinas y de DNA. El polimorfismo C677T da como resultado una enzima termolábil con actividad reducida que dificulta la metilación del DNA al tiempo que proporciona un mayor flujo de folato para la síntesis de nucleótidos. Esto puede resultar en una mejor reparación del DNA al reducir los niveles de uracilo que de otra manera podrían incorporarse en el DNA. Sin embargo, la actividad reducida de la enzima MTHFR también reduce la disponibilidad de S-adenosilmetionina requerida para los

procesos de metilación que también pueden promover la hipometilación del DNA, cuyos efectos se exacerban en condiciones de bajo nivel de folato (Skibola et al., 2004).

Se ha reportado que individuos con las variantes polimórficas en *MTHFR* pueden incrementar el riesgo para el CM pre-menopáusico, y puede estar atribuido a perturbaciones en la metilación del DNA. Esas alteraciones en la metilación pueden resultar en la activación de protooncogenes, inactivación de genes supresores de tumores y desregulación génica para los receptores de estrógeno (Semenza et al., 2003)

Waseem et al. (2016) reportan asociación del genotipo 677CT y del alelo T con riesgo de CM en la población india. Factores ambientales como el consumo de tabaco también juega un papel importante en el CM.

Otros estudios presentan resultados no concluyentes en varios grupos raciales y étnicos sobre la asociación de polimorfismos en *MTHFR* y la susceptibilidad al CM. Esos hallazgos inconsistentes podrían deberse a la heterogeneidad de la herencia, migración, ubicaciones geográficas, factores ambientales y complejas vías epigenéticas que conducen a la carcinogénesis. Por tanto, aunque se han observado correlaciones significativas entre los SNPs en *MTHFR* y el CM, varios autores también reportan que no hay asociación entre esos polimorfismos y la susceptibilidad al CM. Por lo tanto, la asociación del polimorfismo C677T con CM es muy controversial (Henríquez-Hernández et al., 2010; Bravatà, 2014; Gonzales; Yu; Shiao, 2017; Rezaei; Rassi; Nemati, 2017).

En comparación con C677T, la funcionalidad del polimorfismo A1298C está menos definida y su función enzimática es menos anormal. Los homocigotos 1298CC han sido asociados a una pérdida de 30% de función, y los heterocigotos 1298AC con 15% de pérdida de función. Sin embargo, se ha asociado a enfermedades neurológicas, autismo, Alzheimer, Parkinson, enfermedades cardiovasculares, abortos y cáncer (Gonzales; Yu; Shiao, 2017).

Estudios han sugerido que la deficiencia de folato puede influenciar en la estabilidad del DNA y que esto podría incrementar el riesgo al cáncer (Liu et al., 2016). Otros estudios han encontrado que este polimorfismo y el C677T afectan la sobrevivencia en pacientes con CM. No obstante, las asociaciones de estos dos polimorfismos con el CM son aún controversiales. Además, tienen que tomarse en cuenta otros factores que podrían explicar la discordancia que existe entre

esta asociación con la enfermedad, como por ejemplo las características de las diferentes poblaciones, edad, raza, mutaciones en *BRAC1* y *BRAC2*, estado del tumor, toma de folato, entre otros (Martin et al., 2006; Bravatà, 2014).

El polimorfismo A2756G incrementa los niveles de homocisteína en plasma, lo que podría resultar en cambios en la vía del folato y posteriormente en la inducción de carcinogénesis (Zara-Lopes et al., 2016).

Hay varios estudios que evalúan la relación de este polimorfismo y el riesgo al CM, asociándolo fuertemente a la enfermedad, no solo el genotipo homocigoto A2756GG, sino que también el genotipo heterocigoto 2756AG (Hosseini, 2013). Carvalho, et al. (2012), reportan también asociación de este polimorfismo con el riesgo del CM, y en otro estudio evalúan el efecto de este polimorfismo conjuntamente con el polimorfismo C677T de *MTHFR* (de Cássia et al., 2012). Sin embargo, en metanálisis reportados por Weiner, et al. (2012) y Zhong et al. (2013), no encuentran asociación entre este polimorfismo y la enfermedad.

Por último, la identificación de polimorfismos asociados al CM puede ser usada como una importante herramienta para la evaluación de la predisposición y pronóstico de la enfermedad, sin embargo, se debe recalcar que el cáncer es una enfermedad multifactorial, por tanto, para interpretar de manera adecuada esta clase de estudios se debe ampliar la investigación evaluando factores externos a los que está sometida cada persona, tales como la dieta, estilo de vida, historia familiar, historia reproductiva, consumo de tabaco y alcohol, la exposición a agentes carcinógenos, entre otros.

7. CONCLUSIONES

Fueron determinadas las frecuencias genotípicas y alélicas de todos los polimorfismos evaluados, sin diferencias significativas en la distribución entre el grupo de pacientes y el grupo control.

El alelo 3R del polimorfismo TSER de *TYMS* y los alelos T y C de los polimorfismos C677T y A1298C de *MTHFR*, podrían aumentar el riesgo de desarrollar CM, aunque la asociación encontrada no haya sido estadísticamente significativa. Se recomienda aumentar el tamaño de la muestra.

Se determinaron las combinaciones de los polimorfismos TSER/*1494del6* en el gen *TYMS* y C677T/A1298C en el gen *MTHFR*, sin diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control.

Mujeres mayores de 50 años, y con la presencia del alelo 3R del polimorfismo TSER de *TYMS* podrían tener un mayor factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, aunque los valores no sean estadísticamente significativos. Para validar esto se recomienda hacer un muestreo mayor.

Mujeres que presentan, al menos, un alelo T del polimorfismo C677T de *MTHFR* podrían aumentar la probabilidad de desarrollar cáncer de mama cuando tienen hábitos de fumar, aun cuando no sea estadísticamente significativo. Para validar este resultado se recomienda también realizar un muestreo mayor.

El polimorfismo *1494del6* de *TYMS* podría estar relacionado con el riesgo de tumores de mama más agresivos del tipo HER2-positivo y triple negativo, aunque la asociación no sea estadísticamente significativa.

El alelo 3R del polimorfismo TSER de *TYMS* también podría ser un factor de riesgo para desarrollar este tipo de tumores más agresivos, aunque la asociación tampoco fue estadísticamente significativa.

8. REFERENCIAS

- Acuña M. et al. Genetic variants in the enhancer region of the thymidylate synthase gene in the Chilean population. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 61, n. 6, p. 778-782, 2006.
- Al Farra, H. *Methionine synthase* polymorphisms (*MTR 2756 A>G* and *MTR 2758 C>G*) frequencies and distribution in the Jordanian population and their correlation with neural tube defects in the population of the northern part of Jordan. **Indian Journal of Human Genetics**, v. 16, n. 3, p. 138-143, 2010.
- Al-Motassem, Y. et al. The association of polymorphisms in folate-metabolizing genes with response to adjuvant chemotherapy of colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 82, n. 2, p. 237-243, 2018.
- American Cancer Society. Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. Disponible en: < <https://www.cancer.org/>>. Acceso en 02 feb. 2019.
- American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017.
- Araújo M. D. et al. *Thymidylate synthase* and *methylenetetrahydrofolate reductase* gene polymorphisms and gastric cancer susceptibility in a population of Northern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 10001-10006, 2015. Disponible en: <<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2015/vol14-3/pdf/gmr5256.pdf>>. Acceso en 01 jul. 2017.
- Ayres, M. et al. BioEstat. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas v. 5.0. Belém, Brasil, **Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá**. 2007.
- Barbosa, A. et al. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and cystathionine beta-synthase in oral cancer -a case- control study in southeastern Brazilians. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 5, p. 588-566, 2016.
- Barnard, M., Boeke, C., Tamimi, R. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1856, p. 73-85, 2015.
- Bonilla, O., Matute, G., Severiche, C. Clasificación en subtipos intrínsecos de los carcinomas de mama analizados en un centro de patología de Medellín en el año 2011. **Rev CES Med**, v. 289, n. 1, p. 35-46, 2015.
- Bravata, V. Controversial roles of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and folate in breast cancer disease. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Early Online, p. 1-7, 2014. DOI: 10.3109/09637486.2014.959896
- Carvalho, B. et al. Associations of polymorphisms of folate cycle enzymes and risk of breast cancer in a Brazilian population are age dependent. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n.4, p. 4899-907, 2012.
- Carvalho, F. et al. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. **BMC Women's Health**, n. 14, v 102, p 2-8, 2014.
- Castro, R. et al. *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase* (MTHFR) 677CT and 1298AC mutations are associated with DNA hypomethylation. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, p. 454-458, 2004.

Costi, M., et al. *Thymidylate synthase* Structure, Function and Implication in Drug Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2241-2258, 2005.

Croce, Carlo M. Oncogenes and cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 5, p. 502-511, 2008.

Cruz, J. et al. Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida en la detección y tipificación del virus de papiloma humano. **Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela**, v. 75, n. 3, p. 172-176, 2015.

da Silva, J.; de Lima, F. A.; Bertuzzo, C. S. *Thymidylate synthase* gene (TYMS) polymorphisms in sporadic and hereditary breast cancer. **BioMed Central**, v. 5, n. 676, p. 1-6, 2012. Disponible en: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/676>>. Acceso 12 enero. 2018.

de Cássia, R. et al. Interaction of *MTHFR* C677T and A1298C, and *MTR* A2756G Gene Polymorphisms in Breast Cancer Risk in a Population in Northeast Brazil. **Anticancer Research**, v. 32, p. 4805-4812, 2012.

de Lima, E., et al. *MTR* Polymorphic Variant A2756G and Retinoblastoma Risk in Brazilian Children. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 54, p. 904-908, 2010.

Dong, J. et al. Polymorphisms of *Thymidylate synthase* Gene 5'- and 3'-Untranslated Region and Risk of Gastric Cancer in Koreans. **Anticancer Research**, v. 30, p 2325-2330, 2010.

Dornelles, C. et al. Conocimiento del cáncer de mama y cáncer de mama hereditario en el personal de enfermería de un hospital público. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v.23, n. 1, p. 90-97, 2015.

Duthie S.J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. **British Medical Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 578-592, 1999.

Ebrahimi, A., Hosseinzadeh, A., Karimian, M. Association of human *methionine synthase* A2756G transition with prostate cancer: a case-control study and in silico analysis. **Acta Medica Iranica**, 55, v. 5, p. 297-303, 2017.

Edler, D. et al. *Thymidylate synthase* expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 7, p.1721-1728, 2002.

Elshihawy, H. et al. Design, synthesis, and enzyme kinetics of novel benzimidazole and quinoxaline derivatives as *methionine synthase* inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 550-558, 2014.

Frosst, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in *methylenetetrahydrofolate reductase*. **Nature Genetic**, v. 10, p. 111-113. 1995.

Fujishima, M. et al. Relationship between *Thymidylate Synthase (TYMS)* gene polymorphism and TYMS Protein levels in patients with high-risk breast cancer, **Anticancer research**, v. 30, p. 4373-4380, 2010.

Gallegos-Arreola, M. et al. Frecuencia del polimorfismo *TS 1494del6* en pacientes con cáncer colorrectal del Occidente de México. **Revista de Investigación Clínica**, v. 60, n. 1, p. 21-30, 2008.

Ganz P.A.; Goodwin P.J. Breast Cancer Survivorship: Where Are We Today?. In: Ganz P. (eds) Improving Outcomes for Breast Cancer Survivors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 862, Springer, Cham, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-16366-6_1.

Gao, M. et al. Polymorphisms in the Thymidylate Synthase Gene and Risk of Colorectal Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 4087-4091, 2012.

Gaughan, D. et al. The human and mouse *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the *CLCN6* gene. **Gene**, v. 257, n. 2, p.279-289, 2000.

GeneCards Database. Disponible en: <<http://www.genecards.org>>. Acceso en: 10 abr. 2018.

Genetics Reference. Disponible en: <<https://ghr.nlm.nih.gov>>. Acceso en: 06 abr. 2018.

Gibson, TB. Polymorphisms in the *thymidylate synthase* gene predict response to 5-fluorouracil therapy in colorectal cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 5, n. 5, p. 321-323, 2006.

Gonzales, M.; Yu, P.; Shiao, P. *MTHFR* gene polymorphism-mutations and air pollution as risk factors for breast cancer. A Metaprediction Study. **Nursing Research**, v. 66, n. 2, p. 151-162, 2017.

Goyette P. et al. Human *methylenetetrahydrofolate reductase*: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nature Genetics**, v. 7, p, 195-200, 1994.

Haghiri, R. et al. Analysis of *methionine synthase* (rs1805087) gene polymorphism in autism patients in Northern Iran. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 76, p. 318-323, 2016.

Hanahan, D; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

_____. Hallmarks of cancer. The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674. 2011.

He, L., Shen, Y. *MTHFR C677T* polymorphism and breast, ovarian cancer risk: a meta-analysis of 19,260 patients and 26,364 controls. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 227.238, 2017.

Henríquez-Hernández, et al. *TYMS, MTHFR, p53* and *MDR1* gene polymorphisms in breast cancer patients treated with adjuvant therapy. **Cancer Epidemiology**, v. 34, p. 490-493, 2010.

Hori, T. et al. Regional assignment of the human *thymidylate synthase (TS)* gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. **Human Genetics**, v. 85, n. 6, p. 576-580, 1990.

Horie, N; Takeishi, K. Identification of functional elements in the promoter region of the human gene for *thymidylate synthase* and nuclear factors that regulate the expression of the gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18375–18381, 1997.

Hosseini, M. Role of polymorphism of *methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR)* A2756G and breast cancer risk. **Polish Journal of Pathology**, v. 64, n. 3, p. 191-195, 2013.

Hu, Q. et al. Correlation between *thymidylate synthase* gene polymorphisms and efficacy of pemetrexed in advanced non-small cell lung cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 4, p. 1010-1016, 2012.

Instituto Nacional do Câncer, INCA. Rio de Janeiro: INCA. Disponible en: <<https://www.inca.gov.br/>>. Acceso en 10 dic. 2017.

Instituto Nacional do Câncer, INCA. **Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro. 2017.

International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2018: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018. Disponible en < <https://gco.iarc.fr/>>. Acceso en 02 feb. 2019.

Kalyana, K., Mohana, V., Kaiser, J. Thymidylate synthase gene polymorphisms effecting 5-FU response in breast cancer patients. **Cancer Biomarkers**, v. 6, p. 83–93, 2009. DOI: 10.3233/CBM-2009-0121.

Kaneda, S. et al. Structural and functional analysis of the human *thymidylate synthase* gene. **The journal of biological chemistry**, v. 265, n. 33, p. 20277-20284, 1990.

Karsli-Ceppioglu, S. et al. The Epigenetic Landscape of promoter genome-wide analysis in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 6597, p. 1-8, 2017. DOI:10.1038/s41598-017-06790-z.

Karp, G.; Iwasa, J.; Marshall, W. **Cell and Molecular Biology**. 8va edición. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2015.

Kawakami, K.; Watanabe, G. Identification and Functional Analysis of Single Nucleotide Polymorphism in the Tandem Repeat Sequence of *Thymidylate Synthase* Gene. **Cancer Research**, v. 63, p. 6004-6007, 2003.

Ke, Y. et al. *Methionine synthase* A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, p 370–378, 2010.

Kim, J.W. et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and plasma DNA methylation in colorectal cancer patients. **Oncology Reports**, v. 25, n. 1, p. 167-172, 2011.

Klug et al. *Concepts of Genetics*. 11va edición. Inglaterra: Pearson Education Limited, 2016.

Kumagai, K., et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 2, p. 593-600, 2003.

Kumar, K., Vamsy, K., Jamil, K. Thymidylate synthase gene polymorphisms effecting 5-FU response in breast cancer patients. **Cancer Biomarkers**, v. 6, p. 83–93, 2010. DOI 10.3233/CBM-2009-0121.

Leclerc, D. et al. Human *methionine synthase*: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 12, p. 1867–1874, 1996.

Li, Q. et al. Transcriptional potential of the gamma-globin gene is dependent on the CACCC box in a developmental stage-specific manner. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 14, p. 3909-3916, 2006.

Lievers, K. et al. A second common variant in the *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. **Journal of Molecular Medicine**, v. 79, n. 9, p. 522-528, 2001.

Lincz, L. et al. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the *thymidylate synthase* 2R allele. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 9, p. 1930–1934, 2007.

- Lissowska, J. et al. Genetic polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and breast cancer risk: A population-based case-control study and meta-analyses. **The International Journal of Cancer**, v. 120, p. 2696–2703, 2007.
- Liu, W. et al. Association of *MTHFR* A1298C polymorphism with breast cancer and/or ovarian cancer risk: an updated meta-analysis. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13, n. 5, p. 72-86, 2016.
- López-Cortés, A. et al. Genetic polymorphisms in *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G) and *MTRR* (A66G) genes associated with pathological characteristics of prostate cancer in the Ecuadorian population. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 346, n. 6, p. 447-454, 2013
- Lu, M.; Wang, F.; Qiu, J. *Methionine synthase* A2756G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 18,953 subjects. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, p. 213-217, 2010.
- Lurje, G. et al. *Thymidylate synthase* gene variations: predictive and prognostic markers. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 5, p.1000-1007, 2009.
- Mandola, M. V. et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the *thymidylate synthase* gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. **Cancer Research**, v. 63, p. 2898 – 2904, 2003.
- Mandola, M. V. et al. A 6 bp polymorphism in the *thymidylate synthase* gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 5, p. 319-327, 2004.
- Marsh, Sharon. *Thymidylate synthase* pharmacogenetics. **Investigational New Drugs**, n. 23, p. 533–537, 2005.
- Marsh, S., et al. Ethnic Variation in the Thymidylate Synthase Enhancer Region Polymorphism among Caucasian and Asian Populations. **Genomics**, v. 58, p. 310–312, 1999.
- Meulendijks, D. et al. Increased risk of severe fluoropyrimidine-associated toxicity in patients carrying a G to C substitution in the first 28-pb tandem repeat of the *thymidylate sintase* 2R allele. **International Journal of Cancer**, v. 138, p. 245-253, 2016.
- Mo, A. et al. Association between polymorphisms of *thymidylate synthase* gene 5'- and 3'-UTR and gastric cancer risk: meta-analysis. **Bioscience Reports**, v. 36, p. 1-10, 2016.
- National Cancer Institute (NCI). Cancer stat facts: female breast cancer. [2014]. Disponible en: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>>. Acceso en 30 enero. 2018.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer de mama: prevención y control. [2018]. Disponible en: <<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>>. Acceso en 30 enero. 2018.
- Paz, M. et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. **Cancer Research**, v. 62, n. 15, p. 4519-4524, 2002.
- Peng, Y; Croce C. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 1, n. 15004, p. 1-9, 2016. Disponible en: <<https://www.nature.com/articles/sigtrans20154>>. Acceso 30 enero. 2018.

Pérez, S.; Sandoval, L.; Tapia, H. Factores de riesgo para cáncer de mama. Revisión de la literatura: rol potencial de enfermería. **Revista enfermería universitaria ENEO-UNAM**, v. 6, p. 21-26, 2009.

Pullmann, R. et al. Differential Stability of *Thymidylate synthase* 3'-Untranslated Region Polymorphic Variants Regulated by AUF1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 33, p. 23456–23463, 2006.

Qin, X. et al. MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms and the homocysteine lowering efficacy of different doses of folic acid in hypertensive Chinese adults. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 2, p. 1-7, 2012. DOI: 10.1186/1475-2891-11-2.

Quintero-Ramos, A. et al. Association between polymorphisms in the thymidylate synthase gene and risk of breast cancer in a Mexican population. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8749-87566, 2014. Disponible en: < <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2014/vol13-4/pdf/gmr4070.pdf> >. Acceso en 01 jul. 2017.

Raina, J. et al. *Methylenetetrahydrofolate reductase* C677T and *methionine synthase* A2756G gene polymorphisms and associated risk of cardiovascular diseases: A study from Jammu region. **Indian Heart Journal**, v. 68, p. 421-430, 2016.

Rengifo, L. y Gaviria, D. Análisis genotípico de los polimorfismos C677T y A1298C en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa y el polimorfismo a66g en el gen de metionina sintasa reductasa en síndrome de down. **Journal of Basic and Applied Genetics**, v. 25, n. 1, p. 21-30, 2014.

Rezaei, H., Rassi, H., Nemay, F. Investigation of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Human Papilloma Virus Genotypes in Iranian Breast Cancer. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 36, n. 3, 2017

Rezende L. M. et al. Can *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms alter the risk and severity of sporadic breast cancer in Brazilian women? **Clinical Breast Cancer**, 2017, DOI: 10.1016/j.clbc.2017.02.004.

Sambrook, J. y Russell, D. (2001). **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Schwarzenbach, H. et al. Molecular analysis of the polymorphisms of thymidylate synthase on cell-free circulating DNA in blood of patients with advanced colorectal carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 881–888, 2010.

Semenza, J. et al. Breast cancer risk and *methylenetetrahydrofolate reductase* polymorphism. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 77, p. 217–223, 2003.

Shi, Q. et al. Case-control analysis of *thymidylate synthase* polymorphisms and risk of lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 3, p. 649-656, 2005.

Sharp, L. et al. Folate and breast cancer: the role of polymorphisms in *methylenetetrahydrofolate reductase* (MTHFR). **Cancer Letters**, 181, p. 65–71, 2002.

Skibola, C. F. et al. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, v. 104, n. 107, p. 2155-2162, 2004.

Sobin, L. H.; Gospodarowicz, M. K.; Wittekind, C. **TNM classification of malignant tumors**. John Wiley & Sons, 2011.

Stephenson, G, Rose, D. Breast Cancer and Obesity: An Update. **Nutrition and Cancer**, v. 45, n. 1, p. 2-17, 2003.

Sulzyc-Bielicka, V. et al. *Thymidylate synthase* gene polymorphism and survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-Fluorouracil. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 11, p.799-806, 2013.

Suzuki, T., et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. **Carcinogenesis**, v 29, n. 2, p. 356–362, 2008.

Thomas, F. et al. Detection of the G>C SNP and rare mutations in the 28-bp repeat of *TYMS* using gel-based capillary electrophoresis. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 12, p. 1751–1756, 2010.

Uleand, P.M. et al. Biological and clinical implications of the *MTHFR* C677T polymorphism. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 4, 2001.

Ulrich, C. M. et al. *Thymidylate synthase* promoter polymorphism, interaction with folate intake, and risk of colorectal adenomas. **Cancer Research**, v. 62, p 3361-3364, 2002.

Untch, M. et al. 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus – Opinion of a German Team of Experts (Zurich 2013). **Breast Care**, v. 8, p. 221–229, 2013. DOI: 10.1159/000351692

Van Amerogen, G. et al. An improved method for the detection of the thermolabile variant of *methylenetetrahydrofolate reductase*. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 5, 1405-1407, 1998.

van der Put, N. et al. A second common mutation in the *methylenetetrahydrofolate reductase* gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 1044-1061, 1998.

Villafranca, E. et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the *thymidylate synthase* gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1779-1786, 2001.

Vuong, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1-14, 2014. DOI: 10.1007/s00428-014-1593-7.

Wang, J., Wang, B., Di, J. The association between two polymorphisms in the *TYMS* gene and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 128, p. 203-209, 2011.

Wang, Y. et al. Analysis of *MTR* and *MTRR* polymorphisms for neural tube defects risk association. **Medicine**, v. 94, n. 35, p. 1-8, 2015. DOI: 10.1097/MD.0000000000001367.

Waseem, M. et al. Association of *MTHFR* (C677T) gene polymorphism with breast cancer in North India. **Biomarkers in Cancer**, v. 8, p. 111–117, 2016. DOI:10.4137/BIC.S40446.

Weisberg, I. et al. A second genetic polymorphism in *methylenetetrahydrofolate reductase* (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 64, p. 169–172, 1998.

- Yawata, A. et al. Polymorphic tandem repeat sequences of the *thymidylate synthase* gene correlates with cellular-based sensitivity to fluoropyrimidine antitumor agents. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 56, p. 465–472, 2005.
- Yin et al. *Methylenetetrahydrofolate reductase* C677T gene polymorphism and colorectal cancer risk: A case-control study. ***Oncology letters***, v. 4, p. 365-369, 2012.
- Yu, K. et al. *Methionine synthase* A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*, v. 18, p. 370–378, 2010.
- Zara-Lopes, T. et al. Role of MTHFR C677T and MTR A2756G polymorphisms in thyroid and breast cancer development. ***Genetics and Molecular Research***, v. 15, n. 2, p. 1-11, 2016. Disponible en: < <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2016/vol15-2/pdf/gmr8222.pdf>>. Acceso en 30 marzo. 2018.
- Zhang, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. ***Animal nutrition***, v. 1, p. 144-151, 2015.
- Zhang, Z. et al. Thymidylate Synthase 5'- and 3'-Untranslated region polymorphisms associated with risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. ***Clinical Cancer Research***, v. 10, p. 7903–7910, 2004.
- Zhong, S. et al. Methionine synthase A2756G polymorphism and breast cancer risk: an up-to-date meta-analysis. ***Gene***, v.527, n. 2, p. 510-515, 2013.
- Zhu, H. et al Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. ***Molecular Genetics and Metabolism***, n. 78, p. 216–221, 2003.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: Biomarcadores de resposta a quimioterapia no câncer de mama localmente avançado.

Nome do voluntário: _____

Você está sendo convidada a participar de um estudo **que tem por objetivo avaliar a expressão dos genes *c-myc*, *her-2* e *kras* como fatores de resposta à quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama** e que envolve a **coleta de material para a realização de uma biópsia (análise de pequenas amostras de tecido para o diagnóstico do tipo do tumor) e a realização de um exame para avaliação do tamanho do tumor (Ressonância Magnética).**

O Câncer de mama é o tipo de tumor mais frequente em mulheres no Brasil e o segundo no Estado do Pará. Infelizmente muitos destes tumores são descobertos em estágio avançado, precisando de tratamento com quimioterapia antes da realização de cirurgia, chamado de quimioterapia neoadjuvante. Esta quimioterapia visa diminuir o tumor para melhorar as condições da cirurgia, porém nem todos os pacientes apresentam a mesma redução do tumor. Conhecer algumas características deste tumor, como os genes que pretendemos estudar, é importante para compreender melhor a doença, o tratamento e as respostas à quimioterapia ajudando assim na identificação dos pacientes que se beneficiarão ou não das medicações fornecidas.

Para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

Este estudo tem como objetivo avaliar as expressões proteicas dos genes C-MYC, HER-2 e KRAS como fatores de predição de resposta à quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama localmente avançado, nas pacientes tratadas no Hospital Ophir Loyola.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra do tumor para a realização da biópsia (exame que diagnostica o tipo de tumor). A coleta de material para a biópsia será feita por uma médica (o) pesquisadora(r) participante desse estudo. Também você irá realizar um exame de imagem (Ressonância Magnética) das mamas. Essas amostras de tumor serão levadas ao laboratório onde será realizado em estudo imunohistoquímico, FISH e RFLP-PCR para avaliar os genes (*C-MYC*, *HER-2* e *KRAS*) nas células do tumor. Essas técnicas vão detectar as proteínas dos genes que queremos estudar e correlacionar com a resposta do tumor à quimioterapia que você irá receber como parte de seu tratamento. Esta quimioterapia será a que

é feita de rotina no Hospital Ophir Loyola para o tratamento de câncer de mama. O material isolado das amostras de tumor será armazenado no Serviço de Anatomia-patológica deste hospital, após a utilização do mesmo para os procedimentos relacionados a este projeto. Se você concordar em participar deste projeto de pesquisa os pesquisadores participantes também consultarão seus registros médicos para obter dados que podem ser importantes para compreender o câncer de mama.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Sua participação nesse estudo é totalmente voluntária. Você não é obrigada a participar do estudo. Se você não concordar em realizar a Ressonância mamária e permitir a biópsia de seu tumor, você não participará desse estudo.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. É importante que você saiba dos riscos implicados na coleta de uma amostra do tumor e na realização da Ressonância mamária. A biópsia do tumor e à quimioterapia são procedimentos que fazem parte do tratamento usual do câncer de mama, porém a ressonância não faz parte da rotina. A coleta da biópsia de seu tumor pode causar sangramento no local. Caso isso aconteça, esse sangramento será controlado pela médica (o) que realizará a coleta. A Ressonância mamária é um exame não invasivo que visa o estudo do tamanho do tumor e dos gânglios, você precisará tomar um contraste, porém este exame será realizado em ambiente hospitalar diminuindo os riscos de alguma complicação que possa ocorrer.

BENEFÍCIOS

Você não terá benefícios com os resultados dessa pesquisa. Entretanto, os resultados gerados por ela poderão ajudar a compreender melhor o câncer de mama e auxiliar no tratamento do mesmo, no futuro, para outras mulheres.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

É importante que você saiba que o seu tratamento será o mesmo, caso aceite ou não participar desse projeto. É que você tem direito de saber qualquer informação gerada nessa pesquisa relacionada à sua doença. Essa pesquisa é coordenada pela Dra. Cynthia Lins, qualquer dúvida que tenha respeito pode ser sanada entrando em contato pelo telefone (91) 8129-8434.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola e equipe de pesquisadores envolvidos nesse estudo. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da Instituição (Hospital Ophir Loyola). Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para você pela sua participação nesse estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Caso você decida interromper sua

participação no estudo, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta e o uso das amostras para os fins relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização. Caso isso aconteça o motivo será comunicado a você.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a **Dra. Cynthia Lins** no telefone **(91) 8129-8434**. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Ophir Loyola, situado à Avenida Governador Magalhães Barata, nº 992 Belém - PA, CEP: 66063-240 Telefone: (91) 3342-1100, ou também pelo e-mail: cmblins@gmail.com.

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a uma biópsia e a um exame de Ressonância das mamas adicionais ao necessário para o meu tratamento e que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Autorizo o uso do material coletado para outros projetos com a finalidade de Pesquisa:

SIM

NÃO

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento

_____ dia ____ / ____ / ____
(Assinatura do Paciente)

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____ dia ____ / ____ / ____
(Assinatura de Testemunha, se necessário)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo à paciente.

COMPOSICIÓN DE TAMPONES

Tampón de Lisis.

- Tris pH 9	300 mM
- EDTA	10 mM
- Sacarosa	5%
- SDS	1,23%
- H ₂ O MiliQ	36,75 ml

Tampón de Homogenización.

- Tris pH 8	10 mM
- EDTA	10 mM
- NaCl	60 mM
- Sacarosa	5%
- H ₂ O MiliQ	66 ml

Tampón para la Taq polimerasa (Invitrogen).

- Tris- HCl pH 8,0	20 mM
- EDTA	0,1 mM
- DTT	1 mM
- Glicerol	50%
- Estabilizadores	

Tampón TBE 10X (Tris-Borato-EDTA).

- Tris-HCl pH 8,0	108 g
- Ácido Borico	55 g
- EDTA	7,6 g

Tampón de carga para geles de agarosa (Blue)

- Glicerol 5 ml
- Azul de bromofenol 0.1% 1 ml
- Xileno-cianol 0,1% 1 ml
- EDTA 0.5 M 2 ml

Tampón de carga para geles de poliacrilamida.

- Azul de bromofenol 0,1%
- EDTA 1 mM
- Sacarosa 40%

Enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen).

Purificada a partir de *Escherichia coli*, expresa el gen de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*.

Esta enzima posee actividad ADN polimerasa 5'-3' y actividad exonucleasa 5'-3'.

- Concentración 5U/μL

Endonucleasa de Restricción *HinfI* (Biolabs).

- Concentración 10U/ μL
- Tampón 10X
- No requiere albúmina de suero bovino
- Sitio de Corte: 5'-...G'ANTC...-3'
 3'-...CTNA'G...-5'