



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

RELACIÓN DEL CONTENIDO DE METALES Y
METALOIDES CON EL PATRÓN DE METILACIÓN
GLOBAL DEL ADN Y EN EL PROMOTOR DEL GEN
BRCA1 (BREAST CANCER 1) EN MADRES
SUDCALIFORNIANAS.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación: Biotecnología)

Presenta

PAULINA ANNETTE ORTEGA FLORES

La Paz Baja California Sur, diciembre de 2017.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 15 del Mes de Noviembre del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Relación del contenido de metales y metaloides con el patrón de metilación global del ADN y en el promotor del gen *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) en madres sudcalifornianas”

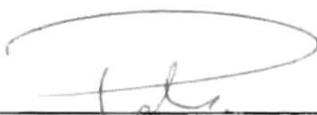
Presentada por el alumno:

Paulina Annette Ortega Flores

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

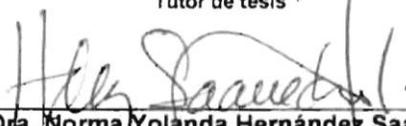
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA


Dra. Elena Palacios Mechetnov
Co-director de tesis


Dra. Lía Méndez Rodríguez
Co-director de tesis


Dr. Patricio Barros Núñez
Tutor de tesis


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Co-director de tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-director de tesis

Dra. Lía Méndez Rodríguez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-tutor de tesis

Dr. Patricio Barros Núñez

Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dra. Lía Méndez Rodríguez

Dr. Patricio Barros Núñez

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dra. Lía Méndez Rodríguez

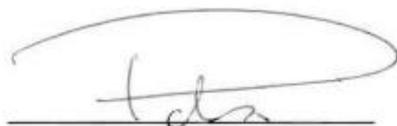
Dr. Patricio Barros Núñez

SUPLENTE: Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Resumen

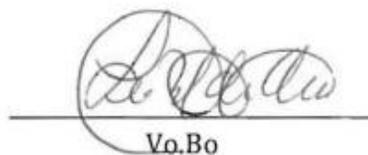
La presencia de elementos químicos considerados contaminantes ambientales debido a su toxicidad, es universal en todas las matrices biológicas, ya que presentan características de persistencia y se bioacumulan en diversos órganos y tejidos animales como la glándula mamaria, por lo que pueden medirse en la leche. En Baja California Sur (B.C.S.) diversos estudios han demostrado la presencia de mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb) y arsénico (As) en la leche materna, pero se desconoce si la exposición a estos elementos tóxicos puede afectar mecanismos epigenéticos o de metilación de ADN. Esto es importante porque un estado de metilación aberrante está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades, especialmente en el desarrollo de cáncer y su progresión, así como en la inactivación de genes supresores de tumores. En el presente trabajo se evaluó la relación entre la presencia de metales como el Hg, Cd y Pb y el metaloide As en leche materna, con la apoptosis, metilación del ADN global y con el promotor del gen *BRCA1* (*Breast Cancer 1*). Se recolectaron 79 muestras de leche materna en etapa calostro de mujeres residentes en B.C.S. y se les aplicó un cuestionario para determinar la edad, número previo de partos y abortos, actividad fumadora, entre otros factores. En la leche se analizó la concentración de elementos traza, se realizó conteo de células somáticas y el porcentaje de apoptosis y se cuantificó la metilación global del ADN y en la región promotora del gen *BRCA1*. Los datos obtenidos se analizaron mediante correlaciones, análisis de componentes principales (ACP) y la prueba GLM. Los metales en leche presentaron valores por arriba del límite máximo permisible para Hg ($3.5 \mu\text{g L}^{-1}$) en 24.1% ($n = 19$) de las mujeres y As ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) en 13.9% de las mujeres ($n = 11$). Se observó que el valor promedio de metilación global fue de 2.15% y que 3.3% ($n = 3$) de las mujeres presentó metilado el promotor del gen *BRCA1*. En el análisis de ACP los dos primeros componentes explicaron el 39.1% de la varianza, con una asociación positiva entre Hg y el número de abortos y As y metilación global. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la metilación del gen *BRCA1* y la concentración de Pb, el porcentaje de apoptosis, y la edad de las mujeres lactantes. Las concentraciones de Cd y Pb mostraron un decremento a mayor número de embarazos, que no resulto estadísticamente significativo.

Palabras clave: metales pesados, leche materna, *BRCA1*, toxico-epigenética.



Vo.Bo

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Co-directora de tesis



Vo.Bo

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez
Co-directora de tesis

Abstract

The presence of chemical elements considered environmental pollutants because of their toxicity is universal in all biological matrices, since they have persistence characteristics and bioaccumulate in various organs and animal tissues such as the mammary gland, so they can be measured in the milk. In Baja California Sur (B.C.S.) Mexico, several studies have demonstrated the presence of mercury (Hg), cadmium (Cd), lead (Pb), and arsenic (As) in breast milk, but it is unknown if their exposure can affect epigenetics or DNA methylation. This is relevant because an aberrant methylation status may be involved in the pathogenesis of several diseases, especially in the development of cancer and its progression, as well as in the silencing of tumor suppressor genes. In the present study we evaluated the relationship between the presence of the metals Hg, Cd, and Pb, and the metalloid As in breast milk, and the mechanism of apoptosis, global DNA methylation, and gene specific methylation in the promoter of *Breast Cancer 1* gene (*BRCA1*). We collected 79 breast milk samples in colostrum stage of women resident of B.C.S. A questionnaire was applied to determine age, number of pregnancies and abortions, and smoking activity. We analyzed in milk the concentration of trace elements, somatic cell count, and the proportion of apoptotic cells, and the global methylation of DNA and the promoter region of the *BRCA1*. The data obtained were analyzed by correlation, principal component analysis (PCA), and GLM. The metals present in milk showed values above the maximum permissible limit for Hg ($3.5 \mu\text{g L}^{-1}$) in 24.1% women ($n = 19$) and As ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) in 13.9% women ($n = 11$). The average value of global methylation was 2.15%, while the 3.3% ($n = 3$) of women presented the promoter of *BRCA1* gene methylated. In the PCA the first two components explained 39.1% of variance; with a positive association between Hg concentration and number of abortions, and As and global methylation. Significant differences were found ($p < 0.05$) between *BRCA1* methylation and Pb concentration, proportion of apoptosis, and age of woman. A tendency for decreased levels of Cd and Pb were found in relation to number of pregnancies.

Keywords: Heavy metals, breast milk, *BRCA1*, toxico-epigenomics.



Vo.Bo
Dra. Elena Palacios Mechetnov
Co-director



Vo.Bo
Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez
Co-director

Dedicatoria

A mi motor en esta vida, mi hijo André Paúl.

Mis padres en el cielo o donde quiera que estén, Manuel † y Anita†.

A mi madre, por su apoyo y lecciones de vida

A la vida misma, por tanto y por más.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (**CIBNOR**), por la oportunidad de tener la formación académica en esta institución y a la **Dirección de Posgrado**, por las atenciones y apoyo brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada para la realización de los estudios (Beca No. 589413).

Al proyecto **SEMARNAT-CONACyT 249423**, por financiamiento a la investigación.

Al **Hospital General con Especialidades Juan María de Salvatierra**, y a su personal, por todas las facilidades otorgadas en el proyecto, especialmente a las **Dras. Ibo Fiol y Zazil Flores Adalpe**, por la colaboración en la recolección de muestras y expedientes clínicos.

A mi Comité Tutorial, **Dra. Elena Palacios Mechetnov, Dra. Lía Méndez Rodríguez y Dr. Patricio Barros Núñez**, por las asesorías brindadas, conocimiento compartido, apoyo y amistad durante este proceso.

Al personal de Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, y a la técnica **M.C. Olivia Arjona** por todas las atenciones durante el desarrollo de la tesis y su amistad.

Al personal de Laboratorio de Espectrofotometría de Absorción Atómica, y al técnico **M.C. Baudilio Acosta Vargas** y la **IBQ. Griselda Peña Armenta** por su valiosa participación en el proyecto, análisis realizados y atenciones brindadas.

Al personal de Laboratorio de Bioquímica III y Laboratorista clínica **Alejandra Hernández**, del Centro de Investigación Biomédica del Noroeste IMSS (**CIBO**), Guadalajara, Jalisco por los análisis realizados durante la estancia realizada y todas las atenciones brindadas.

Al personal de Laboratorio de Genómica y Bioinformática, el **Dr. Ricardo Vázquez Juárez** y el **Dr. Alberto Peña**, por el espacio en laboratorio, su confianza, asesorías y apoyo durante los análisis.

Al personal de Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional, y a la técnica **Patricia Hinojosa Baltazar**, por la disponibilidad de equipos durante los análisis.

A la **Biol. Ariadna Sánchez** por la recolección de muestras y procesamiento de cuestionarios realizados.

Al **Dr. Raúl Martínez Rincón**, por sus asesorías en los estadísticos realizados, y siempre atender a mis dudas con una disponibilidad infinitamente agradecida, así mismos sus clases impartidas.

A la **M.C. Alessandra Casanova**, por su aportación dentro del proyecto, información compartida, apoyo y amistad brindada.

Al **M.C. Esteban Velázquez Lizárraga**, por su ayuda incondicional, resolver mis dudas en todo momento, apoyo en laboratorio y sobre todo por su valiosa amistad durante tantos años e ir de la mano siempre avanzando en nuestros estudios.

A mis amigos de maestría, **Amaral, Karina, José Luis, Salwa, César, Tomás**, por coincidir en el camino y hacer divertido este proceso, conocernos, compartir momentos inolvidables y crecer juntos como próximos Maestros en Ciencias.

A mis IBQs, amigos de vida, carrera y CIBNOR, **Gregorio, Crystal y Erika**, por seguir compartiendo conmigo momentos, seguir en este camino creciendo y su valiosa amistad.

A mi **familia**, todos y cada uno que la conforman, por su apoyo incondicional ayer, hoy y siempre. Los amo.

Contenido

Resumen	i
Abstract	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Características de la leche humana.....	3
2.1.1 Composición química de la leche materna.....	3
2.1.2 Presencia de elementos tóxicos en leche.....	5
2.2. Metilación del ADN.	7
2.2.1 Modificación con bisulfito.....	9
2.2.2 Patrones de metilación en cáncer.....	11
2.2.3 Cáncer de mama	12
2.2.4 Apoptosis en cáncer	12
2.2.5 Causas del cáncer	14
2.3. Epigenética ambiental.....	15
2.3.1 Mercurio.....	17
2.3.2 Cadmio	19
2.3.3 Plomo	20
2.3.4 Arsénico.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1. Recolección de muestras.....	26
6.2 Análisis de Hg, Cd, Pb y As	26

6.3 Análisis de apoptosis	27
6.4. Metilación de ADN	27
6.4.1 Extracción de ADN.....	27
6.4.2 Digestión del ADN.....	28
6.4.3 Cuantificación de la metilación global del ADN.....	28
6.4.4 Modificación con bisulfito	30
6.4.5 MSP (Methyl Specific PCR)	31
6.4.6 Análisis de secuencias.....	32
6.5 Análisis estadísticos.....	32
7. RESULTADOS	34
7.1. Base de datos de donantes	34
7.2 Concentración de metales traza en leche materna.....	35
7.3 Cuantificación de células apoptóticas	37
7.4 Metilación global del ADN	40
7.5. Análisis de metilación en la región promotora del gen <i>BRCA1</i>	40
7.6 Comportamiento de variables analizadas respecto al número de embarazos	41
7.7 Comportamiento de variables analizadas respecto al número de abortos...	43
7.8 Efecto de hábito tabáquico sobre variables analizadas.	45
7.9. Efecto de metilación del gen <i>BRCA1</i> sobre variables analizadas.....	48
7.10 Análisis de correlación entre variables analizadas.....	51
7.11 Análisis de Componentes Principales (ACP)	54
8. DISCUSIÓN	56
8.1. Apoptosis y metilación en leche materna.....	56
8.2. Niveles de elementos traza en leche	61
8.3. Efecto del mercurio en leche sobre metilación y apoptosis	61
8.4. Efecto del cadmio en leche sobre metilación y apoptosis.....	65
8.5. Efecto del plomo en leche sobre metilación y apoptosis.....	67
8.6. Efecto del arsénico en leche sobre metilación y apoptosis.....	68
8.7. Integración	71
9. CONCLUSIONES	75
10. RECOMENDACIONES	75
11. LITERATURA CITADA	76

12. ANEXOS 88

Lista de figuras

Figura 1. Secreción de leche por las células mioepiteliales de la glándula mamaria	4
Figura 2. Mecanismo de síntesis y secreción de la leche materna a nivel celular..	4
Figura 3. Esquema de sitios de metilación, islas CpG..	9
Figura 4. Esquema de la conversión química con bisulfito.....	10
Figura 5. Curva estándar del análisis.....	30
Figura 6. Distribución de la concentración de mercurio en leche materna de madres sudcalifornianas	35
Figura 7. Distribución de la concentración de cadmio en leche materna de madres sudcalifornianas	36
Figura 8. Distribución de la concentración de plomo en leche materna de madres sudcalifornianas	36
Figura 9. Distribución de la concentración de arsénico en leche materna de madres sudcalifornianas	37
Figura 10. Células de leche en apoptosis positivas a la técnica TUNEL.....	38
Figura 11. Células epiteliales de leche.....	38
Figura 12. Distribución de frecuencias del número de células apoptóticas en leche	39
Figura 13. Distribución de frecuencias del número de células totales en leche. ...	39
Figura 14. Distribución de frecuencias del porcentaje de metilación global en células de leche	40
Figura 15. Gel de electroforésis de MSP.....	41
Figura 16. Alineamiento de las secuencias obtenidas mediante MSP.	41
Figura 17. Comportamiento de la concentración de metales respecto al número de embarazos en las mujeres donantes.	42
Figura 18. Comportamiento del porcentaje de apoptosis, edad y porcentaje de metilación global respecto al número de embarazos en las mujeres donantes. ...	43
Figura 19. Comportamiento de la concentración de metales respecto al número de abortos en las mujeres donantes.	44
Figura 20. Comportamiento del porcentaje de apoptosis, edad y porcentaje de metilación global respecto al número de abortos en las mujeres donantes.	45
Figura 21. Efecto del hábito tabáquico sobre concentración de metales	46
Figura 22. Efecto del hábito tabáquico sobre aborto, apoptosis, edad y embarazos	47
Figura 23. Efecto del hábito tabáquico sobre metilación global	48
Figura 24. Efecto de la metilación del gen <i>BRCA1</i> sobre concentración de metales.	49
Figura 25. Efecto de la metilación del gen <i>BRCA1</i> sobre abortos, apoptosis, edad y embarazos.....	50
Figura 26. Efecto de la metilación del gen <i>BRCA1</i> respecto a metilación global .	51
Figura 27. Relación entre el porcentaje de metilación global y el porcentaje de apoptosis.....	52

Figura 28. Relación entre el porcentaje de metilación global y la edad de las donantes	53
Figura 29. Relación entre el porcentaje de apoptosis y la edad de las donantes. 53	
Figura 30. Gráfico de coordenadas de las variables utilizadas en el análisis de componentes principales	55
Figura 31. Cromatograma correspondiente a la secuencia positiva para metilación, donante 7.	93
Figura 32. Cromatograma correspondiente a la secuencia positiva para metilación, donante 32.	93

Lista de tablas

Tabla I. Estudios sobre concentraciones de elementos traza considerados tóxicos en leche materna.....	6
Tabla II. Estudios realizados respecto a la presencia de metales y metaloides en la península de Baja California Sur.....	7
Tabla III. Efecto de elementos tóxicos sobre mecanismos celulares, epigenéticos y cáncer en humanos.....	17
Tabla IV. Resumen de investigaciones de efectos epigenéticos por Hg.	18
Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para análisis del gen <i>BRCA1</i> mediante MSP	31
Tabla VI. Estadística descriptiva de la población de estudio	34
Tabla VII. Concentración de elementos traza seleccionados en leche materna...	35
Tabla VIII. Matriz de correlación.	52
Tabla IX. Componentes principales de las variables de los análisis en leche materna y variables clínicas de las mujeres sudcalifornianas.....	54
Tabla X. Concentración de Hg en leche materna de madres sudcalifornianas y comparación con referencias	62
Tabla XI. Concentración de Cd en leche materna de madres sudcalifornianas y comparación con referencias	65
Tabla XII. Concentración de Pb en leche materna de madres sudcalifornianas y comparación con referencias	68
Tabla XIII. Concentración de As en leche materna de madres sudcalifornianas con referencias.	69

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el cáncer con mayor incidencia en las mujeres a nivel mundial. Se estima que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y 458,000 decesos (OMS, 2016). En México, 19.4% del total de casos de cáncer diagnosticados en la población mayor a 20 años en 2014 correspondieron a este tipo de cáncer (INEGI, 2016). En 2015 en Baja California Sur (B.C.S.) se registró una tasa de mortalidad de 16 por cada 100 mil mujeres mayores de 25 años ubicándose en la posición 17 a nivel nacional (SS, 2017). La causa de cáncer de mama es multifactorial, en la que intervienen tanto factores genéticos como no genéticos (Torrades, 2003). El riesgo es mayor con ciertos antecedentes familiares y mutaciones en genes de células germinales (Lacey *et al.*, 2009). Sin embargo, estas mutaciones solo explican el cáncer mamario hereditario, el cual representa menos de 10% del total de cáncer de mama (De Jong *et al.*, 2002), mientras que 90% corresponde al cáncer de mama esporádico, es decir asociado a factores no heredables (Drobovic y Simpfendorfer, 1997) en particular en mujeres con mayor susceptibilidad. Los principales genes involucrados a la susceptibilidad al cáncer de mama son los genes *BRCA* (*Breast Cancer*); estudios recientes atribuyen entre el 45 y 60% de los casos de cáncer de mama hereditario a mutaciones en estos genes (Begg, 2002). Más específicamente, se ha observado que el gen *BRCA1* tiene un nivel de expresión disminuido en tumores esporádicos de glándula mamaria respecto al epitelio normal (Drobovic y Simpfendorfer, 1997).

Por otro lado, la expresión y progresión del cáncer aumenta cuando las mujeres están expuestas a contaminantes ambientales y elementos tóxicos, lo cual se conoce como epigenética. El término “epigenética” se refiere a cambios no mutagénicos en la expresión del genoma, que no son resultado de alteraciones en la secuencia nucleotídica, por lo tanto es una regulación de la expresión de los genes que depende del estado de la dinámica de la cromatina (Arita y Costa, 2009). Los patrones de metilación en el ácido desoxirribonucleico (ADN) son establecidos en el desarrollo temprano, modulados durante la diferenciación

celular e interrumpidos en muchos estados patológicos, incluido el cáncer (Bird, 2002). Estudios recientes implican alteraciones en el patrón de metilación en el gen *BRCA1* en cáncer de mama en un estado temprano, lo cual es relevante ya que un diagnóstico en una etapa inicial en esta patología, es el factor más importante para disminuir la mortalidad (Jong *et al.*, 2002).

Entre los contaminantes ambientales tóxicos para el ser humano, se ha reportado la presencia de metales como mercurio (Hg), cadmio (Cd) y plomo (Pb), así como el metaloide arsénico (As) en B.C.S. (Méndez *et al.*, 2006; Cadena *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2009). Aunque dichos elementos se encuentran de manera natural en el ambiente, su disponibilidad puede ser alterada por actividades antropogénicas. La mayor parte de los estudios en B.C.S. se han enfocado al ambiente marino, particularmente en organismos y sedimentos; sin embargo, se ha demostrado la presencia de estos elementos en leche materna de madres sudcalifornianas y de la región noroeste (Gaxiola *et al.*, 2013; 2014). Dichos elementos tóxicos son persistentes y se bioacumulan en diversos órganos y tejidos (como la glándula mamaria) y pueden transferirse a la leche. Efectos acumulativos de la exposición a distintos factores ambientales hacen que la edad sea el mayor factor de riesgo para presentar este tipo de cáncer (Torrades, 2003).

En la presente tesis tiene como meta analizar los niveles de metales y metaloides en leche de mujeres lactantes en B.C.S. con el patrón de metilación del ADN, cuantificando tanto a nivel global como gen específico en *BRCA1*. Actualmente, la detección de cáncer de mama se basa en palpación y mamografía; ambos detectan tumores ya formados. Aquí buscamos alternativas nuevas de diagnóstico, tales como biomarcadores moleculares en matrices no invasivas, como es la leche materna.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de la leche humana

La leche materna es el alimento ideal para los infantes, dado que proporciona nutrientes (lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales) y factores bioactivos no nutritivos (hormonas, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, agentes antiinflamatorios y antimicrobianos) para cubrir las necesidades del infante (Casanova, 2017). La lactancia materna entonces, se define como la práctica en la cual la madre alimenta a su bebé, mediante este alimento necesario para su desarrollo inmediato y posterior. Existen abundantes estudios que han demostrado que esta práctica es un proceso único que contribuye a la nutrición y sano desarrollo de los infantes, además de tener impactos positivos en la salud de las madres, por lo tanto es de suma importancia impulsar esta cultura (Ballard y Morrow, 2013; Zhang, 2014; WHO, 2016).

La síntesis de la leche se lleva a cabo en la glándula mamaria y es activada por la señal directa de estimulación del pezón y aureola, que retransmiten al sistema nervioso central, junto con la secreción de las hormonas prolactina y oxitocina. La secreción de leche es realizada por células epiteliales de los alveolos de la glándula mamaria, como se muestra en la figura 1. A su vez, nutrientes y minerales necesarios para el desarrollo del infante se transportan desde el plasma hasta las células mamarias (Wagner *et al.*, 2015), donde ocurre el mecanismo de síntesis y secreción a nivel celular, como se muestra en la figura 2.

2.1.1 Composición química de la leche materna.

La producción de leche experimenta variaciones en su composición de acuerdo a la etapa de lactancia, pero también presenta variaciones durante la misma toma y a lo largo del día. Así, se denomina calostro a la secreción que sale de las glándulas mamarias desde la fase final del embarazo y hasta el quinto día posparto.

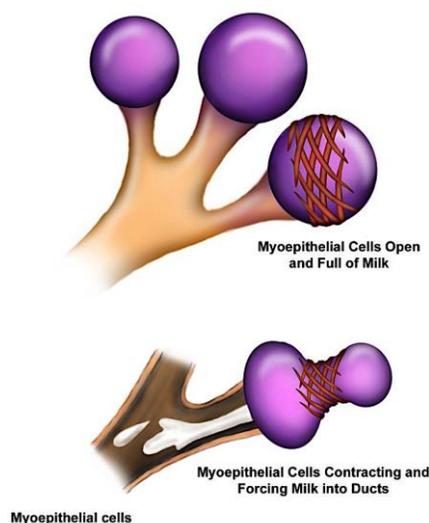


Figura 1. Secreción de leche por las células mioepiteliales de la glándula mamaria. Apertura y contracción de las células (Wagner *et al.*, 2015).

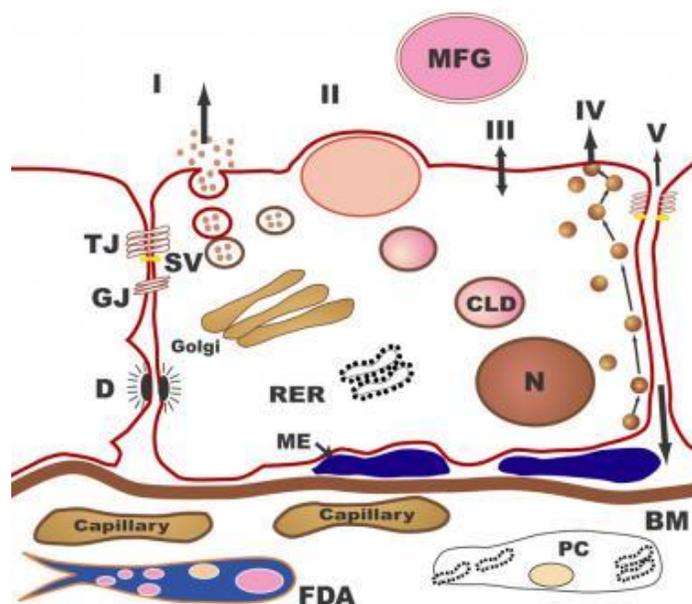


Figura 2. Mecanismo de síntesis y secreción de la leche materna a nivel celular. I: Exocitosis de componentes de la fase acuosa de la leche mediante vesículas secretoras (SV). II: Secreción de los componentes lipídicos mediante glóbulos de grasa. III: Transporte directo de iones, agua y glucosa a través de la membrana. IV: Transcitosis de componentes del espacio intersticial. V: Vía paracelular para componentes plasmáticos y leucocitos. RER = Retículo endoplasmático rugoso; BM = Membrana basal; MFG = Glóbulo de grasa láctea; CLD = Gotita lipídica citoplasmática; N = Núcleo; PC = Plasma celular; FDA = Adipocito vaciado; TJ = Unión firme; GJ = Unión espaciada; D = Desmosoma; ME = Célula mioepitelial (Wagner *et al.*, 2015).

El calostro se caracteriza por tener una alta concentración proteica (inmunoglobulinas, leucocitos, antioxidantes) y baja concentración de grasa. Posteriormente, la leche se denomina de transición hasta 15 días después del parto, en esta etapa disminuyen los niveles de proteínas y aumenta la lactosa, grasas y valor calórico total. Después de 15-20 días se le conoce como leche madura; el contenido de proteínas es bajo, mientras que las grasas constituyen la principal fuente de energía para el lactante. Los triglicéridos, ácidos grasos esenciales (oleico, palmítico, linoleico y alfa-linoleico) y los polinsaturados de cadena larga (ácido araquidónico y docosahexanoico), fosfolípidos y colesterol son los principales compuestos lipídicos, mientras que la lactosa es el principal carbohidrato, constituyendo 90% del total (Zhang, 2014).

Existen factores externos y ambientales que influyen en la composición de la leche materna, como son el estado nutricional de la madre y la composición de su dieta e influyen principalmente en concentración de ácidos grasos y factores estimulantes inmunológicos (Zhang, 2014). A partir de 1998 se ha recomendado el suministrar a las mujeres embarazadas ácido fólico (FO) y diversos minerales como el calcio (Ca), e incluyendo algunos elementos traza como magnesio (Mg), cobre (Cu), cobalto (Co), y molibdeno (Mo) y otros macronutrientes como hierro (Fe), selenio (Se), cromo (Cr) y fósforo (P) (Stoltzfus y Dreyfuss, 1998; Peña y Viteri, 2009). Se sabe que estos elementos van disminuyendo a través del tiempo de lactancia (Rossipal y Krachler, 1998; Yamawaki *et al.*, 2005), a excepción de Co, el cual en el 100% de los casos analizados aumenta (Rossipal y Krachler, 1998). Otros elementos como son sodio (Na), potasio (K) y cloro (Cl), mantienen niveles estables por lo menos durante los primeros cuatro meses de lactancia (Wack *et al.*, 1997).

2.1.2 Presencia de elementos tóxicos en leche.

La leche también presenta elementos traza, como Cd, Pb y As, que son tóxicos cuando aumenta su concentración. Así mismo, la leche materna no se encuentra exenta de presentar otros compuestos tóxicos como plaguicidas y

medicamentos, provenientes del consumo directo de organismos pertenecientes a distintas cadenas tróficas y exposiciones ambientales (Díaz *et al.*, 2013). Estos pueden acumularse en los tejidos grasos, incluyendo la glándula mamaria (Ortega, 2014), como es el caso de plaguicidas y algunos medicamentos, o en huesos, como es el caso de Pb (Gulson, 1998). Durante la lactancia, estos elementos pueden ser movilizados, a través del sistema sanguíneo (Fergusson, 1990) y finalmente excretado vía leche materna. Su concentración en la leche depende de la dosis ingerida, duración de la exposición, el volumen de leche excretado al día, la salud de la madre lactante y su genotipo (Aresta *et al.*, 2005).

Recientemente, se reportó la presencia de elementos traza en leche materna de mujeres de B.C.S. (Gaxiola *et al.*, 2013; 2014) y en otras partes del mundo (Tabla I).

Tabla I. Estudios sobre concentraciones de elementos traza considerados tóxicos en leche materna.

	Región	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$*	Autor y Año
Hg	Austria	1.59	Gundacker <i>et al.</i> , 2002
	México	1.23	Gaxiola <i>et al.</i> , 2013
	Arabia Saudita	3.10	Al Saleh <i>et al.</i> , 2003
Cd	Alemania	0.07 no fumadoras 0.16 fumadoras	Radisch <i>et al.</i> , 1987
	Arabia Saudita	1.73	Al Saleh <i>et al.</i> , 2003
	Grecia	0.19	Leotsinidis <i>et al.</i> , 2005
	México	1.5	Ettinger <i>et al.</i> , 2004
Pb	Austria	1.63	Gundacker <i>et al.</i> , 2002
	Arabia Saudita	31.67	Al Saleh <i>et al.</i> , 2003
	México	9.2	Namihira <i>et al.</i> , 1993
	Grecia	0.48	Leotsinidis <i>et al.</i> , 2005
	Alemania	0.20	Sternowsky <i>et al.</i> , 2002
As	Islas Faroe	2.45	Grandjean <i>et al.</i> , 1995
	Bangladesh	0.5	Islam <i>et al.</i> , 2014
	USA	0.31	Carignan <i>et al.</i> , 2015

*Valores reportados = promedio

Estos elementos se encuentran en la zona noroeste del país debido a su presencia en el ambiente y actividades antropogénicas desarrolladas en la región, principalmente minería (SGM, 2016) (Tabla II).

Tabla II. Estudios realizados respecto a la presencia de metales y metaloides en la península de Baja California Sur.

Autor	Región	Contaminante	Entidad
Kot <i>et al.</i> , 1999	La Paz	Hg	Sedimento
Shumilin <i>et al.</i> , 2001	La Paz	As	Sedimento
Sánchez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2001	Loreto	As	Alga marina
Mendez <i>et al.</i> , 2006	La Paz	Cd	Almeja
Kampalath <i>et al.</i> , 2006	Bahía Magdalena	THg, MeHg	Tortuga, alga marina, sedimento
Méndez <i>et al.</i> , 2007	Bahía Magdalena	Pb, Cd	Almeja
Rodríguez Meza <i>et al.</i> , 2009	Bahía Concepción	As	Sedimento
Cadena Cárdenas <i>et al.</i> , 2009	Golfo de California	Cd, Pb	Mejillón, almeja
Ley Quiñonez <i>et al.</i> , 2011	Puerto López Mateos	Cd, Hg, Pb	Tortuga
Barrera Garcia <i>et al.</i> , 2013	Baja California Sur	Hg, Cd, Pb, As	Tiburón Azul
Gaxiola Robles <i>et al.</i> , 2013	Baja California Sur	THg	Leche materna
Wurl <i>et al.</i> , 2014	San Antonio, El Triunfo	As	Agua
Gutiérrez Caminero <i>et al.</i> , 2015	San Antonio El Triunfo	Pb	Sedimento, rocas.

Además, son persistentes y se bioacumulan en diversos órganos y tejidos (como la glándula mamaria) y así se transfieren a la leche. Pueden tener efectos deletéreos sobre células de la glándula mamaria, del epitelio y células del sistema inmune presentes en la leche. Entre estos efectos, se encuentra la metilación del ADN y la apoptosis, lo cual a su vez puede desencadenar cáncer de mama. La presente tesis tiene como meta evaluar la metilación del ADN y apoptosis en células de leche materna con algunos elementos traza encontrados en ella.

2.2. Metilación del ADN.

El ADN es el material hereditario en los organismos. La información en esta molécula esta empacada en un código de cuatro bases químicas: adenina

(A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). El orden o secuencia, en las bases, determina la información genética (GHR, 2017). Un gen es la unidad básica y funcional de la herencia donde se contienen las instrucciones para crear las proteínas constitutivas que darán funcionalidad a una célula (GHR, 2017). La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metil, mediante la actividad de la enzima ADN metiltransferasa (DNMT, por sus siglas en inglés) en la posición 5' en el carbono del anillo de citosina, dando como resultado 5-metilcitosina (5meC) (Baylin, 2005).

Las secuencias blanco para la metilación del ADN en mamíferos son los dinucleótidos 5'-CpG-3' (Fig. 3). Los dinucleótidos CpG no se encuentran distribuidos de manera uniforme a través del genoma, si no que se concentran en regiones de secuencias genómicas repetitivas, denominadas "islas CpG", las cuales están comúnmente asociadas a las regiones promotoras de los genes (Bird, 2002). La función de la metilación del ADN es mantener el silenciamiento transcripcional en regiones no codificantes o que no deban expresarse (Baylin, 2005). Por ejemplo, la región que se encuentra altamente metilada de la cromatina, se encuentra condensada e inaccesible para la expresión de dichos genes (heterocromatina), Por el contrario, estos sitios están generalmente no metilados en las regiones promotoras de eucromatina, independientemente del estado transcripcional del gen (Baylin, 2005).

En células somáticas humanas, aproximadamente de 1 al 4% del total de las bases de ADN son 5meC; por lo tanto, la metilación afecta entre el 70–80% de todos los dinucleótidos de CpG en el genoma (Ehrlich, 1982). El análisis computacional del genoma humano predice 29,000 islas CpG (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001) y se estima que aproximadamente el 60% de los genes humanos estén asociados con islas CpG, los cuales se encuentran en un estado no metilado a través del desarrollo y en la mayoría de tejidos celulares (Antequera y Bird, 1993).

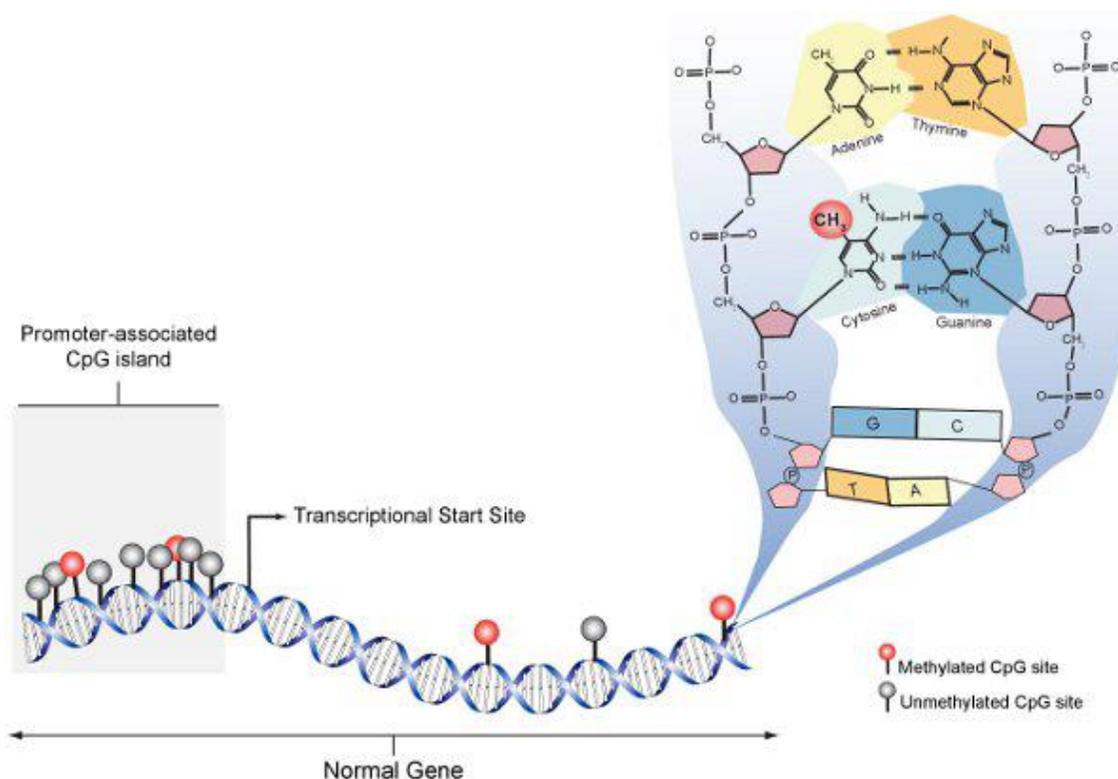


Figura 3. Esquema de sitios de metilación, islas CpG. En una célula normal, el promotor-asociado a islas CpG está predominantemente no metilado (gris), mientras que los sitios CpG dentro del cuerpo del gen están esparcidos y generalmente metilados (rojos). El panel de la derecha muestra la estructura molecular del ADN en sitios individuales CpG y muestra la metilación con una molécula CH₃ en el carbono 5 de la citosina (Patterson *et al.*, 2011).

2.2.1 Modificación con bisulfito

La conversión química del ADN con bisulfito de sodio fue primeramente reportada por Frommer *et al.* (1992), posteriormente optimizada por Clark *et al.* (1994). Este método se ha convertido en el estándar para el análisis de metilación en el ADN, ya que en este, se pretende definir el estado de la metilación en cada base citosina en una secuencia determinada, dando como resultado una resolución molecular. La clave en este método es una reacción química selectiva entre el bisulfito de sodio y los residuos de citosina versus residuos de 5 metil citosina; la cual es altamente específica a nivel de una hebra de ADN por lo cual se trabaja con el material genético desnaturalizado (Clark *et al.*, 2006).

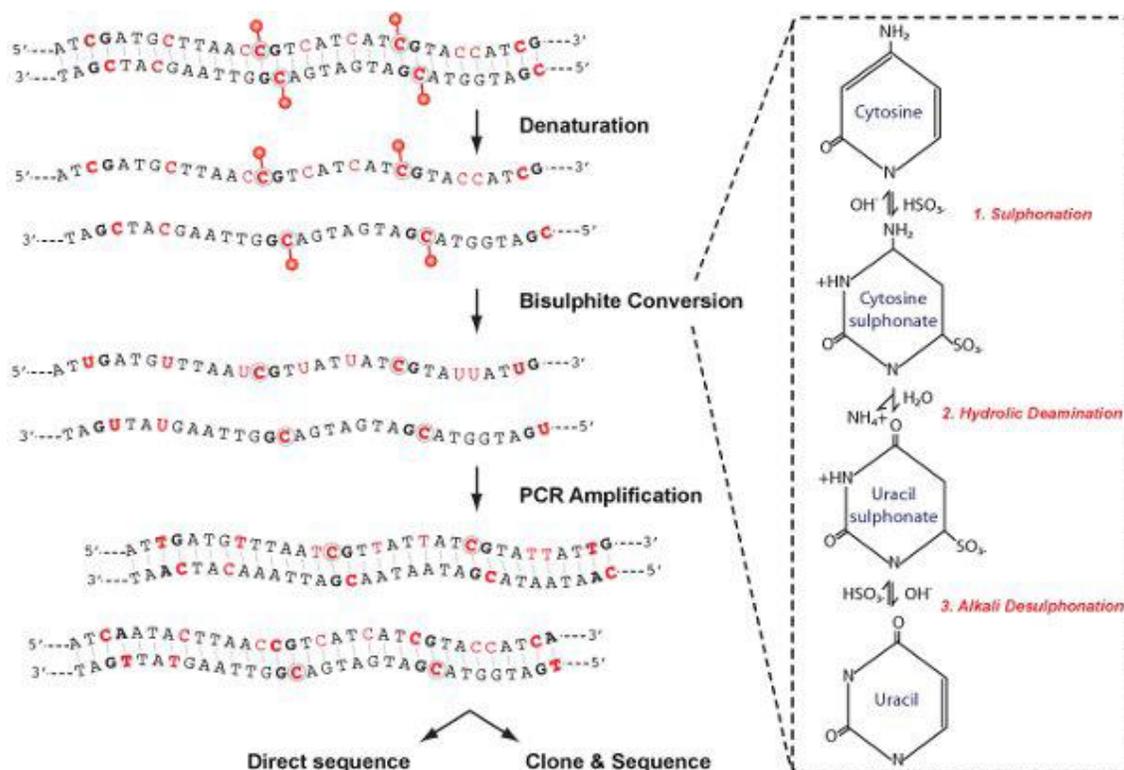


Figura 4. Esquema de la conversión química con bisulfito. El análisis de la metilación de ADN se compone de cuatro fases. 1. Desnaturalización de la molécula, 2. Conversión con bisulfito (panel derecho se observa la modificación de la molécula de citosina durante la reacción con bisulfito en tres pasos detallados) 3. Amplificación mediante PCR 4. Análisis por secuenciación directa o con previa clonación (Patterson *et al.*, 2011).

La conversión con bisulfito de sodio consta de tres pasos críticos: la sulfonación, donde la reacción entre el bisulfito y el doble enlace en la posición 5-6 de la molécula de citosina da como resultado un derivado de sulfonato de citosina. Posteriormente una desaminación hidrolítica, que da como resultado un derivado de sulfonato de uracilo. Por último, la desulfonación alcalina que consiste en la eliminación del grupo sulfonato por tratamiento álcali (Fig. 5). Posteriormente, se lleva a cabo la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), donde las moléculas de uracilo (U) son amplificadas como timinas (T), mientras que las 5meC son amplificadas como citosinas. Por

último, para determinar la metilación a nivel de nucleótidos, el amplicon puede ser secuenciado directamente o mediante previa clonación

2.2.2 Patrones de metilación en cáncer

Una hipometilación a nivel global se observa como un patrón definido en cáncer, lo cual denota una disminución en el contenido general de 5meC. Este comportamiento fue determinado por estudios en los cuales se observó una reducción en contenido de la metilación comparando tejidos cancerosos y sanos (Feiberg y Vogelstein, 1983; Gama *et al.*, 1983).

Por otro lado, genes específicos silenciados mediante metilación pueden ser un mecanismo importante en la carcinogénesis, cuando son genes involucrados en la supresión del tumor. La inactivación de la expresión de los genes mediante la metilación en las regiones promotoras de tales genes ha sido observada en líneas celulares de cáncer y tumores humanos (O'Doherty *et al.*, 2002). La isla CpG en la región promotora del gen *BRCA1*, presenta una longitud aproximada mayor de 2 kb. El estado de la metilación en esta región ha sido ampliamente investigado en diferentes tipos de tumores, en líneas celulares y tejidos normales de seno y ovario (De Jong *et al.*, 2002). Estos estudios demostraron que la metilación de *BRCA1* es tumor específico, generalmente ausente en células normales (Mancini *et al.*, 1998) y usualmente se acompaña de pérdida de heterocigosidad (Esteller *et al.*, 2000). En resumen, los cambios en el patrón de la metilación del ADN causantes de distintos tipos de cáncer pueden ser caracterizados por la hipermetilación de las islas CpG y una hipometilación genómica generalizada.

El papel que juega la hipermetilación en determinados genes supresores de tumores ha sido bien establecido, por lo tanto, pueden disponerse como biomarcadores de predisposición a cáncer, por lo tanto ha sido utilizado como biomarcador del cáncer de próstata, donde se encuentran hipermetiladas las islas CpG de los genes *GSTP1* *RARB* y *RASSF1A* (Cho *et al.*, 2007). Tal es el caso de

la hipermetilación en el gen *MLH1* implicado en cáncer colorectal (Kane *et al.*, 1997), el gen *VHL* (von Hippel-Lindau) en cáncer renal y el gen *p16/CDKN2A* en varios cánceres malignos (Herman *et al.*, 1995), los cuales están silenciados mediante este mecanismo.

2.2.3 Cáncer de mama

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades que involucra crecimiento anormal de células, por lo general sin control, llegando a invadir los tejidos u órganos de los cuales forman parte o incluso invadir otros tejidos (NCI, 2017) y formando tumores. Esta proliferación celular es acelerada, desordenada y descontrolada a nivel genético, debido a mutaciones en genes específicos, los cuales actúan suprimiendo o estimulando la continuidad controlada del ciclo celular (Torrades, 2003). En el caso del cáncer de mama, se encuentra afectado el tejido mamario y específicamente, las células que recubren a los conductos y a los lobulillos en la mama.

2.2.4 Apoptosis en cáncer

Una célula cancerígena difiere de una célula normal en tres aspectos principales: 1) pérdida de la capacidad de muerte celular programada (apoptosis); 2) carecer de especialización (diferenciación celular); 3) pueden llegar a evadir el sistema inmune (NC1, 2017). La apoptosis o muerte celular programada, elimina una célula incapaz de recibir señales de la supervivencia y/o capaz de recibir señales de la muerte de otras células, por lo tanto es un proceso importante que influye en la transformación maligna de las células (Shi *et al.*, 2004). Este mecanismo puede ser activado por una serie de señales intrínsecas o extrínsecas, incluyendo radiaciones iónicas o ultravioleta (UV), infecciones virales o bacterianas, deficiencia de nutrientes, expresión de oncogenes, agentes oxidantes, entre otros (Wang y Shi, 2001). Se han reportado varios elementos traza considerados tóxicos (cromo (Cr), vanadio (V), níquel (Ni), Cd y As) que son

capaces de inducir apoptosis (Azzouzi *et al.*, 1994; Blankenship *et al.*, 1994; Schieven *et al.*, 1995), sin embargo, el mecanismo y efecto sobre apoptosis sigue sin estar del todo claro. La apoptosis se puede inducir por efecto, entre otros, de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales derivan de forma natural del metabolismo mitocondrial, pero pueden ser generadas a mayores niveles por la presencia de metales, lo cual produce un desbalance en la generación y defensa antioxidante y puede derivar en daño oxidativo a nivel de lípidos, proteínas y ADN, así como afectación en niveles y funciones de moléculas de señalización celular (tales como AP-1, NF-kB, y p53) inductoras de apoptosis (Karin y Delhase, 1998) y eventualmente, carcinogénesis (Shi *et al.*, 2004).

En cuanto a los elementos que se abordaran en este trabajo, Morcillo (2016) evaluó los efectos de la citotoxicidad inducida por Hg, MeHg, Cd, Pb y As en una línea celular del pez *Sparus aurata*, encontrando el aumento significativo en ROS y un aumento en la expresión de genes reguladores de apoptosis, confirmando resultados de investigaciones donde en caso de exposición a MeHg se determinó que la muerte celular observada era mediante el mecanismo de apoptosis (Risso-De Faverney *et al.*, 2004; Luizo *et al.*, 2013). En el estudio de Jimi *et al.* (2004), la exposición de células cultivadas a Cd y As resultó en la formación del producto de la peroxidación (oxPC) y una disminución del potencial mitocondrial de la membrana, culminando en muerte celular por apoptosis. Por lo tanto, la citotoxicidad inducida por Cd y As parece ser reguladas por un mecanismo similar.

La apoptosis desempeña un papel importante en varias etapas del desarrollo mamario normal incluyendo la formación del lumen intraductal durante la morfogénesis de los conductos del pecho, así como en el final del ciclo menstrual y en la involución de glándulas mamarias después de la cesación de la lactancia (Hahm y Davidson, 1998; Debnath *et al.*, 2002) El mecanismo de apoptosis puede servir como biomarcador de detección temprana debido a que la

evasión de este mecanismo es un componente crítico en la transformación oncogénica y resistencia a la quimioterapia.

2.2.5 Causas del cáncer

Las causas de cáncer de mama son multifactoriales, en la que intervienen tanto factores genéticos como no genéticos (Torrades, 2003). El cáncer de mama hereditario representa del 5 al 9% de todos los cánceres de mama (Ford y Easton, 1995). Los genes *BRCA1* y *BRCA2* (*Breast Cáncer*) se han asociado particularmente a este tipo de cáncer, siendo responsables de aproximadamente el 80% de cáncer hereditario en familias que lo padecen (Rebbeck *et al.*, 1996; Greene, 1997), y siendo el resto determinado por mutaciones en otros genes. Sin embargo, la mayoría de los casos de cáncer de mama (90–95%) corresponden a cáncer de mama esporádico, resultado de mutaciones esporádicas en las células somáticas. descartando una alteración genética heredada que sea responsable de la aparición. Ambos tipos de cáncer están también condicionados por factores ambientales, considerados factores de riesgo, tales como: el estilo de vida, alimentación, exposición a carcinogénicos, agentes mutagénicos y a promotores de estrés oxidativo (De Jong *et al.*, 2002). Los efectos acumulativos de dicha exposición a distintos factores ambientales hacen que el avance de la edad sea el mayor factor de riesgo para presentar este tipo de cáncer (Torrades, 2003).

Actualmente la evidencia científica y el aumento en el número de estudios respecto a mecanismos implicados en la carcinogénesis, han demostrado que una exposición a contaminantes ambientales y elementos tóxicos pueden jugar un papel en el desarrollo y progresión del cáncer. Específicamente, modificaciones aberrantes en el patrón de metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) han sido involucradas en el desarrollo de cáncer y su progresión. Esto es debido a que el patrón de metilación es heredado con una gran fidelidad en las células somáticas, y una vez que la metilación aberrante es inducida, es transmitido a las células

hijas después de la división celular (Ushijima *et al.*, 2003). El mecanismo principal es la inactivación de genes supresores de tumores y el silenciamiento de oncogenes como el *BRCA1* (Baylin, 2005; Bollati y Baccarelli, 2010; Hattori y Ushijima 2014), junto con las mutaciones y pérdidas cromosomales (Hattori y Ushijima, 2014); a lo anterior se le conoce como epigenética ambiental.

2.3. Epigenética ambiental

La epigenética se refiere al estudio de cambios hereditables en la expresión de genes, sin haber un cambio en la secuencia nucleotídica (Bollati y Baccarelli, 2010). Los mecanismos epigenéticos se ven alterados por distintos factores ambientales tales como la constante exposición a sustancias químicas consideradas contaminantes, ya sea en el ambiente o a través de los alimentos (Lee *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2012). En estudios ambientales, la flexibilidad de los estados epigenéticos ha generado un creciente interés en evaluar las alteraciones directas que las exposiciones ambientales pueden producir en los estados epigenéticos incluyendo cambios en la metilación del ADN y modificaciones de histonas (Bollati y Baccarelli, 2010). La asociación entre la metilación del ADN y los elementos considerados tóxicos para el humano, principalmente los denominados “metales pesados” (Hg, Cd, Pb), As y Ni ha sido establecida por varios estudios *in vitro* (McVeigh *et al.*, 2001; Bleich *et al.*, 2006; Dolinoy *et al.*, 2007; Wright y Baccarelli, 2007). Diversos estudios han demostrado que los elementos considerados contaminantes ambientales, principalmente metales, actúan como catalizadores en la oxidación de macromoléculas biológicas (Galaris y Evangelou, 2002). Los iones metálicos inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la acumulación de éstos puede afectar mecanismos epigenéticos. Evidencia creciente ha asociado alteraciones epigenéticas con la exposición a metales (Tabla III).

Existen varias ventajas al usar datos epigenéticos en el proceso de evaluación de riesgos toxicológicos, entre ellas que: las alteraciones epigenéticas pueden ser usadas como biomarcadores del efecto sobre la exposición a tóxicos ambientales; a su vez, estos biomarcadores epigenéticos pueden ser utilizados como predictores de enfermedades cuando tales marcas epigenéticas están asociadas con la expresión génica diferencial (Ray *et al.*, 2014). Particularmente en BCS se ha reportado la presencia de elementos tóxicos como el Hg, Cd, Pb, As (Gaxiola *et al.*, 2013), así como plaguicidas organoclorados y sus metabolitos (Casanova, 2017) en leche materna y en otras distintas matrices (Tabla II).

Tabla III. Efecto de elementos tóxicos sobre mecanismos celulares, epigenéticos y cáncer en humanos.

Autor y Año	Elemento	Tejido/ Fluido	Otros factores	Mecanismo	Observaciones
Tellez Plaza <i>et al.</i> , 2014	As* Cd	Sangre Orina	Edad Hábito tabáquico Alcohol	Metilación global del ADN	Concentraciones altas de As fueron asociadas con una hipometilación.
Hossain <i>et al.</i> , 2012	As Cd	Sangre Orina	-	Metilación global del ADN Metilación en genes	Concentraciones a bajos niveles de Cd fueron asociadas con hipometilación en elementos repetitivos del genoma. Concentración de As urinario fue asociado positivamente a metilación en los genes <i>p16</i> y <i>MLH1</i> .
Green <i>et al.</i> , 2015	As	Placenta Orina	-	Metilación en genes específicos	163 loci diferencialmente metilados asociados a la presencia de As en placenta.
Sen <i>et al.</i> , 2015	Pb	Sangre	Hábito tabáquico Número de embarazos	Metilación en islas CpG del epigenoma	6 genes que mostraron cambios dependientes de la concentración de Pb en el estado de metilación
Goodrich <i>et al.</i> , 2013	Hg	Orina Cabello Alimentación	Edad Sexo	Metilación global en elementos repetitivos y genes específicos	Correlación con la edad a nivel de metilación global

*As: inorgánico, %MMA, %DMA

2.3.1 Mercurio

Entre las principales fuentes de Hg para el ser humano se encuentran las amalgamas dentales, compuestos en cosméticos para blanquear la piel y el consumo de pescado (WHO, 1990). La concentración de Hg que contiene la leche humana es pequeña ($<2 \mu\text{g L}^{-1}$); aunque en situaciones de exposición a elevados niveles, se ha demostrado que la leche materna es una vía importante de transferencia de dicho metal de la madre al niño (Mata *et al.*, 2003). Gaxiola *et al.*

(2013) encontraron concentraciones de Hg total (THg) en leche de mujeres del noroeste de México, en un rango de 1.23 a 2.96 $\mu\text{g L}^{-1}$. Al-Saleh *et al.* (2003) encontraron que el 79.6% de las mujeres lactantes en Arabia Saudita tenían niveles de Hg por arriba o igual a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Gundacker *et al.* (2014) por otro lado, reportaron concentraciones de Hg en mujeres lactantes de Viena, Austria como monitoreo de contaminación urbana, a un nivel promedio de $1.59 \pm 1.21 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla IV. Resumen de investigaciones de efectos epigenéticos por Hg.

Especies	Tejido/ Tipo celular	Elemento	Efecto	Referencia
Oso polar	Tronco encefálico	MeHg	Reduce la metilación global en machos pero no en hembras	Pilsner <i>et al.</i> , 2010
Visón	Corteza occipital	MeHg	Reduce metilación global y actividad de DNMT	Basu <i>et al.</i> , 2013
Pollos	Cerebro	MeHg	Ningún efecto en la metilación global o actividad de DNMT	Basu <i>et al.</i> , 2013
Perca amarilla	Telencéfalo	MeHg	Ningún efecto en la metilación global del ADN	Basu <i>et al.</i> , 2013
Lombriz	Organismo completo	Hg	Reduce metilación global del ADN	Santoyo <i>et al.</i> , 2011
Ratón	Hipocampo del cerebro	MeHg	Supresión del promotor en gen <i>Bdnf</i> vía hipermetilación	Onishchenko <i>et al.</i> , 2008
Ratón	Células madre embrionarias	Hg	Alteraciones reversibles de la heterocromatina por hipermetilación del gen <i>Rnd2</i>	Arai <i>et al.</i> , 2011
Rata	Hígado	MeHg	Reduce expresión de ARNm de <i>Dnmt1</i> y <i>Dnmt3b</i> , decrece la metilación en regiones CpG en promotor del gen <i>Cdkn2a</i> y ningún efecto en metilación global del ADN o abundancia de SAM.	Desaulniers <i>et al.</i> , 2009
Humano	Sangre	Hg	Hipermetilación del promotor del gen <i>GSTM1/5</i>	Hanna <i>et al.</i> , 2012

MeHg = Metilmercurio, DNMT = ADN metiltransferasa, SAM = S-adenosilmetionina.

Existen pocos estudios sobre cambios en los patrones de metilación del ADN en humanos en relación a Hg; sin embargo investigaciones en mamíferos sugieren una relación entre la concentración y tiempo de exposición a MeHg y la interrupción del proceso de metilación del ADN (Tabla IV). Al haber cambios en la metilación global del ADN por causa a la exposición de contaminantes

persistentes en el ambiente ha sugerido que cambios en el patrón de metilación global del ADN puede ser utilizado como biomarcador de exposición a agentes químicos (Arita *et al.*, 2009); aunque no hay estudios que vinculen la hipometilación global con algún resultado específico de salud (Basu *et al.*, 2013).

2.3.2 Cadmio

La alimentación con productos contaminados con Cd así como la exposición al humo del cigarro han sido consideradas como las principales causas de acumulación de este elemento en humanos (WHO, 1992). La excreción del Cd es muy lenta, ya que su vida media en el organismo es de 10 a 30 años. Se excreta principalmente en la orina, pero puede llegar a encontrarse en la leche materna (Osorio *et al.*, 1997). En mujeres expuestas ocasionalmente a este elemento, se han visto variaciones que van de 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ en los primeros días después del parto hasta concentraciones de 0.1 a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ después de seis meses (Osorio *et al.*, 1997). En general, las concentraciones de Cd reportadas en la literatura varían significativamente respecto al lugar de estudio. WHO (1989) reporta concentraciones de 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ en Alemania y Suecia, mientras que en Nigeria reportan niveles de 4.6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Turan *et al.* (2001) reportaron en la población Turca una concentración promedio de Cd en leche de 2.8 $\mu\text{g L}^{-1}$. El reporte de concentración más bajo en la literatura corresponde a Leotsinidis *et al.* (2005) en mujeres lactantes de Grecia, con intervalos de 0.15 – 0.48 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se han reportado niveles de Cd mayores (0.16 $\mu\text{g L}^{-1}$) en madres fumadoras de más de diez cigarrillos al día o madres fumadoras pasivas que en las no fumadoras (0.07 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Radisch *et al.*, 1987). El Cd ha sido asociado con cambios en la metilación del ADN y con procesos de carcinogénesis, aunque no es considerado mutagénico (Takiguchi *et al.*, 2003; Benbrahim *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Severson *et al.*, 2012).

2.3.3 Plomo

Las principales fuentes de exposición al Pb son alimentos (cultivos de tubérculos y raíces comestibles), pinturas, cosméticos y en años anteriores a la década de los 90's agentes antiexplosivos en la gasolina (Osorio *et al.*, 1997). Este elemento se excreta a través de orina, heces, cabello, lagrimas, saliva, sudor y leche materna. La mayor cantidad de Pb que llega a la leche de la mujer lactante, proviene de los huesos de la misma mujer. El Pb se encuentra en el sistema óseo debido a una exposición ambiental pasada; durante la lactancia existe un incremento en la movilización de este elemento hacia el plasma sanguíneo y finalmente existe una transferencia hacia la leche materna (Gulson *et al.*, 1998). En un estudio realizado en la Ciudad de México se encontró una relación lineal entre Pb en leche y sangre materna, con niveles máximos de $99 \mu\text{g dL}^{-1}$ en sangre de mujeres lactantes, comparado con el "nivel de preocupación" de $10 \mu\text{g dL}^{-1}$ en sangre del Centro de Control de Enfermedades de E.U.A y hasta de $3.5 \mu\text{g dL}^{-1}$ en leche materna (promedio de $2.47 \mu\text{g dL}^{-1}$), por encima del nivel permisible en agua potable de Australia de $1 \mu\text{g dL}^{-1}$ (Namihira *et al.*, 1993). En mujeres, un nivel en sangre de Pb $<10 \mu\text{g dL}^{-1}$ es considerado el máximo recomendable, dado que la cantidad de Pb en leche materna no debe ser mayor al 5% del encontrado en sangre. Cuando el nivel de Pb en la sangre es mayor a $20 \mu\text{g dL}^{-1}$, también debe ser medido en la leche materna (Gulson *et al.*, 1998).

Respecto a la asociación del Pb con otros elementos químicos, se ha visto que existe una relación inversa entre la ingesta de calcio y la cantidad de Pb absorbido (Palminger *et al.*, 1995). También se sabe que la ingesta de calcio puede reducir la cantidad de Pb que es movilizado de los huesos de la madre, durante la lactancia (Gulson, 1998). En cuanto al ámbito, se ha visto que muestras de leche provenientes de zonas urbanas presentan concentraciones dos veces mayores de Pb respecto a zonas rurales (Leotsinidis *et al.*, 2005).

A la fecha existen pocos estudios que exploren la posible asociación entre la exposición de Pb y la metilación del ADN. Recientemente Sen *et al.* (2015)

observaron una relación entre las madres con alto nivel de plomo en sangre ($>5 \mu\text{g dL}^{-1}$) y patrones diferenciales en la metilación del ADN en 183 sitios CpG, de los cuales 151 estaban hipermetilados y 32 hipometilados en la sangre de los neonatos. Dichas alteraciones epigenéticas generadas por este neurotóxico indica que los daños a la salud pueden ser de por vida, o tal vez incluso transgeneracionales (Basha *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Guilarte *et al.*, 2011; Mazumdar *et al.*, 2012).

2.3.4 Arsénico

La exposición ambiental a este metaloide en su fracción biodisponible puede deberse principalmente a la producción minera. México es uno de los principales productores de As en el mundo, con cerca del 20% de la producción mundial (Albores *et al.*, 1997), usándose directamente en plaguicidas, herbicidas y protectores para madera. En cuanto a la dieta, el principal aporte de As orgánico son los alimentos de origen marino (crustáceos y peces marinos) y por otro lado el agua para ingesta (Albores *et al.*, 1997). Sin embargo, el As presente en alimentos es considerado menos tóxico, debido a que el As orgánico es considerada la forma química con menor toxicidad, a diferencia del As presente en agua de bebida que es principalmente As inorgánico (Albores *et al.*, 1997). En el estudio realizado por Islam *et al.* (2014) en Bangladesh, se encontraron niveles bajos en el contenido de As ($0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) en leche materna con 80% de las muestras por debajo de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, en el primer, sexto y noveno mes de lactancia a pesar del alto contenido de este elemento ($>0.05 \text{ mg L}^{-1}$) en el agua potable. No se encontró correlación entre el As en la leche materna y en la orina de la madre y del infante en los meses muestreados. En concordancia, diversos estudios han reportado baja excreción de As ($<1 \mu\text{g L}^{-1}$) en leche materna (Concha *et al.*, 1998; Sternowsky *et al.*, 2002; Gürbay *et al.*, 2012) aún si se muestrea en poblaciones que habitan zonas contaminadas.

El metabolismo del As consiste en una biotransformación del As inorgánico mediante la adición de grupos metilo que favorece su solubilidad y excreción. Esta reacción es catalizada por la enzima arsénico metiltransferasa (AS3MT), utilizando la S-adenosil metionina (SAM) como donador de grupos metilo, al igual que sucede en la metilación del ADN (Thomas *et al.*, 2004; Drobna *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

En 2013 en México el tumor maligno de mama fue la segunda causa de mortalidad por neoplasias en las mujeres de 20 años y más (INEGI, 2015). Una forma de disminuir la mortalidad es la detección temprana de cáncer de mama. Actualmente, la detección se basa en la examinación clínica del seno y en imágenes de rayos X de las glándulas mamarias para observar anomalías principalmente calcificaciones y masas, denominada mamografía (ACS, 2017). La mamografía se considera la mejor prueba de detección para el diagnóstico de cáncer de mama hasta el momento, sin embargo tiene sus limitaciones y desventajas tales como: falsos positivos o negativos, no puede realizarse a mujeres con padecimientos de corazón, riñón o hígado y no es recomendado como un método rutinario en mujeres jóvenes, dado que es una técnica donde se expone a la mujer a radiación (dosis baja), que puede acumularse con el tiempo (ACS, 2017), por lo que se recomienda realizarse una mamografía anual a partir de los 40 años (Browne *et al.*, 2014).

Avances adicionales para la detección temprana de cáncer de mama son claramente necesarias, principalmente nuevas alternativas de diagnóstico a nivel molecular y genético (Euhus *et al.*, 2007; Wong, 2010). Una de las técnicas que más atención ha recibido es la metilación del ADN. Como tal, la hipermetilación en promotores con islas CPG se ha convertido rápidamente en un biomarcador candidato para la evaluación del riesgo de cáncer de mama (Euhus *et al.*, 2007; Wong, 2010). Esta técnica tiene la ventaja adicional de usar leche materna, que deriva del total de las glándulas mamarias, siendo así un muestreo general de la mama y que además, no es invasivo. Una ventaja adicional es que la leche puede usarse para estudios de contaminantes químicos que se encuentran en ella, así como los metabolitos resultantes de metabolismo de dichos compuestos o elementos que se han acumulado durante la vida de un donante. Sin embargo, aún se desconoce si estos elementos a las concentraciones encontradas en leche materna influyen en mecanismos epigenéticos, específicamente en los niveles de

metilación del ADN que conlleven al desarrollo de cáncer de mama. Este doble uso de la leche materna en los análisis moleculares y químicos lo convierten en una fuente atractiva para estudios epidemiológicos moleculares. En el presente trabajo, se evalúa la contaminación química en leche en relación a nivel epigenético, ya sea a nivel global o en la metilación del gen de estudio (*BRCA1*), así como sobre la apoptosis; las tres técnicas podrían utilizarse como marcadores predictivos en primera instancia de un estado patológico.

4. HIPÓTESIS

Si existe una asociación directa entre los niveles de mercurio, cadmio, plomo y arsénico en la leche y la metilación del ADN en células presentes en leche materna, entonces, se espera a nivel global que las muestras con las concentraciones más elevadas en dichos elementos tóxicos para el humano presenten niveles bajos de metilación (hipometilación). Por otro lado, a nivel del gen *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) se espera encontrar metilada la región promotora del gen, en muestras con un nivel de concentración elevado en alguno de estos elementos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la presencia de mercurio, cadmio, plomo y arsénico en leche materna de madres sudcalifornianas sobre la metilación del ADN global y en el promotor del gen *BRCA1* (*Breast Cancer 1*).

5.2 Objetivos particulares

1. Establecer una base de datos con la información de los niveles de Hg, Cd, Pb y As de apoptosis celular y variables de importancia clínica en leche materna.
2. Cuantificar metilación global del ADN en leche de madres sudcalifornianas y analizar su relación con la concentración de Hg, Cd, Pb y As, y apoptosis celular.
3. Evaluar el patrón de metilación en la región promotora del gen *BRCA1* y analizar su relación con la concentración de Hg, Cd, Pb y As, y apoptosis celular.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Recolección de muestras

Se realizó un estudio en mujeres lactantes en periodo de puerperio, que consistió en la toma de 113 muestras de leche materna del B. Hospital General con Especialidades “Juan María de Salvatierra” en la Ciudad de La Paz, Baja California Sur, México; durante el periodo de septiembre 2012 – febrero 2013. Las mujeres que aceptaron donar leche tuvieron que leer, llenar y firmar previamente un consentimiento (Anexo A) y cuestionario informativo (Anexo B). Del total de muestras tomadas, 79 correspondieron a un estadio “calostro” en promedio 5 días posparto, cuando las madres acudían al tamiz neonatal y la recolección fue de manera manual y privada por las donadoras, solicitando un volumen mínimo de 30 mL. Las muestras se trasladaron en tubos de vidrio esterilizados al CIBNOR S.C. en frío, donde posteriormente se dividió el volumen total de la muestra en alícuotas para diferentes análisis posteriores. Las muestras para cuantificación de metales y metilación del ADN se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

6.2 Análisis de Hg, Cd, Pb y As

Se cuantificó la concentración de Hg, Cd, Pb y As, mediante espectrometría de absorción atómica (Figueiredo, 2010). Aproximadamente 10 gr (≈ 10 mL) de leche entera, fueron pesados y transferidos a vasos de teflón; donde fueron digeridos con 2 mL de H_2O_2 y 6 mL de HNO_3 (grado analítico; Mallinckrodt J.T. Baker, USA) en un horno de microondas (Mars 5X, CEM; Matthews, USA). El producto de la digestión fue aforado a 50 mL con agua desionizada y posteriormente filtrado. Las concentraciones de Cd y Pb fueron cuantificadas utilizando espectrofotometría de absorción atómica con aire gas/acetileno. Las concentraciones de Hg y As fueron cuantificadas utilizando un sistema de hidruros (HG 3000, GBC, Australia) acoplado a un espectrofotómetro de absorción atómica (XplorAA, GBC, Braeside Australia) utilizando gas argón. Se utilizó la técnica de vapor frío para la cuantificación de Hg, y la generación de hidruros para la

determinación de la concentración de As. Los análisis se realizaron por duplicado, utilizando los estándares SRM1954 para Hg, Cd y Pb (High Purity Standards ICP-SS; 1954 Contaminants in Human Milk Fortified NIST) y GBW10017 para As. Los límites de detección fueron $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ para As, $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ para Hg, $0.046 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd y $0.055 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb. Se obtuvo un porcentaje de recuperación $\geq 90\%$. Una vez realizado el análisis de Hg, Cd, Pb y As, se realizó una base de datos de las concentraciones de todas las pacientes. Se tomó en cuenta el valor permisible de la NOM-127-SSA1-1994 sobre límites permisibles en agua para consumo para la realización del filtro exploratorio.

6.3 Análisis de apoptosis

Se utilizó el kit de detección *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) para demostrar la cadena fragmentada de ADN en las células apoptóticas, mediante el etiquetado de las fracciones de ADN con marcador fluorescente de la terminal transferasa nucleótidos trifosfato desoxiuridina F-dUTP (TUNEL). Las muestras fueron descongeladas pasando de -80°C a -20°C durante por lo menos 48 hr, posteriormente se colocaron en hielo hasta obtener leche líquida para la determinación de apoptosis. Se utilizó el kit de detección *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) para marcar específicamente la cadena fragmentada de ADN generada durante la apoptosis. Posteriormente, se analizaron las muestras en microscopio de fluorescencia verde con filtro de rango de excitación entre 450-500 nm y detección a 515-565 nm (60X) y se visualizaron las células somáticas en microscopio de contraste de fases (60X).

6.4. Metilación de ADN

6.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se lleva a cabo bajo el protocolo Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico, con adaptaciones proporcionadas por la Dra. Kathleen F.

Arcaro y su equipo de trabajo de la Universidad de Massachusetts. Se partió de un volumen de 1mL de leche, la muestra se incubó con buffer de lisis (Tris 1M, EDTA 0.5M, SDS 10%, NaCl 5M) y Proteinasa K 20mg/mL. Las muestras se incubaron a 56°C toda una noche. Se añadió 6 µL de Proteinasa K y se incubaron a 56°C, 2 horas adicionales el día siguiente. Se dividió la muestra en dos alícuotas de 622 µL cada una. Se añadió 1 volumen de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamilico (25:24:1), se mezcló y centrifugó a 15,000 g por 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. Se añadió 1 volumen de Cloroformo: Alcohol Isoamilico (24:1) a cada tubo, se mezcló y centrifugó a 15,000 g por 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se añadió una décima parte del volumen recuperado de muestra, de NaAC 3M pH: 5.0 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló y precipitó a -30°C toda una noche. Se centrifugó a 15,000 x g por 10 minutos. Se lavaron los pellets con etanol al 70% y se centrifugaron a 15,000 x g por 10 minutos, se realizó el lavado dos veces. Se retiró el etanol y se dejaron secar los pellets. Se resuspendieron en 100 µL de H₂O MQ estéril. Al finalizar se obtuvo un volumen de 200 µL de ADN en solución por muestra. Posteriormente se realizó la cuantificación del ADN mediante absorbancia en Nanodrop 200 y Qubit dsDNA HS Assay kit DNA Quantification, según el protocolo del kit.

6.4.2 Digestión del ADN

Se llevó a cabo la desnaturalización del ADN mediante choque térmico, a continuación se agregó 5 µL de acetato de amonio 0.1 M pH 5.3 y se incubó con 1 U de nucleasa Pi a 45°C durante 1 hora. Posteriormente se adicionó 4 µL de Tris-HCl 1M pH 7.4 y 2 µL de fosfatasa alcalina y se incubó durante 1 hora a 37°C.

6.4.3 Cuantificación de la metilación global del ADN

Se llevó a cabo la cuantificación de la metilación global mediante el protocolo del kit “DNA Methylation EIA kit” el cual está basado en inmunoensayos

enzimáticos y cuantifica el nivel de 5-metil-2'-deoxycytidina. Este es un ensayo competitivo con anticuerpos monoclonales, que hace uso de la acetilcolinesterasa unida a 5-metil-2'-deoxycytidina como indicador y un anticuerpo específico para 5-metil-2'-deoxycytidina, y la intensidad de color del producto de la reacción enzimática entre el sustrato de la acetilcolinesterasa, es medido espectrofotométricamente, por lo tanto:

$$\text{Absorbancia} \propto [\text{indicador ligado al anticuerpo}] \propto 1/[\text{5-metil-2'-deoxycytidina}] \quad (1)$$

Se realizó una curva estándar, que consistió en diluciones seriadas de un estándar de concentración conocida [1.5µg/mL], para lo cual se tomó un volumen de 100 µL y se diluyó en 900 µL de H₂O ultra pura, partiendo de éste, se realizaron diluciones seriadas tomando 500 µL del estándar anterior diluyendo con 500 µL de EIA Buffer, teniendo un total de 8 estándares de concentración conocida. En la microplaca de 96 pozos, se realizó el diseño del ensayo, posteriormente se realizó la adición de los reactivos (EIA Buffer, 5-metil-2'-deoxycytidina EIA estándar, 5-metil-2'-deoxycytidina indicador y 5-metil-2'-deoxycytidina anticuerpo monoclonal y las muestras) de acuerdo al protocolo establecido del kit. Se incubó la placa a 4°C durante 18 horas. Después de la incubación, se vaciaron los pozos y se realizó el lavado con Wash Buffer 5 veces. Se agregaron 200 µL del reactivo de Ellman's (sustrato) y 5 µL de indicador al pozo de actividad total. Se incubó la placa durante 2 horas en agitación constante. Se llevó a cabo la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 412 nm en Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron los cálculos correspondientes a la preparación de datos, graficar curva estándar y determinar la concentración de la muestra.

El análisis de metilación global se realizó mediante un kit basado en un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) directo, que permite la detección de reacciones antígeno-anticuerpo gracias a la reacción con productos de color. Es un ensayo competitivo cuantificando 5meC mediante el ADN total

aislado del pellet celular de la leche materna. La intensidad de color, determinada espectrofotométricamente es proporcional a la cantidad de enzima ligada a 5meC trazador unido a la placa, que es inversamente proporcional a la cantidad libre de 5meC presente en la placa durante la incubación. Los cálculos se realizaron en un programa de hoja de cálculo (Cayman Chemical Excel Workbook Eia Triple). Se realizó una curva de calibración con la concentración de los estándares. Los datos se ajustaron a una regresión logarítmica con la ecuación general

$$y = m \ln x + b \quad (2)$$

Las concentraciones arrojadas por la hoja de cálculo (ng mL^{-1}) de ADN metilado en cada muestra, se calcularon con base en % del ADN total ingresado en el kit, correspondiente a 2000 ng mL^{-1}

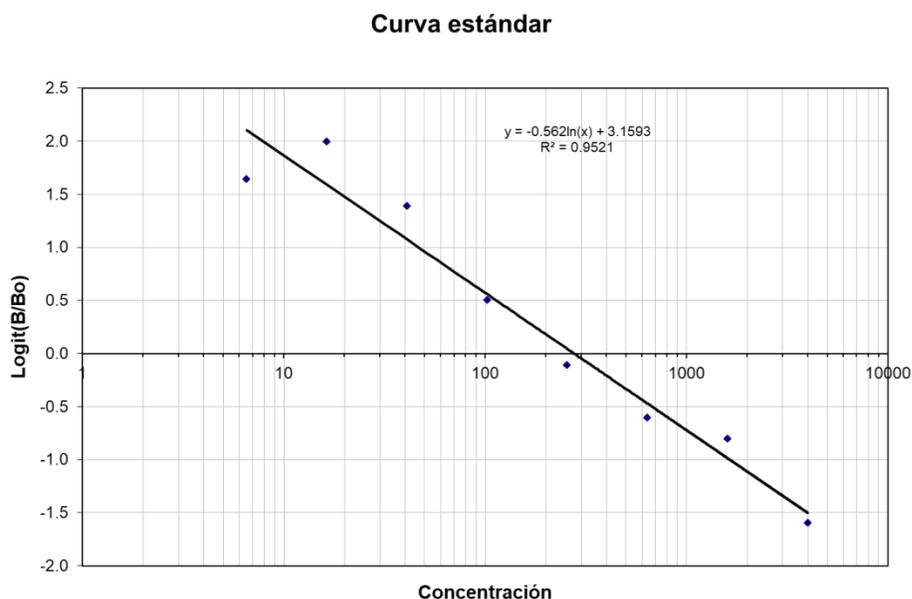


Figura 5. Curva estándar del análisis. Gráfica para la determinación de la concentración de las muestras.

6.4.4 Modificación con bisulfito

Se llevó a cabo la modificación con bisulfito de las muestras de ADN extraído mediante el protocolo del EZ-DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research,

Orange, CA). Partiendo de 20 μ L de ADN se añadieron 130 μ L de reactivo de conversión CT; se llevó a cabo la desnaturalización mediante temperatura en termociclador (98°C 10 minutos, 64°C 2.5 horas). Posteriormente se añadieron 600 μ L de M-Binding Buffer y se cargó la muestra en la columna (Zymo-Spin™ IC Column). Se centrifugó a 10, 000 x *g*, 1 minuto. Se llevó a cabo la desulfonación, añadiendo 200 μ l de M-Desulphonation Buffer a la columna e incubando 20 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se centrifugó 1 minuto a 10, 000 x *g*. Se realizaron dos lavados a la columna añadiendo 200 μ L de M-Wash Buffer y se centrifugó 1 minuto a 10, 000 x *g*. Se realizó la elución de la columna añadiendo 10 μ L de M-Elution Buffer y centrifugando 30 segundos a máxima velocidad.

6.4.5 MSP (Methyl Specific PCR)

Se determinó el estado de metilación de la región promotora del gen *BRCA1* (*Breast Cancer 1*), por el método de PCR metil específica según el método descrito por House *et al.* (2003) como una PCR anidada para incrementar la sensibilidad de la reacción. Oligonucleótidos seleccionados para examinar el nivel de metilación en el gen se enlistan en la Tabla V.

Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para análisis del gen *BRCA1* mediante MSP. House *et al.* (2003).

Región externa Forward 5'-3'	GAG AGG TTG TTG TTT AGY GGT AGT TTT	143 pb
Región externa Reverse 5'-3'	TCT AAA AAA CCC CAC AAC CTA TCC	
Región interna Metilada Forward 5'-3'	TCG TGG TAA CGG AAA AGC GC	75 pb
Región interna Metilada Reverse 5'-3'	AAATCTCAACGAACTCACGCCG	
Región interna No metilada Forward 5'-3'	TTG GTT TTT GTG GTA ATG GAA AAG TGT	86 pb
Región interna No metilada Reverse 5'-3'	CAA AAA ATC TCA ACA AAC TCA CAC CA	

La primera reacción en cadena de la polimerasa flanquea la región promotora del gen rica en CpG, sin discriminar entre nucleótidos metilados o no después de la modificación con bisulfito. El producto de la primer PCR se diluyó 1:1000 y fue templado para la segunda reacción de MSP esta vez usando oligonucleótidos específicos para nucleótidos metilados y no metilados. La reacción de la primer PCR fue bajo las siguientes condiciones: 25 µL de volumen final, utilizando 1 µL del ADN modificado con bisulfito como templado, un mix de reacción con PCR buffer 1X, primers 200 nM y 0.2 unidades de HotStar Taq Polymerase (Qiagen, Valencia CA) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C durante 15 min, 40 ciclos (95°C x 30 s, 56°C x 30s, 72°C 30 seg) y una elongación a 72°C durante 5 minutos. La segunda reacción de PCR se realizó bajo las mismas condiciones de reacción, solo modificando la temperatura de alineación de los oligonucleotidos ahora usados y una reducción en el número de ciclos, ahora de 25. Posteriormente el amplicon se visualizó en geles de poliacrilamida al 6% y se mandaron secuenciar los productos de PCR para realizar un análisis cuantitativo de la metilación en la región promotora.

6.4.6 Análisis de secuencias

Los resultados de la secuenciación se analizaron en el software Chromas (v 2.6.4) para la limpieza y posterior análisis de las mismas en el software MEGA (v. 6.0.6).

6.5 Análisis estadísticos

Se usó del software Statística 8.0 para evaluar las concentraciones de Hg, Cd, Pb, As en leche, el porcentaje de metilación global del ADN, la apoptosis, edad y número de embarazos con respecto a categorías establecidas, como “número de embarazos”, “número de abortos”, “hábito tabáquico” y “metilación en el promotor del gen *BRCA1*” y establecer la existencia de diferencias

estadísticamente significativas entre los grupos, para lo cual se realizó un análisis de modelo lineal generalizado (GLM). Todos los análisis estadísticos se realizaron a un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Los análisis de correlaciones fueron llevados a cabo en el software R y el paquete R studio (versión 1.0.136 – © 2009-2016 RStudio, Inc.), comparando la concentración de Hg, Cd, Pb, As en leche y el porcentaje de metilación global del ADN y la apoptosis.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) usando el software Statistica 8.0 para establecer posibles asociaciones entre la concentración de Hg, Cd, Pb, As en leche y el porcentaje de metilación global del ADN y la apoptosis.

7. RESULTADOS

7.1. Base de datos de donantes

Se realizó una base de datos con base al cuestionario aplicado a las participantes (Anexo B), a partir del cual se extrajeron variables clínicas de interés para buscar posteriormente asociaciones usando análisis estadísticos. Los factores clínicos de las mujeres donantes que se tomaron en cuenta para esta investigación fueron los siguientes: número de embarazos, edad, número de abortos y el hábito tabáquico (incluyendo fumadoras activas y pasivas). La tabla VI proporciona datos estadísticos que describen la población de mujeres donantes.

Tabla VI. Estadística descriptiva de la población de estudio. n = 79 mujeres sudcalifornianas.

Embarazos (1 – 7)	Edad (16 – 39)	Abortos (0 – 2)	Fumador (Si/No)
33% Primigesta	45.5% 16 - 21 años	90.0% 0	67% No
30% Bigesta=2	29.2% 22 - 27 años	8.8% 1	33% Si
19% Trigesta=3	16.5% 28 - 33 años	1.2% 2	
18% Multigesta ≥4	8.8% 34 - 39 años		

La mayor parte de las donadoras eran primigestas (33%) o bigestas (30%). Respecto a la edad, el 74.7% estaban entre 16 a 27 años. Por otro lado, el 90% no había sufrido ningún aborto y en cuanto al hábito de fumar, el 67% respondió no ser fumadora.

7.2 Concentración de metales traza en leche materna

En la tabla VII se observan los valores de concentración de Hg, Cd, Pb y As en las leches de las donantes (Figs. 6 – 9).

Tabla VII. Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) de elementos traza seleccionados en leche materna de mujeres sudcalifornianas ($n = 79$).

	Promedio + Error estándar	Intervalo Min – Max	Mediana	Límite de detección (LOD)*	% Muestras con Niveles no detectables
Hg	3.29 ± 0.794	0.005 – 57.04	1.024	0.005	40.5
Cd	0.046 ± 0.005	0.003 – 0.228	0.043	0.003	25.3
Pb	0.528 ± 0.122	0.055 – 7.923	0.243	0.055	6.32
As	1.35 ± 0.394	0.005 – 23.81	0.276	0.005	40.5

LOD: Limite de detección (*Limit of detection, por sus siglas en ingles*)

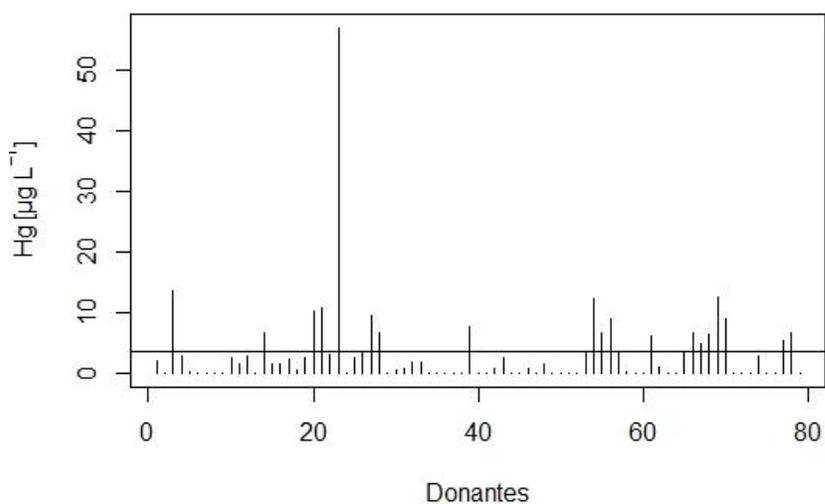


Figura 6. Distribución de la concentración de mercurio (Hg) en leche materna de madres sudcalifornianas ($n = 79$). Línea de tendencia marca el valor de referencia para el tamiz.

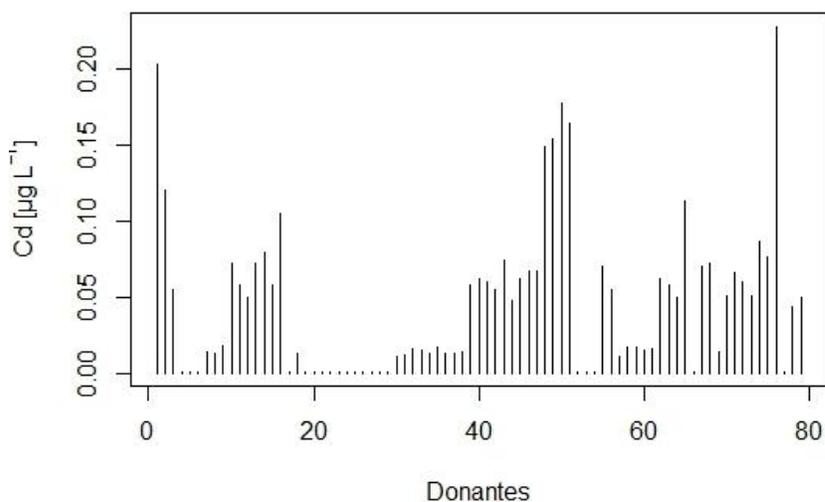


Figura 7. Distribución de la concentración de cadmio (Cd) en leche materna de madres sudcalifornianas (n = 79). Ninguna muestra sobrepaso los valores de referencia.

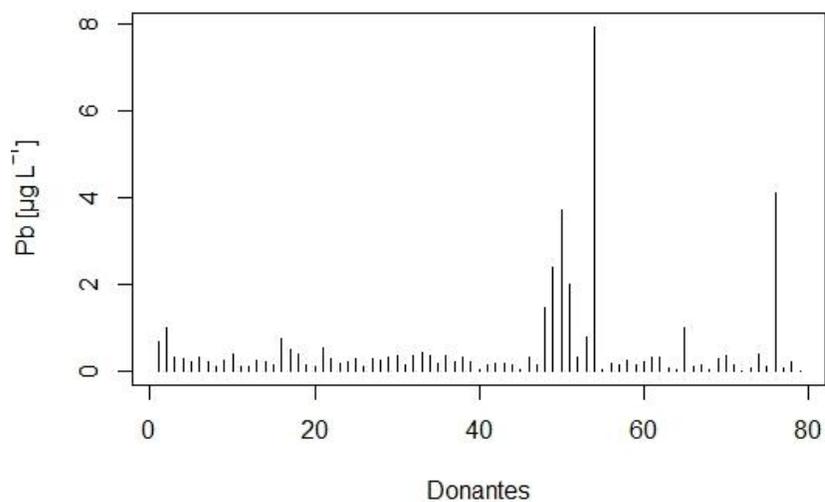


Figura 8. Distribución de la concentración de plomo (Pb) en leche materna de madres sudcalifornianas (n = 79). Ninguna muestra sobrepaso los valores de referencia.

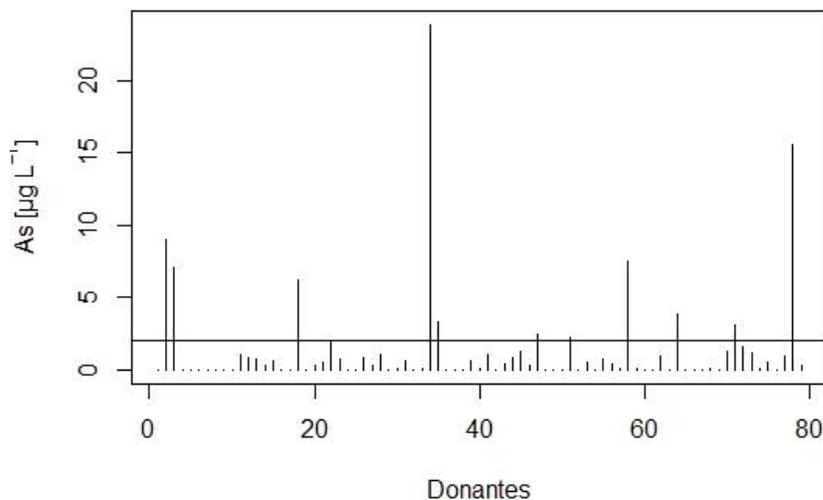


Figura 9. Distribución de la concentración de arsénico (As) en leche materna de madres sudcalifornianas ($n = 79$). Línea de tendencia marca el valor de referencia para el tamiz.

7.3 Cuantificación de células apoptóticas

La cuantificación de células apoptóticas usando la técnica de TUNEL se muestra en la figura 10, mientras que el conteo de células somáticas en contraste de fases se muestra en la figura 11. El promedio de células epiteliales fue de $29,125 \text{ células mL}^{-1}$ de leche, mientras que el promedio de células apoptóticas fue de $468.4 \text{ células mL}^{-1}$ de leche. Se muestra la distribución de frecuencias del conteo de número de células epiteliales y apoptóticas en cada donante en las figuras 12 y 13. El porcentaje de apoptosis se llevó a cabo el cálculo con base en el número total de células y la relación con células apoptóticas, obteniéndose un valor promedio de apoptosis de 0.0056%.

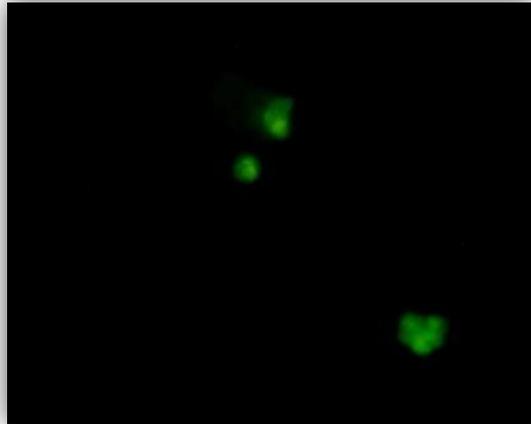


Figura 10. Células de leche en apoptosis positivas a la técnica TUNEL. Microscopio de fluorescencia (60X).

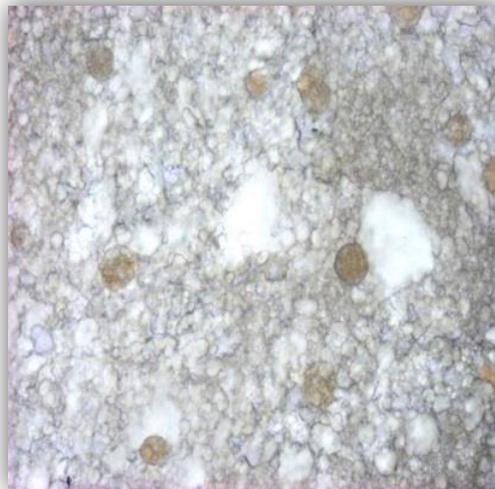


Figura 11. Células epiteliales de leche. Microscopio de contraste de fases (60X).

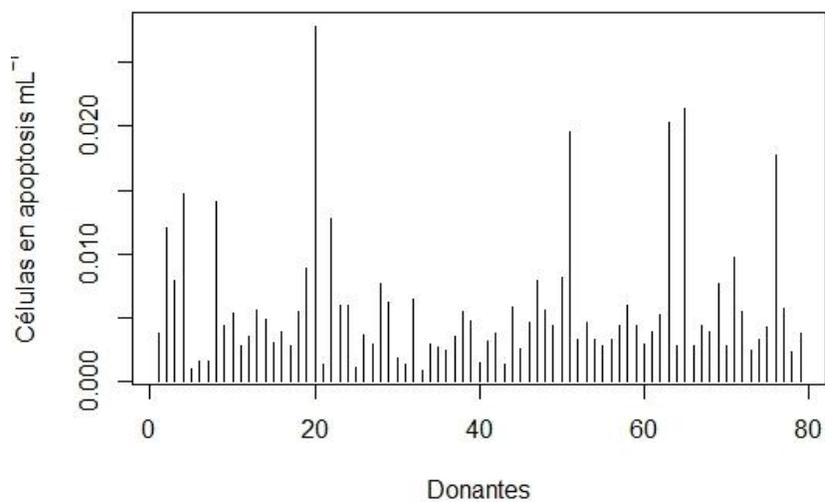


Figura 12. Distribución de frecuencias del número de células apoptóticas en leche de madres sudcalifornianas. n = 79.

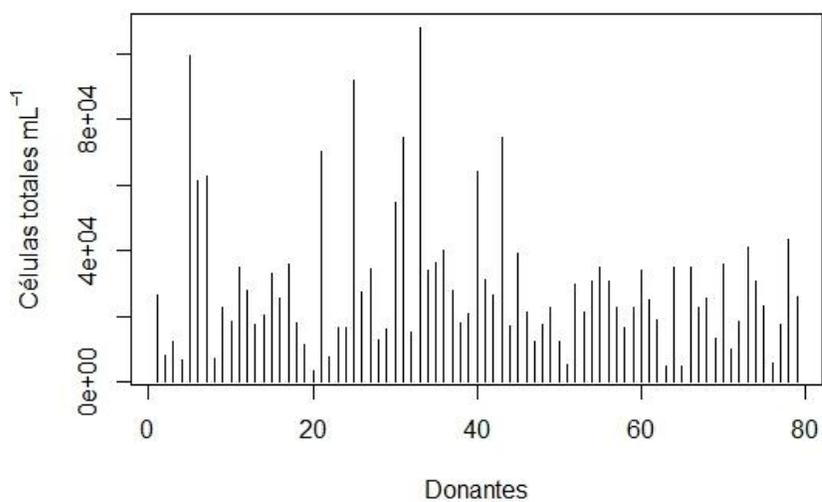


Figura 13. Distribución de frecuencias del número de células totales en leche de madres sudcalifornianas. n = 79.

7.4 Metilación global del ADN

En la figura 14 se observa el porcentaje de metilación global calculado con base en los resultados arrojados del ensayo, respecto a las 79 mujeres sudcalifornianas. El valor promedio de porcentaje metilación global fue de $2.67 \pm 0.76\%$.

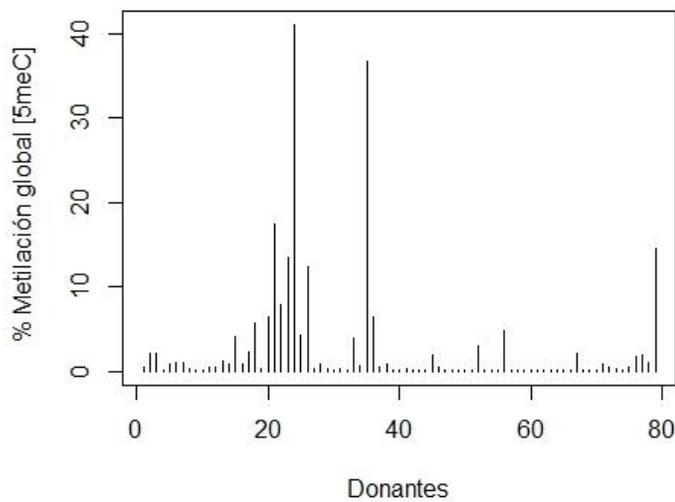


Figura 14. Distribución de frecuencias del porcentaje de metilación global en células de leche materna. $n = 79$.

7.5. Análisis de metilación en la región promotora del gen *BRCA1*.

Se evaluó el estado de metilación de la región promotora del gen *BRCA1* en ADN aislado de 90 muestras modificadas con bisulfito, sin embargo se trabajó con las 79 muestras correspondientes a calostro. El 46.8% de las muestras, amplificaron para la región no metilada ($n = 37$). Y por otro lado, 49.4% de las muestras no amplificaron ($n = 39$). En la figura 15 se observan las muestras que amplificaron para la región promotora metilada ($n = 3$). Y en la figura 16 se observa el alineamiento de las secuencias positivas para la región metilada con su correspondiente alienamiento respecto a la secuencia de referencia.

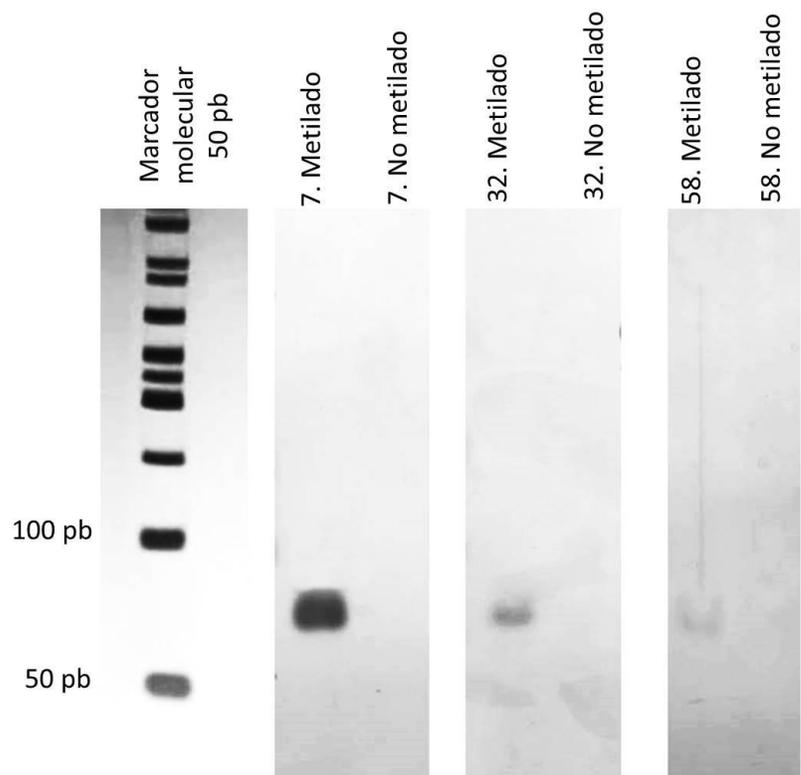


Figura 15. Gel de electroforésis de MSP. Muestras positivas para la metilación en la región promotora del gen *BRCA1* Tamaño del producto de PCR 75 pb.

Species/Abbrv	Δ	Gr	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*																					
1. Ref BRCA1			T	T	C	C	G	T	G	G	C	A	A	C	G	G	A	A	A	A	G	C	G	C	G	G	G	A	A	T	T	A	C	A	G	A	T	A	A	A	T	T	A	A	A	A	C	T	G	C	G	A	C	T	G	C	G	C	G	G	C
2. Sec 32 Met			T	T	C	C	G	T	G	G	T	A	A	C	G	G	A	A	A	A	G	C	G	T	G	G	G	A	A	T	T	A	C	A	G	A	T	A	A	A	T	T	A	A	A	A	T	T	G	C	G	A	T	T	G	C	G	T	G	G	T
3. Sec 7 Met			T	T	C	C	G	T	G	G	T	A	A	C	G	G	A	A	A	A	G	T	G	T	G	G	G	A	A	T	T	A	C	A	G	A	T	A	A	A	T	T	A	A	A	A	T	T	G	C	G	A	T	T	G	C	G	T	G	G	-
4. Sec control negativo			T	T	T	T	G	T	G	G	T	A	A	T	G	G	A	A	A	A	G	T	G	T	G	G	G	A	A	T	T	A	T	A	G	A	T	A	A	A	T	T	A	A	A	A	T	T	G	T	G	A	T	T	G	T	G	G	-		

Figura 16. Alineamiento de las secuencias obtenidas mediante MSP.

7.6 Comportamiento de variables analizadas respecto al número de embarazos.

Se realizó un análisis de GLM para evaluar el efecto de la variable independiente “número de embarazos” sobre las variables dependientes como concentración de los elementos traza (Hg, Cd, Pb y As), porcentaje de metilación global, apoptosis y edad. No se observaron diferencias estadísticamente

significativas respecto a alguna otra variable analizada y el número de embarazos (Figs. 17 y 18). Se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la edad (años) de las donantes y el tercer y cuarto (o más) embarazos (Fig. 18b).

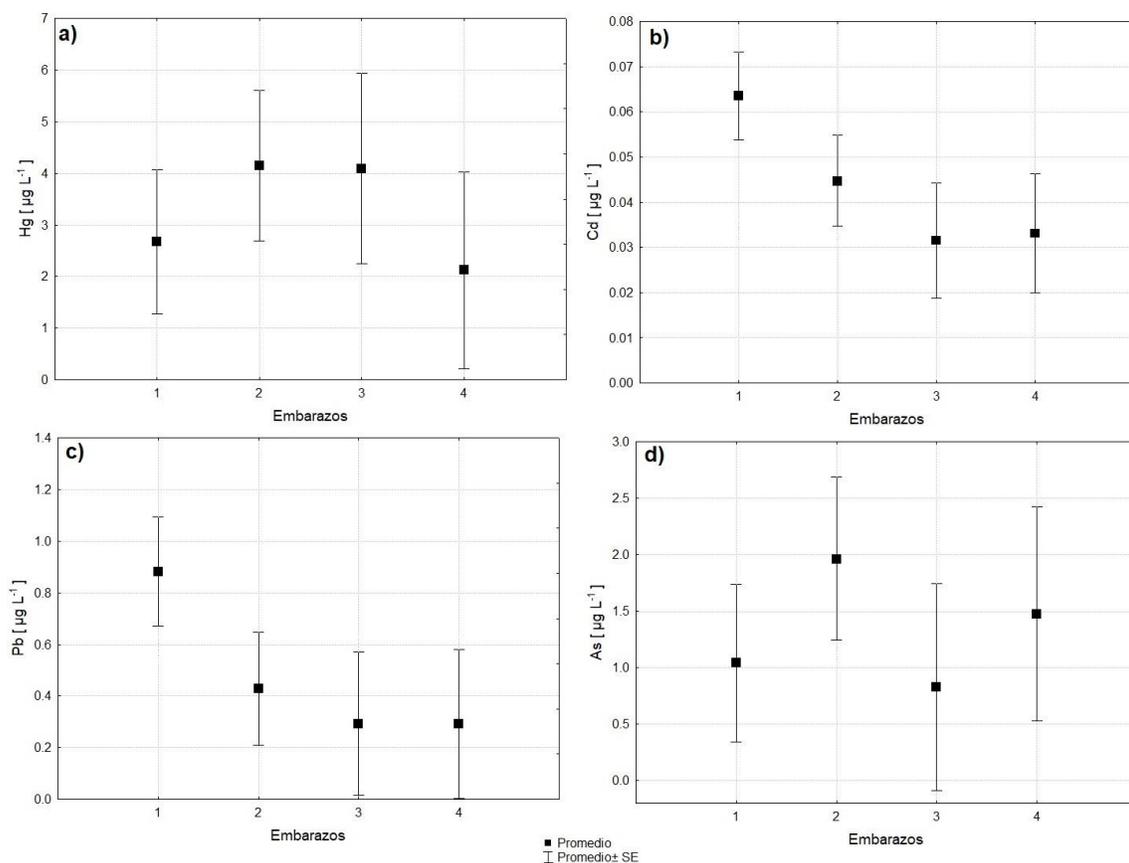


Figura 17. Comportamiento de la concentración de metales: a) mercurio, b) cadmio, c) plomo y d) arsénico respecto al número de embarazos (1, 2, 3, o más de 4) en las mujeres donantes. No se observaron diferencias significativas.

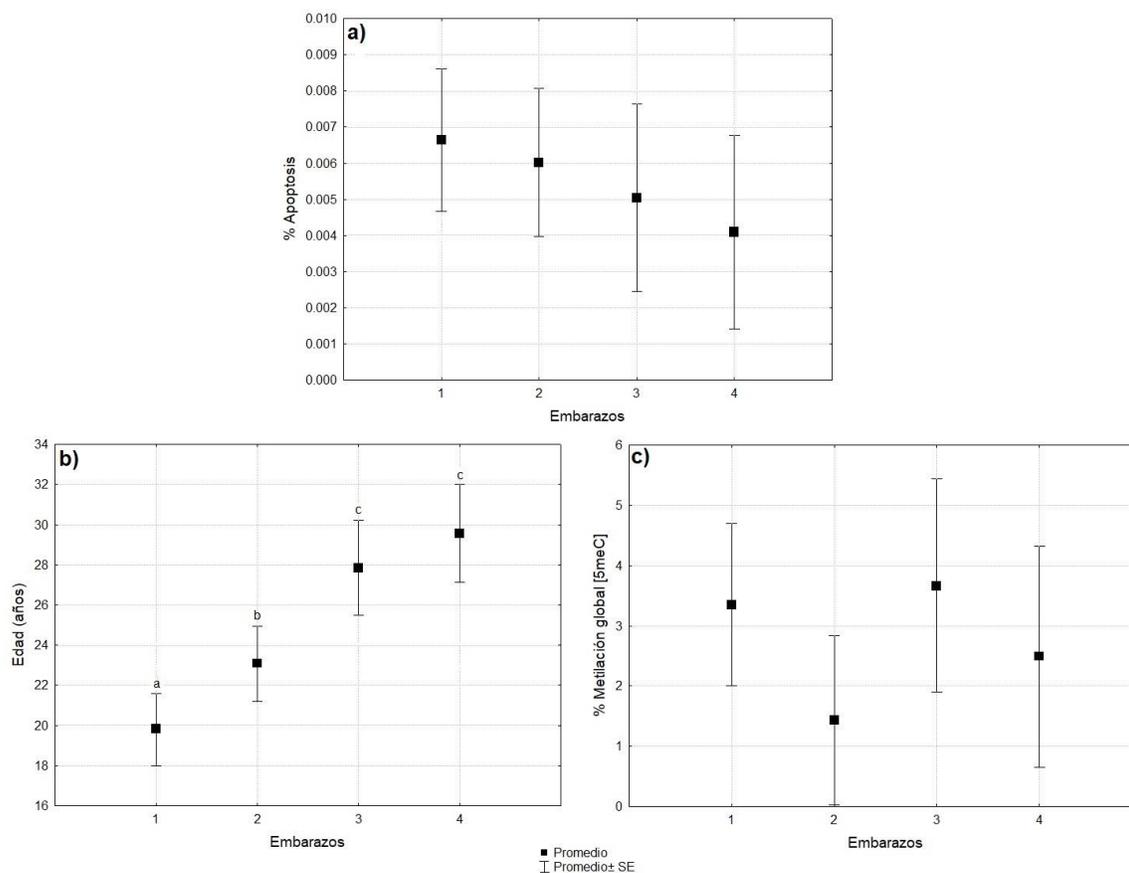


Figura 18. Comportamiento de: a) porcentaje de apoptosis b) edad de las donantes (años), c) porcentaje de metilación global respecto al número de embarazos (1, 2, 3, o más de 4) en las mujeres donantes.

7.7 Comportamiento de variables analizadas respecto al número de abortos.

En cuanto al efecto de la variable independiente “número de abortos” sobre el comportamiento de las variables dependientes como concentración de los elementos traza (Hg, Cd, Pb y As), porcentaje de metilación global, apoptosis y edad, no hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguna variable analizada (Figs. 19 y 20).

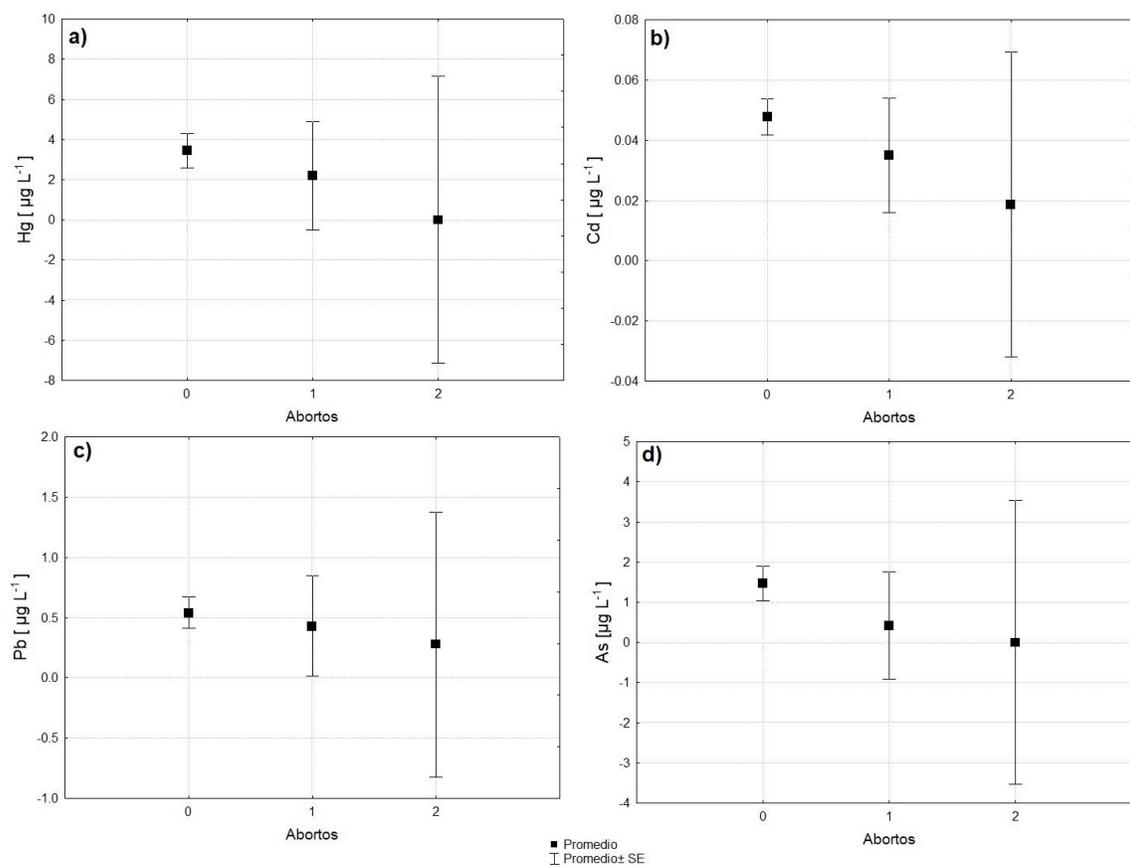


Figura 19. Comportamiento de la concentración de: metales a) mercurio, b) cadmio, c) plomo y d) arsénico respecto al número de abortos en las mujeres donantes. No se observaron diferencias significativas.

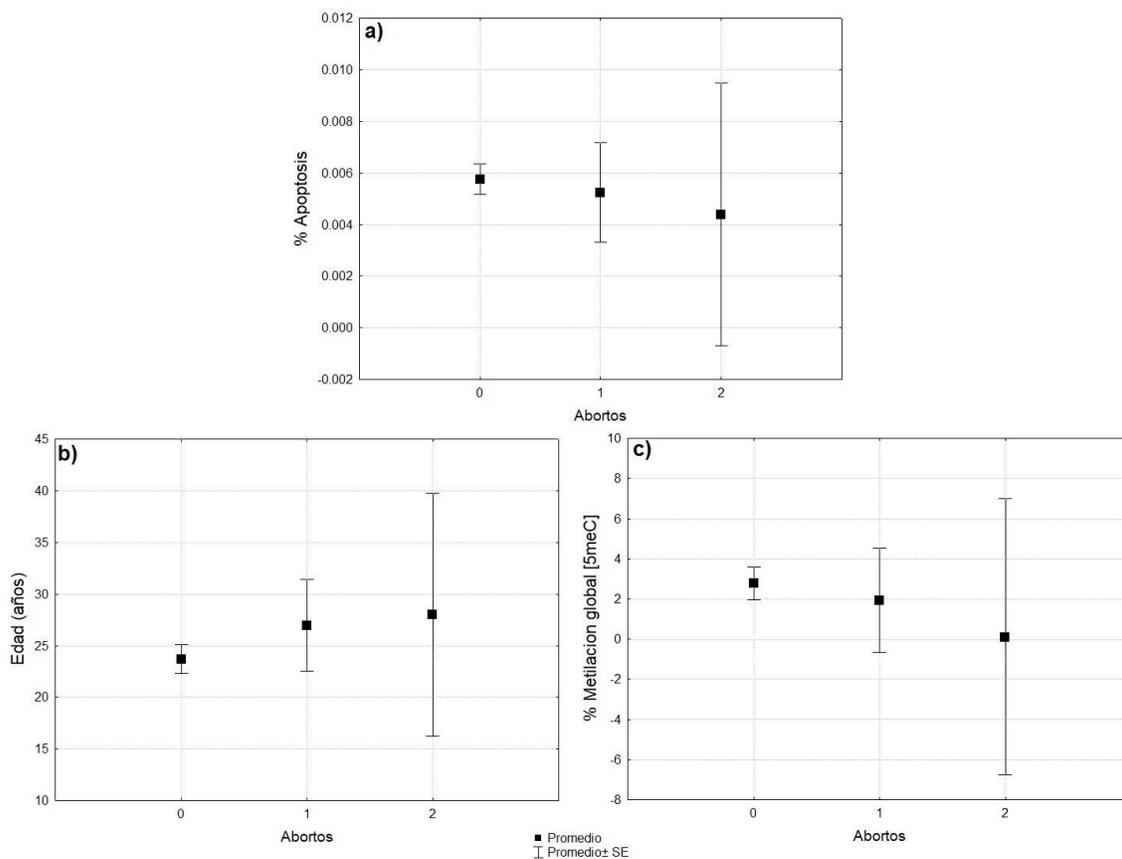


Figura 20. Comportamiento de: a) porcentaje de apoptosis, b) edad de las donantes, c) porcentaje de metilación global respecto al número de abortos en las mujeres donantes. No se observaron diferencias significativas.

7.8 Efecto de hábito tabáquico sobre variables analizadas.

Se llevó a cabo un análisis GLM para evaluar el efecto de la variable independiente “Hábito tabáquico” sobre la concentración de los elementos traza (Hg, Cd, Pb y As), el porcentaje de metilación global, abortos, apoptosis, edad y embarazos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las variables analizadas y el hábito tabáquico (Figs. 21 y. 22). Sin embargo, el hábito tabáquico mostró respecto al porcentaje de metilación global, un valor cercano al límite de ($p = 0.057$), mostrando que las madres lactantes fumadoras

presentan un porcentaje de metilación menor a las madres que no presentan el hábito fumador.

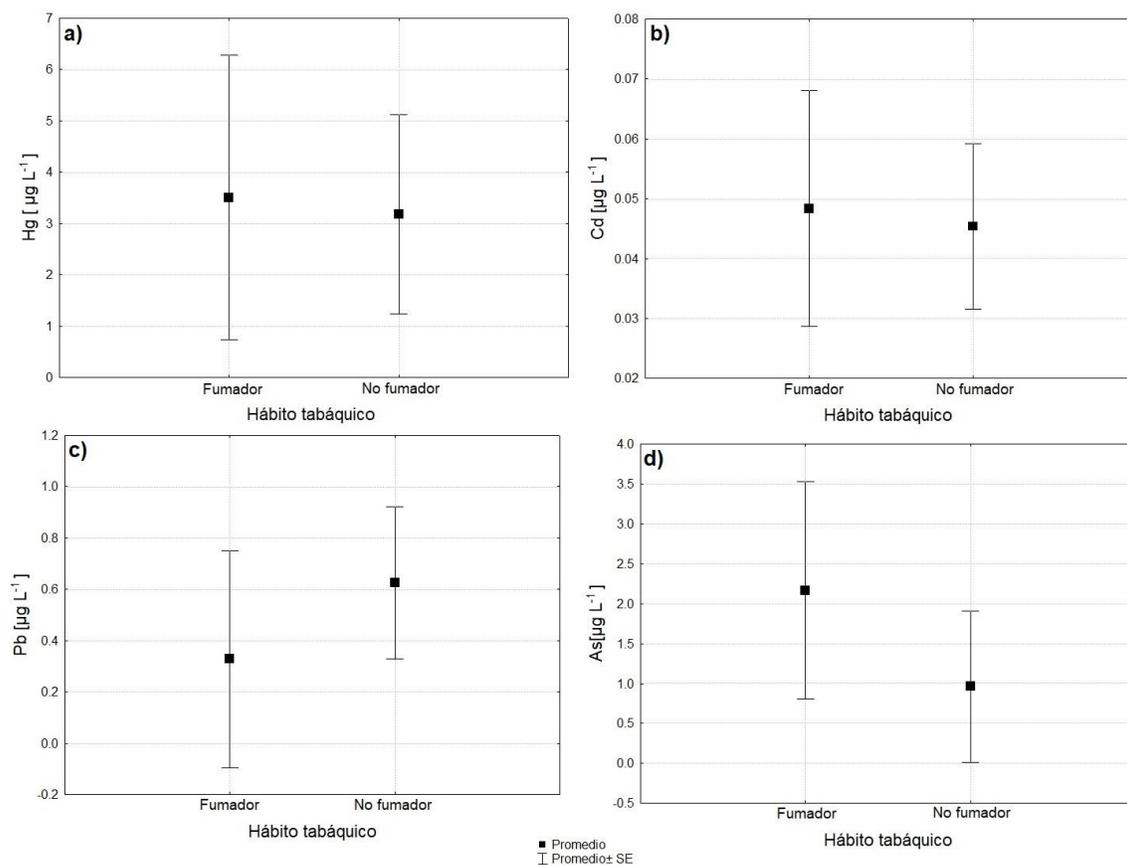


Figura 21. Efecto del hábito tabáquico sobre concentración de: metales a) mercurio, b) cadmio, c) plomo d) arsénico. No se observaron diferencias significativas.

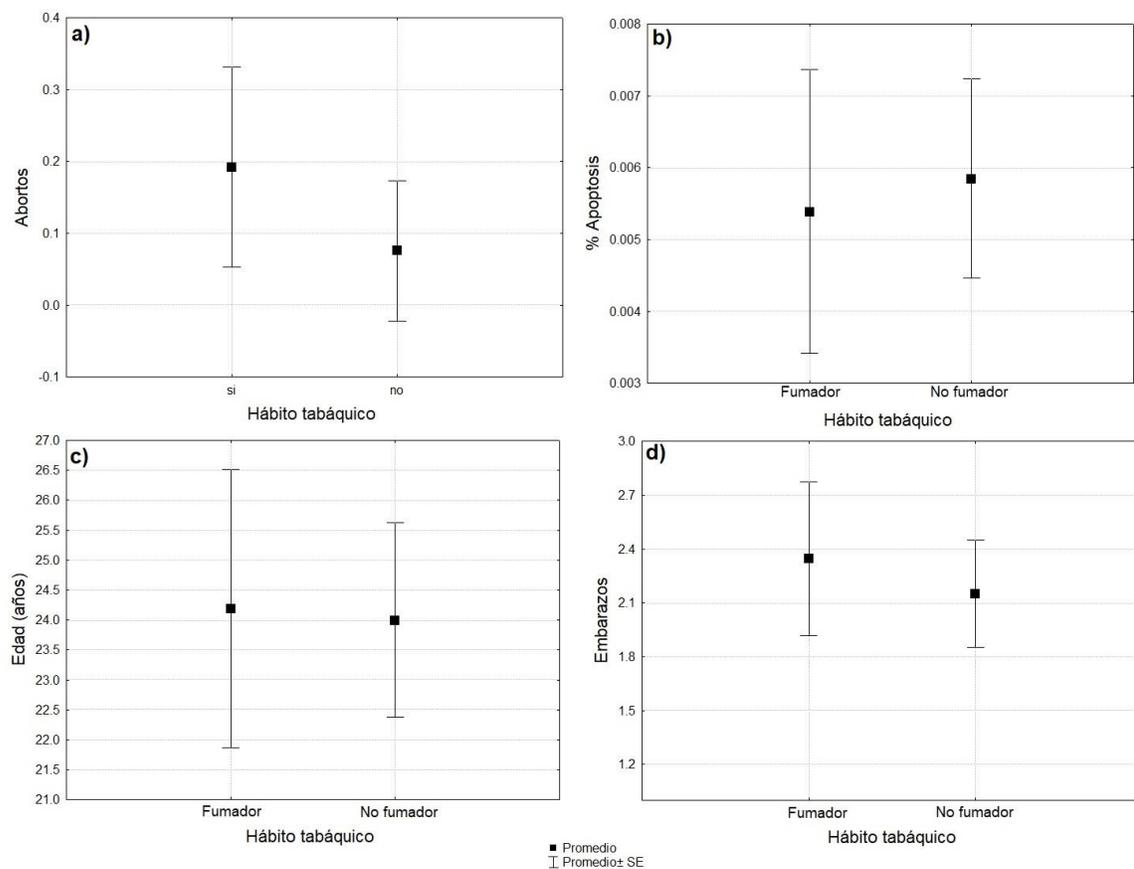


Figura 22. Efecto del hábito tabáquico sobre: a) aborto, b) porcentaje de apoptosis, c) edad de las donantes (años), d) embarazos. No se observaron diferencias significativas.

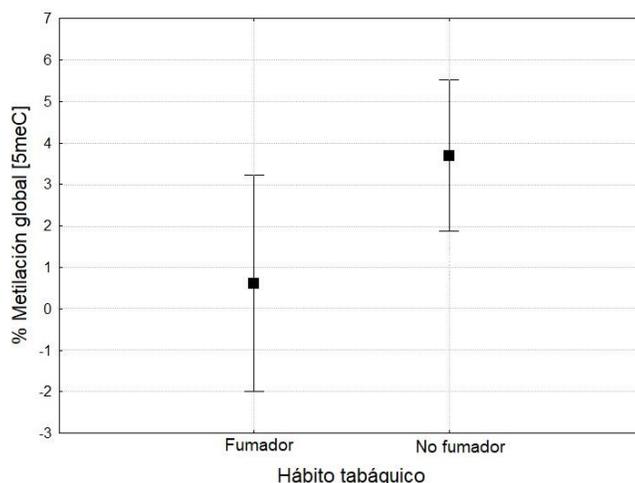


Figura 23. Efecto del hábito tabáquico sobre porcentaje de metilación global ($p = 0.057$).

7.9. Efecto de metilación del gen *BRCA1* sobre variables analizadas.

Posteriormente se llevó a cabo un análisis GLM para observar el efecto entre la “metilación del gen *BRCA1*”, versus la concentración de los elementos traza (Hg, Cd, Pb y As), el porcentaje de metilación global, abortos, apoptosis, edad y embarazos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para la concentración de Pb (Fig. 24c), porcentaje de apoptosis (Fig. 25b) y la edad de las donantes (Fig. 25c) ($p < 0.05$). Respecto a las otras variables analizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas con la metilación del gen *BRCA1* (Figs. 24 – 26).

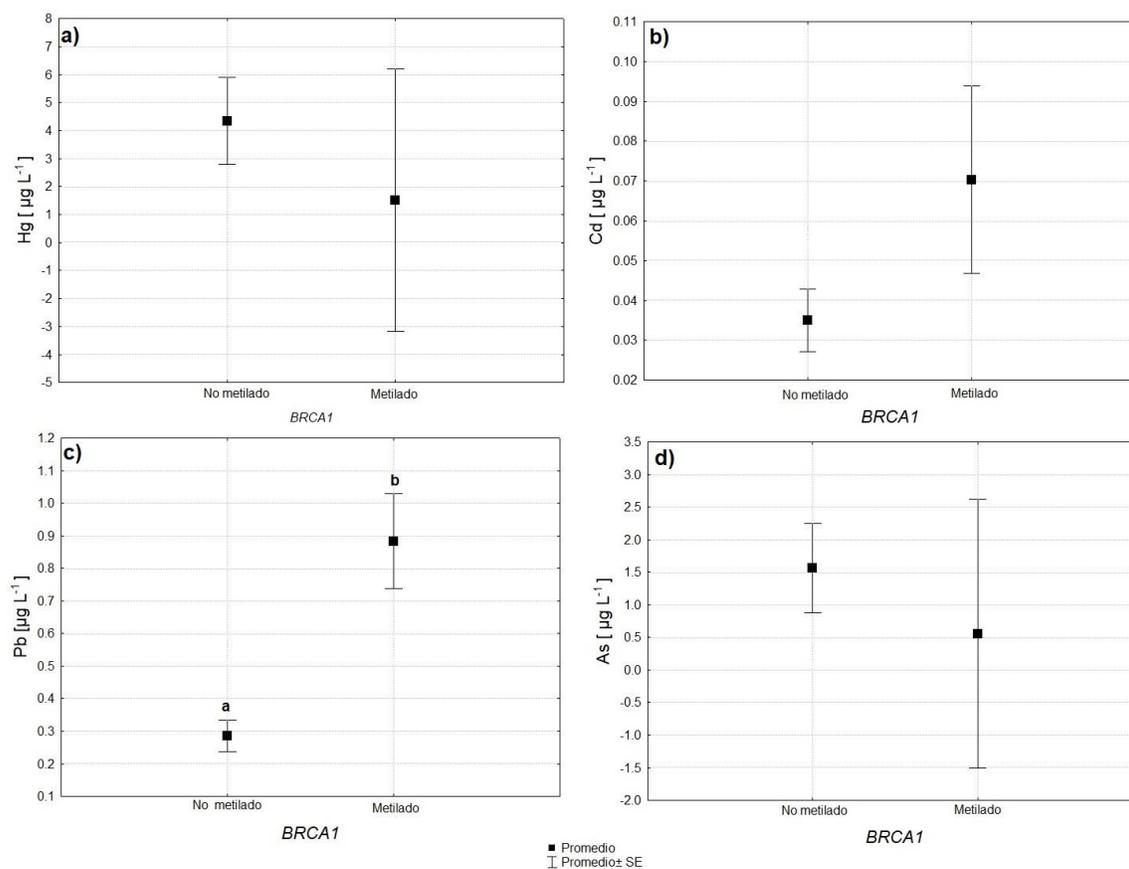


Figura 24. Efecto de la metilación del gen *BRCA1* sobre concentración de metales. a) mercurio, b) cadmio, c) plomo d) arsénico.

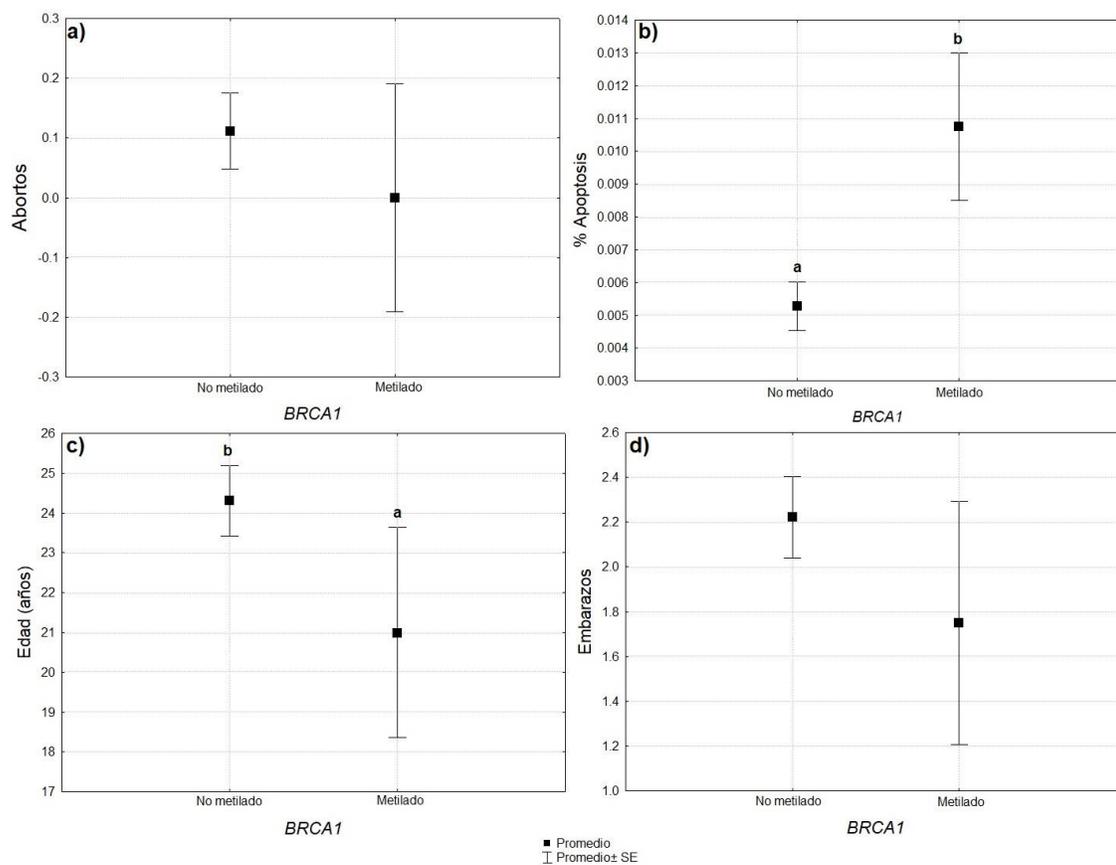


Figura 25. Efecto de la metilación del gen *BRCA1* sobre: a) abortos, b) porcentaje de apoptosis, c) edad de las donantes (años) d) embarazos.

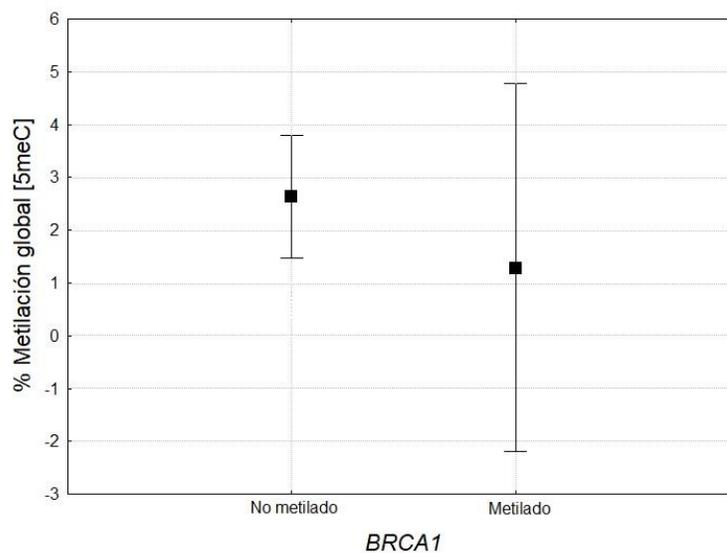


Figura 26. Efecto de la metilación del gen *BRCA1* respecto al porcentaje de metilación global.

7.10 Análisis de correlación entre variables analizadas

En la tabla VIII (Figs. 27 – 29) se observa el índice de correlación y los valores significativos a un nivel de $p < 0.05$. En cuanto a los metales, el Hg mostró correlación negativa significativa pero muy baja con Cd ($r = -0.218$), el As una correlación negativa con el Pb ($r = -0.300$) y Cd presentó una correlación positiva pero baja con el Pb ($r = 0.234$). No se obtuvieron correlaciones con el porcentaje de metilación, número de células somáticas, porcentaje de apoptosis y edad con metales traza o entre las otras variables. Dado que no se presentaron correlaciones mayores a $r = 0.7$, todas las variables se usaron para el análisis de componentes principales (ver más adelante).

Tabla VIII. Matriz de correlación (Spearman).

	Hg	As	Cd	Pb	Apoptosis	Células somáticas	Edad	Metilación global
Hg	1.00	-0.051	-0.218*	-0.003	-0.016	0.016	-0.055	0.027
As		1.000	0.079	-0.300*	-0.057	0.057	-0.094	0.074
Cd			1.000	0.234*	-0.181	-0.131	0.131	-0.048
Pb				1.000	0.139	-0.139	-0.012	0.019
Apoptosis					1.000	-1.000	-0.010	-0.078
Cel. somáticas						1.000	0.010	0.078
Edad							1.000	0.079
Metilación global								1.000

*Coeficientes de correlación significativos a $p < 0.05$

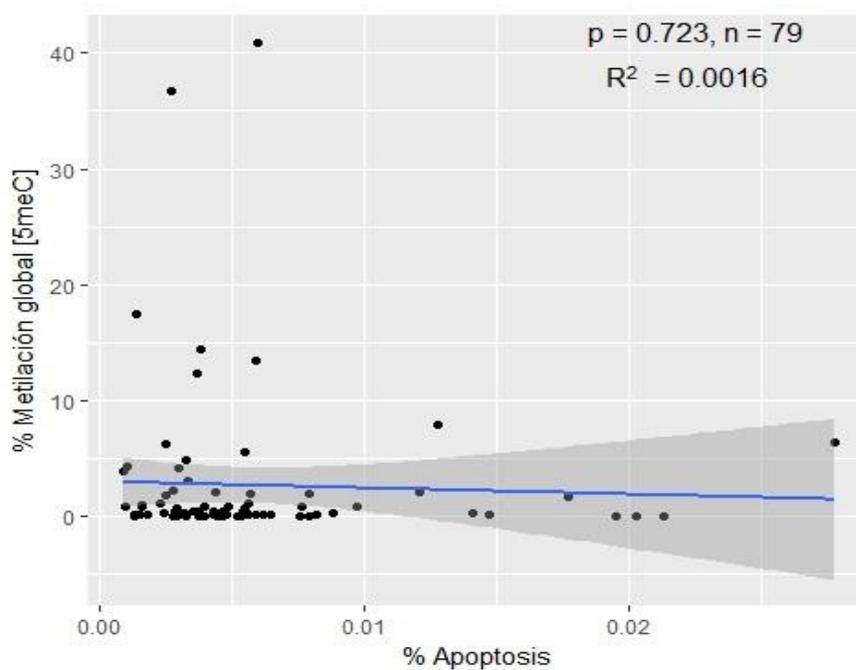


Figura 27. Relación entre el porcentaje de metilación global y el porcentaje de apoptosis. Área sombreada representa el 95% de intervalo de confianza.

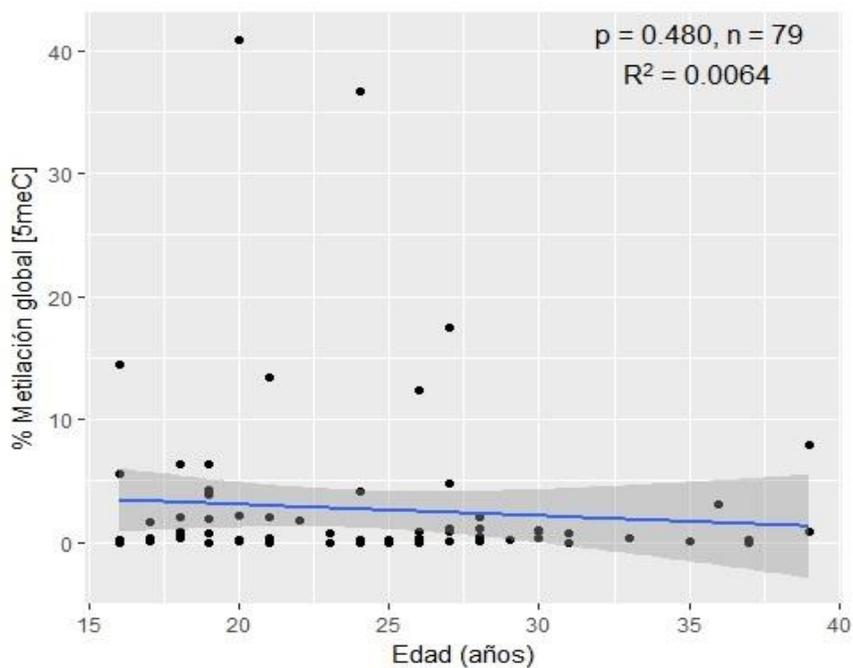


Figura 28. Relación entre el porcentaje de metilación global y la edad de las donantes. Área sombreada representa el 95% de intervalo de confianza.

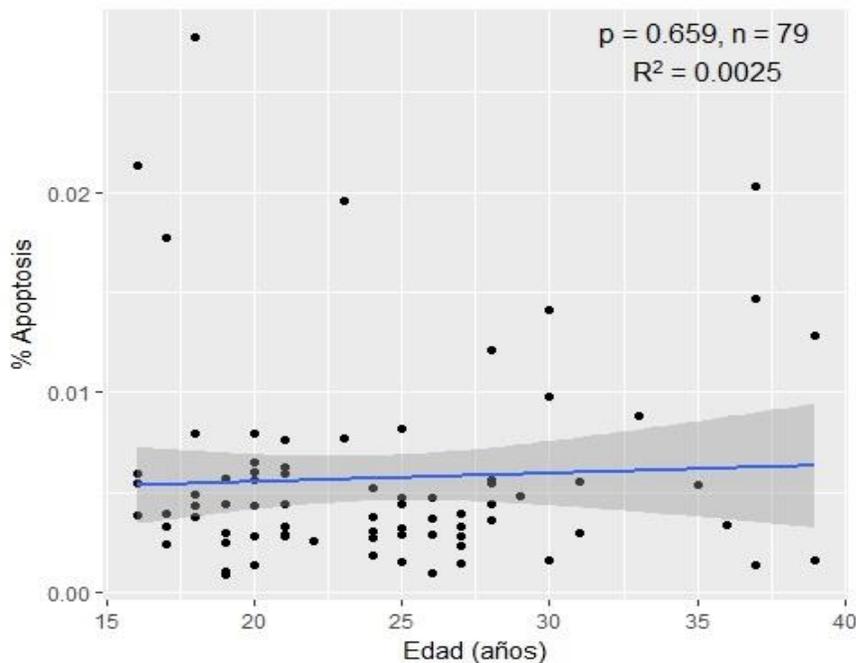


Figura 29. Relación entre el porcentaje de apoptosis y la edad de las donantes. Área sombreada representa el 95% de intervalo de confianza.

7.11 Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales (ACP) reveló diversos patrones de asociación entre las anteriores variables. En la Tabla IX podemos observar los componentes principales (CP) con su eigenvalor, así como el porcentaje de varianza que explica dicho componente y el porcentaje de la varianza acumulada. Solamente los cuatro primeros CP presentaron eigenvalor mayor a 1. Se requirió la varianza acumulada de 5 factores para explicar el 77% de la variación. Las variables que presentaron una asociación mayor de 0.6 se encuentra marcadas en negritas. En el CP1, el Cd es el único valor mayor de 0.6. En el CP2 el Hg y el aborto están asociados de forma positiva. En el CP3, solo la edad salió mayor a 0.6, con el As en el límite (0.57) asociado de forma negativa. En la CP4 el As salió negativamente asociado a la metilación global. En el CP5 quedó la apoptosis con un valor de -0.797.

Tabla IX. Componentes principales de las variables de los análisis en leche materna y variables clínicas de las mujeres sudcalifornianas

	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8
Eigenvalor	1.653	1.475	1.100	1.023	0.935	0.781	0.587	0.443
% Varianza	20.667	18.441	13.755	12.789	11.695	9.764	7.342	5.543
%Var. Acumulada	20.67	39.11	52.87	65.65	77.35	87.11	94.46	100.00
Hg	0.575	0.626	0.209	-0.119	0.066	-0.028	-0.114	-0.447
As	-0.050	-0.136	0.568	0.674	-0.285	0.324	-0.104	-0.056
Cd	-0.679	0.434	0.051	0.033	0.059	0.157	0.543	-0.151
Pb	-0.581	0.426	0.097	-0.298	0.174	0.379	-0.440	0.115
Metilación global	0.295	-0.313	0.261	-0.623	-0.397	0.406	0.183	0.013
Aborto	0.538	0.677	0.103	0.126	-0.006	0.062	0.163	0.440
Apoptosis	-0.304	0.364	-0.147	-0.048	-0.797	-0.316	-0.116	0.004
Edad	0.224	0.066	-0.787	0.238	-0.146	0.486	-0.020	-0.094

Para tener una visualización de las asociaciones, los resultados del ACP se graficaron en un gráfico de coordenadas (Fig. 30). El CP1 en el eje x y el CP2 en el eje y. Se aprecia una asociación entre los metales Cd y Pb, junto con el número de células en apoptosis. La metilación global se asocia a estos factores pero de forma negativa. Por otro lado, hay una asociación entre el Hg y el número de abortos.

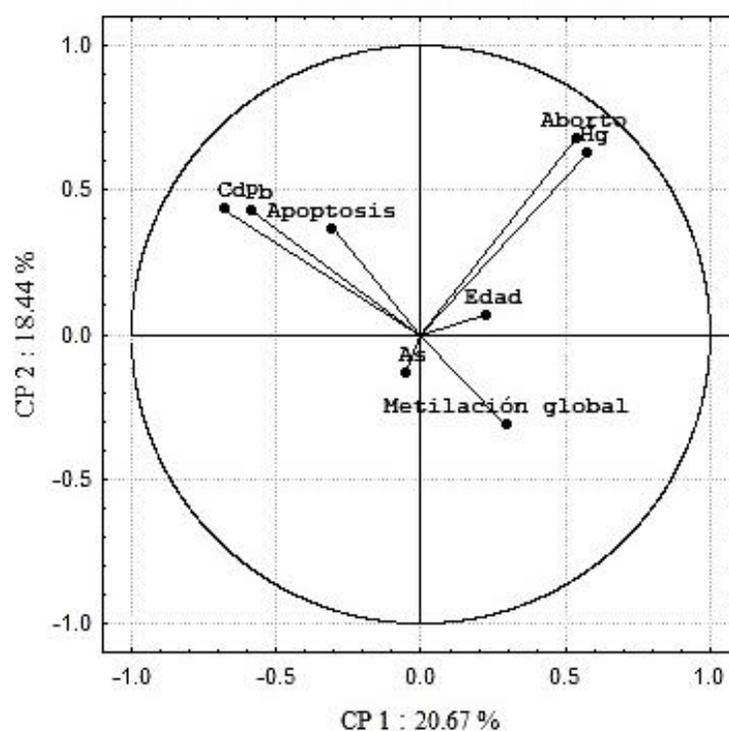


Figura 30. Gráfico de coordenadas de las variables utilizadas en el análisis de componentes principales CP1 y CP2.

8. DISCUSIÓN

8.1. Apoptosis y metilación en leche materna

La técnica de apoptosis como se aplicó en la presente tesis no ha sido usada para leche anteriormente, por lo que se discutirá por separado. En el análisis histológico acerca del número de células somáticas se obtuvo un promedio del conteo de la población celular total de 29,125 células mL⁻¹. Comparado con los resultados obtenidos por Wong *et al.* (2010), donde se reporta un conteo de 203,394 células mL⁻¹ (intervalo: 3,917 – 2,102,857 células mL⁻¹), nuestros resultados se encuentran dentro del rango, pero muy por debajo del valor promedio reportado. Sin embargo, en el estudio de Wong *et al.* (2010) fue leche materna en un estadio de “madura” correspondiente a los días 30-820 de lactancia, en comparación con nuestro estudio, donde la leche obtenida corresponde a “calostro” (día 5 posparto). La diferencia podría deberse a dicho estadio de la composición celular de la leche, así como diferencias durante el conteo debido a la metodología empleada (conteos en hematocitómetro).

En relación a la frecuencia de células apoptóticas respecto al conteo de células totales, en el estudio de López *et al.* (2003) en cultivo de células neuronales expuestas a Cd, se reporta un porcentaje de apoptosis del 5% al 10% en controles, mientras que el porcentaje aumenta hasta un 25% en dosis de 1µM de Cd. Estos valores fueron cuantificados mediante citometría de flujo con anexina V, que a diferencia de la técnica TUNEL usada en esta tesis, ésta diferencia células vivas, necróticas y apoptóticas, mientras que TUNEL es una detección no específica, por lo cual están reportados los falsos positivos (Ribble *et al.*, 2005). En Wong *et al.* (2010), reportan porcentaje de apoptosis en células epiteliales de la glándula mamaria, mediante la misma técnica de anexina V y ioduro de propidium, en fracción total de células, con el valor de 47.1% para células en apoptosis temprana y 52.8% para células vivas. Los valores reportados en esta tesis para apoptosis respecto a los trabajos anteriormente mencionados son bajos, ya que el promedio de porcentaje de apoptosis fue de 0.0058%; esto está directamente

relacionado con el conteo principal de células somáticas, que al ser bajo de igual manera respecto a valores reportados en otros estudios, arroja por lo tanto conteo de células apoptóticas bajo.

En sí, la proporción de células en apoptosis mostró correlación estadísticamente significativa con el número de células somáticas presentes en leche ($r = -1.0$), es decir, entre mayor número de células somáticas, menor número de células en apoptosis presentes. La apoptosis no mostró correlaciones estadísticamente significativas en el análisis con alguna variable evaluada (Tabla VIII), ni diferencias entre el hábito tabáquico (Fig. 22b). Respecto al número de embarazos, el porcentaje de apoptosis mostró una disminución no significativa conforme mayor número de embarazos (Fig. 18a), indicando una menor capacidad de muerte programada a mayores embarazos. Esto podría deberse a que mayor número de embarazos ocurren en mujeres de mayor edad, aun si nuestras expectativas era que la apoptosis disminuyera con la edad, incrementando la posibilidad de tumoraciones, pero no observamos un efecto de la edad con apoptosis (Fig. 29). Tampoco se observó efecto de apoptosis con metilación global (Fig. 27). Sin embargo sí se observó diferencia de la apoptosis respecto a la categoría metilación en el gen *BRCA1* (Fig. 25b), mostrando mayor porcentaje de apoptosis en las muestras que amplificaron positivas para metilación. Al respecto, también el Pb mostró un efecto significativo en relación a la metilación *BRCA1*, asimismo, en el PCA (Fig. 30) lo cual podría indicar que la apoptosis se encuentra asociada a algún factor al cual también se encuentra asociado el Pb, sin que el Pb determine directamente la cantidad de apoptosis en leche.

Por otro lado, la metilación global en muestras de leche arroja un valor promedio de 5meC de $2.67 \pm 0.76\%$ con un intervalo de $1.61\% - 2.69\%$. Estos valores se asemejan a los reportados en el estudio de Figueroa *et al.* (2012) en ADN genómico de medula espinal de sujetos sanos establecidos como control, de $2.56 \pm 0.18\%$. Por el contrario, el valor reportado en ADN genómico de sangre en ese mismo estudio fue de 0.40% . Ambos resultados se obtuvieron con base en

análisis colorimétricos por ELISA, como los resultados obtenidos en esta investigación. En Téllez Plaza *et al.* (2014) se reportan valores de 5meC global de 0.32% obtenido de población leucocitaria y 0.32% de todo el plasma sanguíneo mediante análisis basado en un ensayo ELISA en una población moderadamente expuesta a Cd, Sb (antimonio), W (tungsteno) y As. Se infiere, que la diferencia en el porcentaje relativo de metilación global del ADN se deba a la distinta composición celular de donde se obtiene el material genético, cada una con perfiles de metilación del ADN diferente.

La metilación global no mostró correlaciones estadísticamente significativas con alguna de las variables continuas evaluadas (concentración de metales, edad, apoptosis y células somáticas), como se observa en la tabla VIII, sin embargo al evaluar diferencias entre grupos categóricos presentes en el estudio con el GLM, como lo es el hábito tabáquico, se observó un valor de $p = 0.057$ cercano a la significancia estadística mostrando valores menores para la leche de las madres lactantes fumadoras respecto a las no fumadoras (Fig. 23), con lo cual podría decirse que las mujeres fumadoras presentan un estado de hipometilación global respecto a las mujeres no fumadoras. Se puede atribuir al hecho de que una persona fumadora está expuesta a una cantidad considerable de agentes tóxicos que componen un cigarrillo y los mecanismos de detoxificación, o el propio metabolismo de los elementos traza tóxicos, comprometen al organismo y el estatus de metilación se ve afectado indirectamente. Un caso interesante es el As, al cual una persona fumadora se encuentra expuesto y que compite directamente con el mecanismo de metilación al tener como donador de grupos metilos necesarios a la S-adenosilmetionina (SAM) para su metabolismo, lo cual puede verse reflejado con una disminución en el nivel de metilación global en el organismo. Aquí, se observaron valores más altos de As para las mujeres fumadores, pero dicho efecto no alcanzo a ser estadísticamente significativo (Fig. 21d). Asimismo, la metilación global se distribuye en el eje negativo junto con el As en relación a la CP2 (Fig. 30) y esta

negativamente asociada con Cd, Pb y apoptosis. En cuanto a la variable metilación del gen *BRCA1*, la metilación global no mostro diferencias estadísticamente significativas; y respecto al número de embarazos se observa un comportamiento constante a través de estos (Fig. 18c).

Para el análisis de metilación a nivel de gen específico, el ADN genómico previamente aislado de la población celular total presente en la leche materna se sometió a la modificación con bisulfito, reacción que consiste en la conversión de las citosinas no metiladas a uracilos, mientras que las citosinas metiladas son incapaces de someterse a la reacción y permanecen como citosinas (Clark *et al.*, 1994). Para discriminar entre citosinas metiladas, se recomienda el uso de oligonucleótidos específicos para ambas situaciones (Herman *et al.*, 1996), como se realizó en esta investigación, ya que aunado a lo anterior permite tener un control interno sobre la amplificación.

También se realizó una anidación en la PCR para aumentar la especificidad a la hora de diferenciar entre secuencias metiladas y no metiladas, así como para detectar la hipermetilación alélica en las secuencias apuntadas y facilitar el examen de los loci múltiples del gen (House *et al.*, 2003). La visualización de los productos de PCR en gel de poliacrilamida o agarosa es una forma cualitativa de obtener resultados sobre muestras con la región promotora metilada; sin embargo, si se quiere abordar cuantitativamente, se requiere un análisis de secuenciación, lo cual se realizó por secuenciación Sanger de los productos obtenidos mediante PCR metil específica (MSP). Se obtuvieron muestras que amplificaron la región promotora metilada (positivas para metilación), como se muestra en la Fig. 15, donde se observa una banda del tamaño esperado (75 pb). Así mismo, hubo un número de muestras significativas que no mostró amplificación alguna, lo cual pudo deberse a una falla en la técnica de amplificación o a la naturaleza del material genético usado como templado, sobre todo en cuanto a concentración del ADN e integridad. La estrategia cuantitativa fue secuenciación directa de los productos de PCR, sin embargo como

menciona Clarck *et al.* (2006) mediante esta alternativa se pierde el nivel de detalle obtenido a partir del análisis clonal, ya que éste destaca el grado de heterogeneidad de la metilación que a menudo se presenta en las muestras clínicas. Respecto a los resultados de la secuenciación, una vez obtenidas dichas secuencias y analizadas para su limpieza y alineamiento correspondiente y respecto a la estrategia aplicada, el tamaño de pares de bases (pb) se observó afectado, obteniendo secuencias menores al tamaño de interés (75pb) y una muestra positiva para metilación no arrojó resultados en el análisis; sin embargo se realizó la comparación con la secuencia de referencia, las dos secuencias positivas para metilación un control negativo y el control positivo (Fig. 16).

En cuanto a diferencias entre el grupo que presentó la región promotora del gen *BRCA1* metilada, respecto a las donantes que lo presentaron no metilado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la concentración de Pb, mostrando que las mujeres con el promotor del gen metilado, presentaron mayores niveles de Pb (Fig. 24c). También resultaron significativos estadísticamente el porcentaje de apoptosis y la edad (Fig. 25), siendo las mujeres positivas a metilación en el gen, las que presentan un porcentaje mayor de apoptosis. Respecto a la edad, las mujeres positivas a metilación en el gen, presentaron una edad menor respecto a las que negativas para metilación. El número de embarazos no alcanzo significancia, pero muestra la misma tendencia que la edad. En otros estudios se ha reportado que los niveles de Pb en huesos disminuyen con cada embarazo, proporcionando así una forma de destoxicación de la madre de este elemento (Gulson, 1998). Si este es el caso, un incremento en la apoptosis en leche estaría indicando un incremento por tóxicos en la leche, más que un efecto positivo asociado a menor número de tumoraciones, como se discutía antes. Respecto a las otras variables analizadas no mostraron efecto respecto a esta categoría. Es posible que el estado de metilación del gen se encuentre más estrechamente asociado a otros factores no considerados en esta investigación, como por ejemplo, hormonas esteroidales o plaguicidas.

8.2. Niveles de elementos traza en leche

Los análisis de metales traza en leche han sido reportados con anterioridad y la técnica validada en distintos tejidos. En el análisis de metales en leche materna se encontraron en algunas de las muestras de leche concentraciones de Hg ($n = 19$) y As ($n = 11$) por arriba de los límites tomados como valores permisibles de referencia para dicho tamiz (Abadin *et al.*, 1997). Los niveles de Cd y Pb no sobrepasaron los valores de referencia en ninguna de las muestras analizadas. Estos resultados concuerdan con diversos estudios donde la presencia de metales y metaloides en leche materna ha sido determinada (Gulson, 1998; Ettinger *et al.*, 2004; Islam *et al.*, 2004; Gaxiola *et al.*, 2013). Adelante, se discute cada elemento traza individualmente.

Por otro lado, dado que se ha reportado que la concentración de dichos elementos traza en la leche cambia a lo largo de la lactancia, i.e. concentración Hg, Cd y Pb en la leche disminuye a través del tiempo (Rossipal y Krachler, 1998), es necesario tener precaución al comparar leche en distintas etapas de madurez; así, la leche “madura” presenta aproximadamente 11-20% menos de concentración de Cd y Hg que el calostro (Rossipal y Krachler, 1998), mientras que el Pb presenta una tasa de disminución mucho más lenta. Es importante hacer muestreos de leche en un periodo específico, para que sea comparable. En esta investigación se analizó calostro, para conocer la concentración de excreta inicial de los elementos traza seleccionados.

8.3. Efecto del mercurio en leche sobre metilación y apoptosis

Respecto a la concentración de Hg en leche en nuestro estudio, se puede observar (Tabla X) que el valor promedio fue de $3.29 \pm 0.79 \mu\text{g L}^{-1}$, valor considerado alto en comparación con estudios como el de Jensen (1991), quien reporta un valor promedio $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ y Abadin *et al.* (1997), quienes encontraron bajo condiciones normales (mujeres no significativamente expuestas a Hg) una concentración promedio de 1.4 a $1.7 \mu\text{g L}^{-1}$ y a su vez propone un valor de

referencia de $3.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, en leches maternas analizadas provenientes de Minamata Japón, se encontraron niveles de Hg de $63 \mu\text{g L}^{-1}$ (Jensen, 1991) y en Iraq debido a la intoxicación masiva por meHg que se produjo por consumo de pan contaminado, se alcanzaron niveles de mercurio en leche de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Jensen, 1991).

Tabla X. Concentración de Hg en leche materna de madres sudcalifornianas y comparación con referencias. n = 79.

	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	Límites permisibles $\mu\text{g L}^{-1}$			Muestras sobrepasan el límite
		WHO 1989 ^a	Abadin <i>et al.</i> (1997)	FAO/WHO ^b Consumo tolerable $\mu\text{g Kg}^{-1}$ día	
Hg	3.29 ± 0.79	1.4 – 1.7	3.5	0.5	24.1%

^aWHO/IAEA estudio de colaboración, ^bFAO/WHO consumo tolerable provisional al día. Expert Committee on Food Additives. Valores reportados de concentración= promedio \pm ES.

En relación a valores de Hg en muestras individuales, el valor máximo obtenido en una muestra fue de $142.3 \mu\text{g L}^{-1}$, concentración considerada muy elevada respecto a valores promedio propuestos (Jensen, 1991; Caroli *et al.*, 1994; Abadin *et al.*, 1997, Massart *et al.*, 2008) y más similares a los valores de contaminación mencionados previamente en Iraq. Es relevante mencionar que esta muestra de leche, no corresponde al estadio de calostro, por lo que en los análisis estadísticos no fue considerada. En la revisión del cuestionario de la donante no se encontró un determinante específico que indicara la posible exposición a Hg para acumular dicha concentración encontrada en su leche; la mujer de 31 años se identificó como no fumadora, no presentó concentración elevada de algún otro elemento traza, su conteo de células somáticas y apoptosis se encuentra dentro del promedio ($16,560 \text{ cel mL}^{-1}$ y 0.006% , respectivamente) y en cuanto a la metilación, a nivel global su porcentaje se encuentra dentro del valor normal (1.12%) y no resultó positiva para la región promotora metilada en el gen *BRCA1*. Sin embargo, se observó que era la donante con el mayor número de abortos (n = 3). Un caso clínico reportado sobre una mujer intoxicada por Hg con concentraciones por encima de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ en sangre y $400 \mu\text{g L}^{-1}$ orina, presentó

abortos espontáneos; cuando esta mujer logró un embarazo, la concentración reportada en leche fue de $281 \mu\text{g L}^{-1}$ (Pugach y Clarkson, 2009), un caso similar al que aquí se reporta. Según revisiones, todas las formas químicas del Hg administradas a los animales, a menudo en dosis muy altas (peso corporal de mg kg^{-1}) durante e incluso antes de la gestación, resultaron en problemas reproductivos, tales como aborto espontáneo, mortinatos, malformaciones congénitas, infertilidad, alteraciones en el ciclo menstrual, inhibición de la ovulación y efectos conductuales de la descendencia (Schuurs, 1999).

Del resto de las muestras de leche, el 24.1% estuvo por encima de $3.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg, valor tomado como referencia para realizar dicho tamiz (Tabla X). Debido al número de muestras que están por encima del límite de referencia se infiere que casi un cuarto de la población de mujeres sudcalifornianas se encuentran expuestas a un nivel significativo de Hg. Sin embargo, en el 40.5% de las muestras no se detectó Hg, y en el resto de las mujeres el Hg no sobrepasó los niveles de referencia recomendados.

Por otro lado, es importante mencionar que el elemento cuantificado en la presente tesis es mercurio total (THg) y no su forma orgánica, metilmercurio (MeHg), que es considerada la forma más tóxica. La exposición al Hg depende de la forma química en que se encuentre: orgánico, inorgánico y mercurio metálico. El tipo de Hg (orgánico o inorgánico) presente en la leche está relacionado con su contenido en sangre y más concretamente, en el plasma. El MeHg, la forma orgánica de este elemento, es la presentación más neurotóxica y esta reportado que representa el 50% del Hg total excretado en la leche (Gaxiola *et al.*, 2013). Las formas inorgánicas del Hg son excretadas en la leche, pero sólo un pequeño porcentaje (aproximadamente 7%) es absorbido por el infante y rara vez penetra las barreras encefálicas, dado que esta presentación química no es lipofílica (Gaxiola *et al.*, 2013). Se ha calculado que la cantidad de sustancias tóxicas liposolubles que puede llegar a transferirse durante la lactancia materna exclusiva (LME = 6 meses) equivale a 20% o más de la carga corporal total de la madre

(Díaz *et al.*, 2013). Así, en el caso de MeHg en Iraq, previamente mencionado, en comparación con los niveles de Hg total en el presente estudio, podemos inferir que en su mayoría, no es mercurio orgánico el que se cuantificó, ya que este es lipofílico y no soluble debido a las características que presenta el calostro. El MeHg no tiene el mismo efecto sobre la metilación en tejidos que el mercurio inorgánico, como se observa en la Tabla IV.

Entre los estudios que han observado cambios en el patrón de metilación del ADN en genes específicos a causa del Hg, Hanna *et al.* (2012) encontraron en mujeres con niveles elevados de Hg en sangre ($2.9 \mu\text{g L}^{-1}$), un incremento en la metilación (hipermetilación) de la región promotora del gen glutatión S-transferasa mu 1 (*GSTM1*), aunque no se encontró correlación estadísticamente significativa entre las observaciones y no se evaluaron niveles de expresión del gen. El posible mecanismo por el cual este metal induce la hipermetilación aún no ha sido resuelto. Sin embargo, dado que se ha documentado una asociación entre la exposición a Hg y una baja expresión o actividad bioquímica de la enzima DNA metiltransferasa (DNMT), se infiere que este elemento altera de forma directa la actividad de la enzima DNMT o indirecta a través de su efecto en otras enzimas que también participen en esta cascada de señalización (Hanna *et al.*, 2012).

El Hg presentó correlación estadísticamente significativa pero baja con la concentración de Cd ($r = -0.218$) aunque esto no necesariamente implica una relación causal o mecanismo fisiológico, sino que puede ser que tengan un origen de contaminación similar. En nuestro análisis la concentración de este elemento no mostro relación con la metilación del ADN a nivel global y no mostró diferencias significativas respecto a los grupos de hábito tabáquico y metilación en el promotor del gen *BRCA1*. El comportamiento de la concentración de dicho elemento respecto al número de embarazos, no mostró diferencias estadísticamente significativas, manteniéndose constante. En cuanto al comportamiento respecto al número de abortos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, a pesar de que la donante con mayor número de abortos presentara la mayor

concentración de Hg, esto se debe claramente al número de muestra representativo de este nivel.

8.4. Efecto del cadmio en leche sobre metilación y apoptosis

El Cd por su parte, presentó una concentración promedio de 0.046 ± 0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$ con valores mínimos detectables de $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$ y un máximo de $0.2280 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla XI). El valor promedio que indica la WHO (1996) es de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0.1\text{--}3.8 \mu\text{g L}^{-1}$) y en otros estudios ha sido detectado a niveles de $0.28 \mu\text{g L}^{-1}$. Nuestros resultados concuerdan con concentraciones determinadas anteriormente en distintas investigaciones y son consideradas dentro de intervalos normales y con bajo nivel de excreción. Se han reportado niveles de Cd dos veces mayores ($0.16 \mu\text{g L}^{-1}$) en madres fumadoras de más de diez cigarrillos al día o madres fumadoras pasivas, que en las no fumadoras ($0.07 \mu\text{g L}^{-1}$) (Radisch *et al.*, 1987).

Tabla XI. Concentración de Cd en leche materna de madres sudcalifornianas y comparación con referencias. n = 79.

	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	Límites permisibles $\mu\text{g L}^{-1}$			Muestras sobrepasan el límite
		WHO 1989 ^a	Abadin <i>et al.</i> (1997)	FAO/WHO ^b Consumo tolerable $\mu\text{g Kg}^{-1}$ día	
Cd	0.046 ± 0.005	< 1	5	1	0%

^aWHO/IAEA estudio de colaboración, ^bFAO/WHO consumo tolerable provisional al día. Expert Committee on Food Additives. Valores reportados de concentración= promedio \pm ES.

El Cd presento una disminución no significativa en relación al número de embarazos, siendo por ejemplo, los niveles en la leche la mitad en el tercer embarazo comparados con el primero (Fig. 17b). Esto indica una detoxificación de Cd con cada embarazo, lo cual concuerda con resultados previamente publicados (Rossipal y Krachler, 1998).

Respecto a la asociación de Cd con la apoptosis, la información bibliográfica señala que una vez acumulado el Cd, es capaz de afectar los patrones de actividad transcripcional y señalización celular que pueden llevar a

respuestas de adaptación o supervivencia (Thijssen *et al.*, 2007), proliferación celular (Liu *et al.*, 2008) o puede culminar en la muerte celular vía apoptosis o necrosis (Zhang *et al.*, 2010; Brama *et al.*, 2012); sin embargo, en nuestro análisis el Cd no mostró correlación con este mecanismo, aunque sí una asociación positiva del Cd con la apoptosis en el PCA (Fig. 30).

Por otro lado, existe evidencia que sugiere que el Cd induce expresión aberrante en ciertos genes, que dan como resultado un incremento en la proliferación celular o un bloqueo de apoptosis, lo cual provee una explicación alternativa a la carcinogénesis inducida por Cd (Wang, 2012). Los niveles de metilación global del ADN son tiempo-dosis dependientes; es decir, a tiempos de exposición tempranos (24 horas - 1 semana), induce un estado de hipometilación, pero a un largo plazo de tiempo (> 5 semanas) cambia a un estado de hipermetilación (Takiguchi *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). En cuanto a metilación en genes específicos, el Cd puede inhibir o aumentar los niveles de metilación del ADN en oncogenes, según los tiempos de exposición. Aquí observamos una asociación negativa entre los niveles de Cd en leche y el porcentaje de metilación global en leche usando el ACP (Fig. 30).

Algunos estudios han mostrado que no existe relación entre los hábitos fumadores de la madre y el contenido de Cd en su leche, por lo tanto se ha propuesto la existencia de un mecanismo homeostático regulador que previene la transferencia del metal hacia la leche, que consiste en el enlace del Cd a la proteína metalotioneína y su posterior transporte y excreción (Kantol y Vartiainen, 2001). En nuestro análisis la concentración de este elemento no mostró relación con la metilación del ADN a nivel global y no mostró diferencias significativas respecto a los grupos de hábito tabáquico y metilación en el promotor del gen *BRCA1*.

8.5. Efecto del plomo en leche sobre metilación y apoptosis

En cuanto a las concentraciones de Pb, los valores promedio publicados por Jensen (1991) van de los 5 – 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ y por Abadin *et al.* (1997) entre 2 – 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, similares a los reportados por la WHO (1989) (Tabla XII). Estudios sobre concentración de Pb en leche humana han reportado intervalos de concentración bajo tres niveles de magnitud, $<1 \mu\text{g L}^{-1}$, entre 1 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ y $>100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Namihira *et al.*, 1993; Gulson *et al.*, 1998). En nuestro estudio, la concentración promedio de plomo fue de $0.528 \pm 0.122 \mu\text{g L}^{-1}$ con una máxima concentración de $7.92 \mu\text{g L}^{-1}$, por lo que los valores se asemejan a los obtenidos en estudios similares. Las mujeres en periodo fértil, donde el Pb en sangre excede $100 \mu\text{g L}^{-1}$ están en riesgo de tener niños con plomo en sangre por arriba del valor guía recomendado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América. Si el Pb en sangre de estos niños permanece elevado, esto puede incrementar el riesgo de tener deficiencias cognitivas. El Pb en sangre de estos niños debe ser monitoreado muy de cerca para tomar medidas apropiadas para minimizar la exposición de estos niños al plomo del medio ambiente (NOM-047-SSA1-2011). El Pb, como el Cd, presentó una disminución en relación al número de embarazos (Fig. 17c), indicando una detoxificación. En el caso del Pb en leche, más que una exposición de la mujer a corto plazo, se atribuye a la movilización durante la lactancia de este elemento ya acumulado en el organismo. Por lo tanto, que la concentración de Pb disminuye respecto aumenta el número de embarazos, podría atribuirse a una detoxificación del organismo durante el embarazo y la posterior lactancia. (Gulson *et al.*, 1998; Rossipal y Krachler, 1998).

Tabla XII. Concentración de Pb en leche materna de madres sudcalifornianas y comparación con referencias. n = 79.

	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	Límites permisibles $\mu\text{g L}^{-1}$			Muestras sobrepasan el límite
		WHO 1989 ^a	Abadín <i>et al.</i> (1997)	FAO/WHO ^b Consumo tolerable $\mu\text{g Kg}^{-1}$ día	
Pb	0.528 ± 0.122	2 - 5	20	5	0%

^aWHO/IAEA estudio de colaboración, ^bFAO/WHO consumo tolerable provisional al día. Expert Committee on Food Additives. Valores reportados de concentración= promedio \pm ES.

El mecanismo subyacente para comprender la relación entre la exposición a este elemento y alteraciones en la metilación del ADN aun no es establecido, sin embargo, la hipótesis sugerida es que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), podrían inhibir la unión de proteínas ligadoras de metil-CpG y en un punto final cambiar la funcionalidad de la ADN metiltransferasa (Pilsner *et al.*, 2009). Otro posible mecanismo es sugerido en el estudio de Waly *et al.* (2004), con un modelo *in vitro* de células de neuroblastoma humano, encontraron que la exposición al Pb, inhibe la actividad del factor de crecimiento insulínico (IGF-1), que actúa directamente en la síntesis de metionina, la cual a su vez es una de las enzimas cruciales en la regulación de la metilación del ADN. En nuestro análisis la concentración de este Pb solo mostró correlación estadísticamente significativa con la concentración de As y no mostró relación con la metilación del ADN a nivel global así como respecto al hábito tabáquico. En cuanto a la metilación en el promotor del gen *BRCA1* se observó que la concentración de Pb era mayor en las mujeres donantes que resultaron positivas para la amplificación de la región metilada (Fig. 24c), como ya se discutió arriba.

8.6. Efecto del arsénico en leche sobre metilación y apoptosis

Por otro lado, en cuanto a la presencia de As, las concentraciones en nuestro análisis están en el intervalo del límite detectable $<0.005 \mu\text{g L}^{-1}$ y un máximo de $23.81 \mu\text{g L}^{-1}$, con un valor promedio de $1.35 \pm 0.39 \mu\text{g L}^{-1}$. Islam *et al.*

(2014) reporta una concentración promedio de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ en un estudio comparando tres estadios durante la lactancia. Carignan *et al.* (2015) determinó un valor promedio de $0.31 \mu\text{g L}^{-1}$. Concha *et al.* (1998) reporta un valor promedio de $2.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (considerado un bajo nivel) con rangos de $0.8 - 7.7 \mu\text{g L}^{-1}$. WHO (1996) indica que el valor promedio de As en leche debe ser de $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0.1 - 0.8 \mu\text{g L}^{-1}$) y considera una alta concentración a valores promedio de $18 \mu\text{g L}^{-1}$, nivel obtenido en leches provenientes de Filipinas, lugar considerado expuesto por el cultivo de arroz. Por lo tanto, de las muestras analizadas aquí, podemos concluir que 15.04% de las muestras ($n = 17$) están por arriba de una concentración de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ valor utilizado para el tamiz. Esto puede deberse a que en B.C.S. la presencia de As en pozos de agua esta evidenciada, por lo tanto la población se encuentra expuesta a través de este medio (Cruz Falcon *et al.*, 2016).

Tabla XIII. Concentración de As en leche materna de madres sudcalifornianas. $n = 79$.

	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	Límites permisibles $\mu\text{g L}^{-1}$			Muestras sobrepasan el límite
		WHO 1989 ^a	Abadín <i>et al.</i> (1997)	FAO/WHO ^b Consumo tolerable $\mu\text{g Kg}^{-1}$ día	
As	1.48 ± 0.33	< 2	NR	2	13.92%

^aWHO/IAEA estudio de colaboración, ^bFAO/WHO consumo tolerable provisional al día. Expert Committee on Food Additives. Valores reportados de concentración= promedio \pm ES.

Respecto al estado de metilación global, la mayoría de los estudios reportan que la exposición al As induce un estado de hipometilación en el ADN (Tajuddin *et al.*, 2013; Téllez *et al.*, 2014); sin embargo, existen casos en los que se reporta una hipermetilación global (Mass y Wang, 1997; Davis *et al.*, 2000). En este estudio no observamos un efecto puntual de la concentración de As en el mecanismo de metilación global; las donantes con concentraciones por arriba del límite, presentaron porcentajes de metilación global por debajo del promedio ($2.67 \pm 0.76\%$), respecto a las donantes con mayor concentración de 5meC.

En contraste, el estado de metilación a nivel de genes específicos relacionados a tumorigénesis y oncogenes en estudios *in vivo* demuestran una metilación en respuesta a la exposición a As en genes como Inhibidor 2A de quinasa dependiente de cilina (*p16/CDKN2A*) (Davis *et al.*, 2000; Chanda *et al.*, 2006), en la proteína supresora de tumores (*p53*) (Mass y Wang, 1997; Davis *et al.*, 2000), en el supresor de tumores dominio Ras, familia 1 isoforma A (*RASSF1A*) (Cui *et al.*, 2006a; Marsit *et al.*, 2006), en la proteína quinasa asociada a apoptosis (*DAPK*) (Chai *et al.*, 2007), y en el proto-onco gen de la familia Ras (*HRAS*) (Benbrahim *et al.*, 2005). En el estudio realizado por Smeester *et al.* (2011), se identificaron 183 promotores de genes diferencialmente metilados en adultos de Hidalgo, México que habitan en zonas con problemas de contaminación por As, de los cuales 182 estaban hipermetilados en sujetos con arsenosis. Por otro lado, estudios *in vitro* con líneas celulares humanas, han demostrado también cambios inducidos en el patrón de metilación en regiones promotoras de genes por la exposición a As, como en Cui *et al.* (2006b), que reportó una disminución de la hipermetilación en los genes *RASSF1A*, *GSTP1* y *p16*. A su vez se han determinado correlaciones entre la metilación del ADN y el nivel de expresión de dichos genes, así como relaciones inversas entre los niveles de ARNm y la hipermetilación del ADN en promotores de diversos genes (Jensen *et al.*, 2008, 2009). En este estudio, las donantes con mayor concentración de As, presentaron la región del promotor no metilada, aunque esto no alcanzó una diferencia significativa e incluso, una donante positiva a metilación en esta región presentó una concentración por arriba del límite ($2.24 \mu\text{g L}^{-1}$), sin embargo no podemos considerarlo un efecto directo causal de dicha concentración. Asimismo, las mujeres fumadoras presentaron mayores niveles, pero sin alcanzar la diferencia significativa, de As en la leche en comparación con mujeres no fumadoras.

8.7. Integración

El presente trabajo demuestra que el uso de leche materna provee células epiteliales de la glándula mamaria en cantidades necesarias para análisis de biomarcadores de detección temprana y evaluación del riesgo de cáncer de mama en mujeres asintomáticas sin lesiones sospechosas (Wong, 2010); proporcionando material genético (ADN, ARN) para dichos análisis. Además, la leche materna dentro de su población celular, proporciona células del sistema inmune (macrófagos, leucocitos, linfocitos) y células madre (Hassiotou *et al.*, 2013). Las células de la leche materna también se pueden utilizar como modelo para entender la malignidad mamaria. La evidencia creciente está sugiriendo que las células madre mamarias son blancos de la transformación maligna y responsables de la iniciación, progresión, y metástasis del cáncer de mama, por lo menos para ciertos subtipos del cáncer (Tai *et al.*, 2005; Prat y Perou, 2009).

En cuanto al análisis de componentes principales (ACP), se pueden observar tres agrupaciones principales (Tabla IX). En el CP1 se encuentra Cd (-0.679) y no significativamente pero presente, Pb (-0.581). Dado que no hay una correlación directa entre estos factores, es posible que el efecto sea determinado por algún factor que compartan el Cd y Pb, como puede ser un alimento o la exposición a gasolina u otros contaminantes. En el CP2 se encuentra Hg (0.626) y el número de abortos (0.677), lo cual concuerda con la mujer con altos niveles de Hg y mayor número de abortos.

El CP3 asocia de forma inversa el As con la edad, indicando una detoxificación de este elemento por un lado, y una metilación global inversa asociado al As en el CP4, lo cual también se observa en la figura 30. De acuerdo a Tellez-Plaza *et al.* (2014), existe una asociación evidenciada entre dicha concentración del elemento y la metilación global, debido a que ambos mecanismos comparten el mismo donador de grupo metil, la S-adenosilmetionina (SAM); por lo tanto, existe una demanda competitiva entre el metabolismo de As y la metilación del ADN por SAM, lo cual puede afectar el estatus global de la

metilación (Lee *et al.*, 2009). El metabolismo del As consiste en una biotransformación del As inorgánico mediante la adición de grupos metilo que favorece su solubilidad y excreción. Esta reacción es catalizada por la enzima arsénico metiltransferasa (AS3MT), utilizando la S-adenosil metionina (SAM) como donador de grupos metilo, al igual que sucede en la metilación del ADN (Thomas *et al.*, 2004; Drobna *et al.*, 2009). Como consecuencia, se espera que a concentraciones elevadas de As el nivel de metilación global disminuya, al disminuir el donador de grupos metilos debido a que también está involucrado y activo en el propio metabolismo del As. Los niveles altos de As podrían a su vez, estar asociados con el hábito tabáquico, el cual no fue considerado en el ACP, pero que muestra mayores niveles para las mujeres fumadoras (Fig. 21d).

De los metales analizados, el Pb y Cd se mantuvieron en concentraciones constantes y dentro de valores normales, es decir, no se encontraron valores que indicaran una exposición significativa de estos. Sin embargo se observó un comportamiento de disminución de ambos elementos respecto mayor número de embarazos, lo cual podría indicar una destoxificación. Ambos presentaron niveles más altos en mujeres con el gen *BRCA1* metilado, el cual también mostro un efecto sobre la apoptosis y disminuyo con la edad. Esta asociación es evidenciada en el ACP (Fig. 30), donde se observa un asociación positiva con la apoptosis y negativa con la metilación global. Es probable que si los niveles fueran mayores a los de referencia, se podría observar un efecto más claro sobre estos factores, lo cual aquí no ocurre dada la cantidad de muestras donde estos dos elementos no fueron detectados.

En cuanto al Hg y As, existen concentraciones que podrían indicar una exposición significativa en una cuarta parte de la población analizada, pero esto no se ve reflejado en los mecanismos de metilación global o gen específico. Se ha sugerido a la metilación global del ADN como un biomarcador útil para la exposición a Hg (entre otros elementos tóxicos), pero es importante recalcar que aunque la metilación global del ADN puede ser un indicador general de que el

organismo se encuentra afectado por algún contaminante químico, no existen estudios que especifiquen o vinculen un comportamiento determinado, es decir, que se asocie un estado de hipometilación o hipermetilación a resultados específicos en la salud (Baccarelli y Bollati, 2009; Basu *et al.*, 2014).

Es probable que el resto de la variación este asociado más estrechamente a la composición química de macronutrientes, la genética y otros factores no analizados aquí. Esto puede deberse a que aunque se ha establecido que existen cambios en la metilación del ADN en relación al nivel de exposición que se tenga con niveles contaminantes de metales, metaloides y compuestos orgánicos persistentes el o los mecanismos exactos siguen siendo confusos (Hou *et al.*, 2012; Bailey y Fry, 2014; Breton y Marutani, 2014). Aunado a lo anterior, la variabilidad de muestreo aleatorio y las diferencias en la conformación residual, los diseños de estudio y los niveles de exposición a la población pueden subyacer a las inconsistencias en los estudios que evalúan la metilación global relacionada con metales (Tellez Plaza *et al.*, 2014).

Es relevante concluir, bajo el contexto de la investigación que no hay estudios que demuestren que exista un riesgo para la salud del lactante debido a contaminación química detectada en la leche de la madre y la Organización Mundial de la Salud (OMS), establece los beneficios de la lactancia materna tienen más peso que el riesgo derivado de los bajos niveles de contaminantes ambientales en la leche humana. Además, existe evidencia que sugiere que: a) de existir efectos en la salud infantil por exposición a concentraciones tóxicas de elementos, estos se puede deber principalmente a la exposición prenatal, más que a una transmisión a través de la leche; y b) que potenciales efectos causados por exposición a contaminantes ambientales pueden ser contrarrestados a través de factores de protección en la leche materna (Pronczuk *et al.*, 2004; WABA y IPEN, 2004). Adicionalmente, las alternativas de la lactancia, como son los derivados de la leche de vaca, cabra, u otros alimentos, pueden contener incluso mayores niveles de contaminación, debido como en el caso de los humanos, a la dieta

misma, y también a su proceso de fabricación (Goldman *et al.*, 2001; Llorca *et al.*, 2010). Cabe mencionar que el utilizar la leche materna para realizar monitoreos de niveles de contaminación ambientales y de alimentos, es una estrategia no invasiva que responde a la facilidad para obtener la muestra y de analizarla para proporcionar un diagnóstico de salud y no a la preocupación intrínseca por la calidad de la propia leche (Beseler *et al.*, 2006).

9. CONCLUSIONES

Nuestros resultados sugieren que una exposición materna a elementos traza en el ambiente en concentraciones que representan un riesgo para la salud, no necesariamente deriva en una transferencia de este elemento hacia la leche y reafirma la seguridad alimentaria de la lactancia.

10. RECOMENDACIONES

- En la cuantificación de elementos tóxicos, respecto a Hg se recomienda realizar la cuantificación de las formas presentes del elemento, es decir, en esta investigación se cuantifico Hg total (THg) y no la forma considerada más toxica el mercurio orgánico (MeHg).
- Para el aislamiento de material genético a partir de leche materna que sea usado para análisis de metilación, se recomienda que se realice la separación de las distintas poblaciones celulares presentes en la leche, para disminuir heterogeneidad en los resultados.
- Para el análisis de metilación a nivel de un locus específico, se recomienda una selección de oligonucleótidos que diferencien entre secuencias metiladas y no metiladas, así como realizar una secuenciación clonal para obtener mejores resultados.

11. LITERATURA CITADA

- Abadin, H.G., B.F. Hibbs, H.R. Pohl. 1997. Breast-Feeding exposure of infants to cadmium, lead, and mercury: a public health viewpoint. *Toxicol. Ind. Health*. 13(4):495–517.
- American Cancer Society (ACS). 2017. Cáncer de seno: Detección temprana y diagnóstico del cáncer de seno. Recuperado el 15 de octubre del 2017 de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno.html>
- Albores, A., B. Quintanilla, L.M. Del Razo, M.E. Cebrián. 1997. Arsénico. En: Albert Palacios L. (ed). *Introducción a la toxicología ambiental*. América. Metepec; ECO. Capítulo 15 pp. 247–262.
- Al-Saleh, I., N. Shinwari, A. Mashhour. 2003. Heavy metals concentrations in the breast milk of Saudi women. *Biol. Trace Elem. Res*. 96(1):21–38.
- Antequera, F., A. Bird. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90(1):11995–11999.
- Arai, Y., J. Ohgane, S. Yagi, R. Ito, Y. Iwasaki, K. Saito, K. Akutsu, S. Takatori, R. Ishii, R. Hayashi, S. Izumi, N. Sugino, F. Kondo, M. Horie, H. Nakazawa, T. Makino, K. Shiota. 2011. Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples. *J. Reprod. Dev*. 57(1):507–517.
- Aresta, A., F. Palmisano, C. Zambonin. 2005. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine and nicotine in human milk by liquid chromatography with diode array UV detection. *Food Chem*. 93(1):177–181.
- Arita, A., M. Costa. 2009. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium. *Metallomics*. 1(1):222–228.
- Baccarelli, A., V. Bollati. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr. Opin. Pediatr*. 21(2):243–251.
- Basu, N., J. Goodrich, J. Head. 2014. Ecogenetics of mercury: from genetics polymorphisms and epigenetics to risk assessment and decision-making. *Environ. Toxicol. Chem*. 33(1): 1248–1258.
- Basu, N., J.A. Head, D.H. Nam, J.R. Pilsner, M.J. Carvan, H.M. Chan, F.W. Goetz, C.A. Murphy, K. Rouvinen-Watt, A.M. Scheuhammer. 2013. Effects of

- methylmercury on epigenetic markers in three model species: mink, chicken, and yellow perch. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol.* 157(1):322–327.
- Baylin, S.B. 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2(1): S1–S5.
- Bailey, K.A., R.C. Fry. 2014. Arsenic-associated changes to the epigenome: what are the functional consequences. *Curr. Environ. Health Rep.* 1(1):22–34.
- Begg, C.B. 2002. On the use of familial aggregation in population-based case probands for calculating penetrance. *J. Natl. Cancer Inst.* 94(1):1185–1187.
- Benbrahim-Tallaa, L., R.A. Waterland, M. Styblo, W.E. Achanzar, M.M. Webber, M.P. Waalkes. 2005. Molecular events associated with arsenic-induced malignant transformation of human prostatic epithelial cells: aberrant genomic DNA methylation and K-ras oncogene activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206(1): 288–298.
- Beseler Soto, B., M. Sanchez Palomares, L. Landa Rivera, M.J. Benlloch Muncharaz, M. Ferriol Camacho, L. Santos, L. Serrano, A. Mengual Sendra, J.M. Paricio Talayero. 2006. Medicamentos, plantas, tóxicos, enfermedades y lactancia: una ayuda en español en internet. www.e-lactancia.org. *Acta Pediatr. Esp.* 64(1): 337–344.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes, dev.* 16(1):6–22.
- Bleich, S., B. Lenz, M. Ziegenbein, S. Beutler, H. Frieling, J. Kornhuber. 2006. Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces down-regulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 30(1): 587–591.
- Bollati, V., A. Baccarelli. 2010. Environmental epigenetics. *Heredity.* 105(1): 105–112.
- Breton, C.V., A.N. Marutani. 2014. Air pollution and epigenetics: recent findings. *Curr. Environ. Health Rep.* 1(1):35–45.
- Browne, P., S.E Dinc, E. Punska, S. Agus, A. Vitrinel, G.C. Erdag, D. L. Anderton, K. Arcaro, B. Yilmaz. 2014. Promoter methylation in epithelial-enriched and epithelial-depleted cell populations isolated from breast milk. *J. Hum. Lact.* 30(4): 1–8.
- Carignan, C.C., K.L. Cottingham, B.P. Jackson, S.F. Farzan, A.J. Gandolfi, T. Punshon, C.L. Folt, M.R. Karagas. 2015. Estimated exposure to arsenic in

- breastfed and formula-fed infants in a United States Cohort. *Environ. Health Perspect.* 123(5): 500–506.
- Casanova, A. 2017. Relación entre los niveles de HUFA y antioxidantes en leche materna de cuatro zonas geoeconómicas expuestas a distintos niveles de contaminación química. Tesis (Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los recursos naturales). Baja California Sur, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC. 156p.
- Chai, C.Y., Y.C. Huang, W.C. Hung, W.Y. Kang, W.T. Chen. 2007. Arsenic salts induced autophagic cell death and hypermethylation of DAPK promoter in SV-40 immortalized human uroepithelial cells. *Toxicol. Lett.* 173(1):48–56.
- Chanda, S., U. Dasgupta, B.D. Guhamazumder, M. Gupta, U. Chaudhuri, S. Lahiri, S. Das, N. Ghosh, D. Chatterje. 2006. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol. Sci.* 89(1):431–437.
- Cho, N., B. Kim, M. Choi, E. Yoo, K.C. Moon, Y.M. Cho, D. Kim, G.H. Kang. 2007. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-I and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *J. Pathol.* 211(1): 269–277.
- Clark, S., J. Harrison, C.L. Paul, M. Frommer. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic. Acids. Res.* 22(1): 2990–2997.
- Clark, S., A. Statham, C. Stirzaker, P. Molloy, M. Frommer. 2006. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nature protocols* 1(5): 2353–2364.
- Concha, G., G. Vogler, N. Barbro, M. Vahter. 1998. Low-level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in the drinking water. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 71(1):42–46.
- Cruz Falcón, A., J.M Murillo, E. Troyo, E. Nava. 2016. Distribución de sales y arsénico en el acuífero de La Paz BCS, México. *Recursos Naturales y Sociedad* 2(2): 56–75.
- Cui, X., T. Wakai, Y. Shirai, K. Hatakeyama, S. Hirano. 2006a. Chronic oral exposure to inorganic arsenate interferes with methylation status of p16INK4a and RASSF1A and induces lung cancer in A/Jmice. *Toxicol. Sci.* 91(1):372–381.

- Cui, X., T. Wakai, Y. Shirai, N. Yokoyama, K. Hatakeyama, S. Hirano. 2006b. Arsenic trioxide inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced genes in human liver cancer cells. *Hum. Pathol.* 37(1):298–311.
- Cupul-Uicab, L.A., B.C. Gladen, M. Hernandez Avila, M.P. Longnecker. 2009. Reliability of reported breastfeeding duration among reproductive-aged women from Mexico. *Maternal Child. Nutr.* 5(1):125–137.
- Davis, C.D., E.O. Uthus, J.W. Finley. 2000. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation *in vitro* in Caco-2 cells and *in vivo* in rat liver and colon. *J. Nutr.* 130(1):2903–2909.
- De Jong, M.M., I. Nolte, G. Meerman, W. Van der Graaf, J. Oosterwijk, J. Kleibeuker, M. Schaapveld, E. de Vries. 2002. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J. Med. Genet.* 39 (1): 225–242.
- Debnath, J., K.R. Millis, N.L. Collins, M.J. Reginato, S.K. Muthuswamy, J.S. Brugge. 2002. The Role of Apoptosis in Creating and Maintaining Luminal Space within Normal and Oncogene-Expressing Mammary Acini. *Cell.* 111(1):29–40.
- Desaulniers, D., G.H. Xiao, H. Lian, Y.L. Feng, J. Zhu, J. Nakai, W.J. Bowers. 2009. Effects of mixtures of polychlorinated biphenyls, methylmercury, and organochlorine pesticides on hepatic DNA methylation in prepubertal female Sprague-Dawley rats. *Int. J. Toxicol.* 28(1):294–307.
- Díaz-Gómez, N.M, S. Ares, M.T. Hernández-Aguilar, J.A. Ortega García, J.M. Paricio-Talayero, L. Landa Rivera. 2013. Contaminantes químicos y lactancia materna: tomando posiciones. *An. Pediatr.* 79(6):391–391.
- Dolinoy, D.C., J.R. Weidman, R.L. Jirtle. 2007. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod. Toxicol.* 23(1): 297–307.
- Drobna, Z., M. Styblo, D.J. Thomas. 2009. An overview of arsenic metabolism and toxicity. *Curr. Protoc. Toxicol.* 42 (431):4.31.1– 4.31.6.
- Esteller, M., J.M. Silva, G. Dominguez, F. Bonilla, X. Matias-Guiu, E. Lerma, E. Bussaglia, J. Prat, I. Harkes, E. Repasky, E. Gabrielson, M. Schutte, S. Baylin, J. Herman. 2000. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 92(1):564–569.
- Ettinger, A.S., M.M. Tellez, C. Amarasiriwardena, D. Bellinger, K. Peterson, J. Schwartz, H. Hu, M. Hernandez. 2004. Effect of Breast Milk Lead on infant

- blood lead levels at 1 month of age. *Environ. Health Perspect.* 112(1):1381–1385.
- Flores, M., M.R. Pasquel, I. Maulen, J. Rivera. 2005. Exclusive breastfeeding in 3 rural localities in Mexico. *J. Hum. Lact.* 21(1):276–83.
- Figueroa-Romero, C., J. Hur, D. Bender, C. Delaney, M. Cataldo, A. Smith, R. Yung, D. Ruden, B. Callaghan, E. Feldman. 2012. Identification of epigenetically altered genes in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE.* 7(12): e52672.
- Frommer, M., L.E. McDonald, D.S Millar, C.M. Collins, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy, C.L. Paul. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(1):1827–1831.
- Galaris, D., A. Evangelou. 2002. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42(1):93–103.
- Gaxiola, R., T. Zenteno, V. Labrada, A. Celis, B. Acosta, L. Méndez. 2013. Concentraciones de mercurio en leche de mujeres del noroeste de México; posible asociación a la dieta, tabaco y otros factores maternos. *Nutr. Hosp.* 28(3):934–942.
- Gaxiola, R., V. Labrada, A. Celis, B. Acosta, L. Méndez, T. Zenteno. 2014. Interaction between mercury (Hg), arsenic (As) and selenium (Se) affects the activity of glutathione S-transferase in breast milk; possible relationship with fish and shellfish intake. *Nutr. Hosp.* 30(2): 436–446.
- Genetics Home Reference (GHR). 2017. Help me understand genetics: Cell and DNA. Recuperado el 10 de octubre del 2017 de: <https://ghr.nlm.nih.gov>
- Goodrich, J.M., N. Basu, A. Franzblau, D.C. Dolinoy. 2013. Mercury biomarkers and DNA methylation among Michigan dental professionals. *Environ. Mol Mutagen.* 54(3):195–203.
- Goldman, L.R., R. Newbold, S.H. Swan. 2001. Exposure to soy-based formula in infancy. *JAMA.* 286(1): 2402– 2403.
- Gonzalez-Salazar, F., R.M. Cerda-Flores, J.A. Robledo-García, S. Valdovinos-Chavez, J. Vargas-Villareal, S. Said Fernández. 2005. Breastfeeding counseling and early mother-child contact are associated with exclusive maternal breastfeeding. A hospital based-case-control study. *Gaceta Médica de México.* 141(1):99–103.

- Gulson, B.L., C.W. Jameson, K.R. Mahaffey, K.J. Mizon, N. Patison, A.J. Law, et al. 1998. Relationships of lead in breast milk to lead in blood, urine, and diet of the infant and mother. *Environ. Health Perspect.* 106(1):667–674.
- Gurbay, A., M. Charehsaz, A. Eken, A. Sayal, G. Girgin, M. Yurdakok, S. Yigit, D. Erol, G. Sahin, A. Aydin. 2012. Toxic metals in breast milk samples from Ankara, Turkey: assessment of lead, cadmium, nickel, and arsenic levels. *Biol. Trace Elem. Res.* 149(1):117–122.
- Hahm, H.A., N.E. Davidson. 1998. Apoptosis in the mammary gland and breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* 5(3):199–211.
- Hanna, C.W., M.S. Bloom, W.P. Robinson, D. Kim, P.J. Parsons, F.S. vom Saal, J.A. Taylor, A.J. Steuerwald, V.Y. Fujimoto. 2012. DNA methylation changes in whole blood is associated with exposure to the environmental contaminants, mercury, lead, cadmium and bisphenol A, in women undergoing ovarian stimulation for IVF. *Hum. Reprod.* 27:1401–1410.
- Herman, J.G., A. Merlo, L. Mao, R. Lapidus, J. Issa, N. Davidson, D. Sidransky S. Baylin. 1995. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 55(1):4525–4530.
- Hou, L., X. Zhang, D. Wang, A. Baccarelli. 2012. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int. J. Epidemiol.* 41(1):79–105.
- Islam, M.R., J. Attia, M. Alauddin, M. McEvoy, P. McElduff, C. Slater, M. Islam, et al. 2014. Availability of arsenic in human milk in women and its correlation with arsenic in urine of breastfed children living in arsenic contaminated areas in Bangladesh. *Environmental Health.* 13(1):101.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2016. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama. Recuperado el 12 de octubre del 2017 de: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mama2016_0.pdf
- Jensen, A. A. 1991. Levels and trends of environmental chemicals in human milk. In: Jensen A. A. Slorach SA, eds. *Chemical Contaminants in Human Milk*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1991:45–198.
- Jensen, T.J., P. Novak, K.E. Eblin, A.J. Gandolfi, B.W. Futscher. 2008. Epigenetic remodeling during arsenical-induced malignant transformation. *Carcinogenesis* 29(1):1500–1508.

- Jensen, T.J., P. Novak, S.M. Wnek, A.J. Gandolfi, B.W. Futscher. 2009. Arsenicals produce stable progressive changes in DNA methylation patterns that are linked to malignant transformation of immortalized urothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241(1): 221–229.
- Kane, M.F., M. Loda, G.M. Gaida, J. Lipman, R. Mishra, H. Goldman, J. Jessup, R. Kolodner. 1997. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57(1):808– 811.
- Kantol, M., T. Vartainen. 2001. Changes in selenium, zinc, copper and cadmium contents in human milk during the time when selenium has been supplemented to fertilizers in Finland. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15(1):11–17.
- Karin, M., M. Delhase. 1998. JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(16):9067–9069.
- Lacey, J.V., A. Kreimer, S. Buys, P.M. Marcus, C. Chang, M.F. Leitzmann, R.N. Hoover, P.C. Prorok, C.D. Berg, P. Hartge. 2009. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer.* 9:84.
- Lee, D.H., D.R. Jr Jacobs, M. Porta. 2009. Hypothesis: a unifying mechanism for nutrition and chemicals as lifelong modulators of DNA hypomethylation. *Environ. Health Perspect.* 117(1):1799–1802.
- Leotsinidis, M., A. Alexopoulos, E. Kostopoulou-Farri. 2005. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors. *Chemosphere.* 61(1):238–247.
- Llorca, M., M. Farre, Y. Pico, M. Lopez Teijon, J.G. Álvarez, D. Barcelo. 2010. Infant exposure of perfluorinated compounds: Levels in breast milk and commercial baby food. *Environ. Int.* 36(1):584–592.
- López, E., S. Figueroa, M.J. Oset, M.P. Gonzalez. 2003. Apoptosis and necrosis: two distinct event induced by cadmium in cortical neurons in culture. *Br. J. Pharmacol.* 138 (1): 901–911.
- Luzio, A., S.M. Monteiro, A.A. Fontainhas-Fernandes, O. Pinto-Carnide, M. Matos, A.M. Coimbra. 2013. Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Aquat. Toxicol.* 128–129(1):183–189.
- Mancini, D.N., D.I. Rodenhiser, P.J. Ainsworth, F.P. O'Malley, S.M. Singh, W. Xing, T. Archer. 1998. CpG methylation within the 5' regulatory region of the

- BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene*. 16(1):1161–1169.
- Marsit, C.J., M.R. Karagas, H. Danaee, M. Liu, A. Andrew, A. Schned, H. Nelson, K. Kelsey. 2006. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 27(1):112–116.
- Mass, M.J., L. Wang. 1997. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat. Res.* 386(1): 263–277.
- Mata, L., L. Sánchez, M. Calvo. 2003. Mercurio en leche. *Rev Toxicol.* 20(1):176–181.
- McVeigh, G.E., P.B. Allen, D.R. Morgan, C.G. Hanratty, B. Silke B. 2001. Nitric oxide modulation of blood vessel tone identified by arterial waveform analysis. *Clin. Sci.* 100(1): 387–393.
- Morcillo, P., M. Esteban, A. Cuesta. 2016. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere*. 144(1):225–233.
- National Cancer Institute (NCI). 2017. Breast Cancer-Health Professional Version. Recuperado el 15 Octubre de 2017 de: <https://www.cancer.gov/types/breast/hp>
- Namihira, D., L. Saldivar, N. Pustilnik, G.J. Carreon, M.E. Salinas. 1993. Lead in human blood and milk from nursing women living near a smelter in México City. *J. Toxicol. Environ. Health.* 38(1); 225–232.
- O'Doherty, A.M., S.W. Church, S.E. Russell, J. Nelson, I. Hickey. 2002. Methylation status of oestrogen receptor- α gene promoter sequences in human ovarian epithelial cell lines. *Br. J. Cancer.* 86(2): 282–284.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2016. Cáncer de mama: prevención y control. Factores de riesgo del cáncer de mama. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html>
- Onishchenko, N., N. Karpova, F. Sabri, E. Castren, S. Ceccatelli. 2008. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J. Neurochem.* 106:1278–1287.

- Ortega García, J.A. 2004. Ataques al ecosistema de la lactancia. *Pediatric Environmental Health Speciality Unit*. Disponible en: <http://www.pehsu.org/az/az.htm> [ultimo acceso: 24 Agosto 2017].
- Osorio Saldívar, L., A. Tovar, T. Fortoul van der Goes. 1997. Cadmio. En: Albert Palacios L. (ed). *Introducción a la toxicología ambiental*. América. Metepec; ECO. Capítulo 13 pp. 211–226.
- Osorio Saldívar, L.; A. Tovar, T. Fortoul van der Goes. 1997. Plomo. En: Albert Palacios L. (ed). *Introducción a la toxicología ambiental*. América. Metepec; ECO. Capítulo 11 pp. 177–196.
- Palminger, Hallen I., L. Jorhem, B.J. Lagerkvist, A. Oskarsson. 1995. Lead and cadmium levels in human milk and blood. *Sci. Total Environ.* 166(1):149–155.
- Patterson, K., L. Molloy, W. Qu, S. Clark. 2011. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *J. Vis. Exp.* 56(1):3170.
- Peña-Rosas, J.P., F.E. Viteri. 2009. Effects and safety of preventive oral iron or iron+folic acid supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.*4: DOI:10.1002/14651858.CD004736.pub3.
- Pilsner, J.R., A.L. Lazarus, D.H. Nam, R.J. Letcher, C. Sonne, R. Dietz, N. Basu. 2010. Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the luminometric methylation assay: A sensitive method to study epigenetics in wildlife. *Mol. Ecol.* 19(1):307–314.
- Pugarch, S., T. Clarkson. 2009. Prenatal mercury exposure and postnatal outcome: clinical case report and analysis. *Clin. Toxicol.* 47(4): 366–370.
- Pronczuk, J., G. Moy, C. Vallenias. 2004. Breast milk: an optimal food. *Environ. Health Perspect.* 112(13):A722–A723.
- Pruss Ustun, A., C. Corvalan. 2006. Preventig disease through healthy enviroments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. *World Health Organization.* 12 (2) 1:106.
- Ray, P., A. Yosim, R. Fry. 2014. Incorporating epigenetic data into the risk assessment process for the toxic metals arsenic, cadmium , chromium, lead, and mercury: strategies and challenges. *Front. Genet.* 16(5):201
- Ribble D., N.B. Goldstein, D.A. Norris, Y.G. Shellman. 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol.* 5:12.

- Risso-De Faverney, C., N. Orsini, G. De Sousa, R. Rahmani. 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 69, 247–258
- Rossipal, E., M. Krachler. 1998. Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. *Nutr. Res.* 18: 11–24.
- Santoyo, M.M., C.R. Flores, A.L. Torres, K. Wrobel, K. Wrobel. 2011. Global DNA methylation in earthworms: A candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments. *Environ. Pollut.* 159(1):2387–2392.
- Schuurs, A. 1999. Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *J. Dent.* 27(1):249–256.
- Secretaria de Salud (SS). 2017. Cáncer de la mujer, información estadística. Recuperado el 12 de octubre del 2017 de: http://cnegrs.salud.gob.mx/contenidos/Programas_de_Accion/CancerdeLaMujer/InfEstad.html
- Sen, A., N. Heredia, M.C. Senut, S. Land, K. Hollocher, X. Lu, O. Dereski, D. M. Ruden. 2015. Multigenerational epigenetic inheritance in humans: DNA methylation changes associated with maternal exposure to lead can be transmitted to the grandchildren. *Sci. Rep.* 5(1):1–10.
- Servicio Geológico Mexicano. 2016. Panorama minero del estado de Baja California Sur. Recuperado el 20 de septiembre del 2017 de: http://www.sgm.gob.mx/pdfs/BAJA_CALIFORNIA_SUR.pdf
- Shi, H., L.G. Hudson, K.J. Liu. 2004. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 37(5): 582–598.
- Smeester, L., J.E. Rager, K.A. Bailey, X. Guan, N. Smith, G. Garcia-Vargas et al. 2011. Epigenetic changes in individuals with arsenicosis. *Chem. Res. Toxicol.* 24(1):165–167.
- Sternowsky, H.J., B. Moser, D. Szadkowsky. 2002. Arsenic in breast milk during the first 3 months of lactation. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 205(1):405–409.
- Stoltzfus, R., M. Dreyfuss. 1998. Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anaemia. Washington, DC, ILSI Press. Recuperado el 15 Septiembre del 2017: http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines_for_Iron_supplementation.pdf

- Tellez Plaza, M., W.Y. Tang, Y. Shang, J.G. Umans, K.A. Francesconi, W. Goessler, M. Ledesma, M. Leon, M. Laclaustra, J. Pollak, E. Guallar, S.A. Cole, M.D. Fallin, A. Navas-Acien. 2014. Association of global DNA methylation and global DNA hydroxymethylation with metals and other exposures in human blood DNA samples. *Environ. Health Perspect.* 122(9):946–954.
- Thomas, D.J., S.B. Waters, M. Styblo. 2004. Elucidating the path-way for arsenic methylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198(1):319–326.
- United Nations Children's Fund (UNICEF), México. Recuperado el 01 de agosto del 2016 de: https://www.unicef.org/mexico/spanish/noticias_33795.htm
- Ushijima, T., N. Watanabe, E. Okochi, A. Kaneda, T. Sugimura, K. Miyamoto. 2003. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res.* 13(1):868–874.
- Ushijima, T. 2005. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer.* 5(1): 223–231.
- Wack, R., E. Lien, D. Taft. 1997. Electrolyte composition of human breast milk beyond the early postpartum period. *Nutrition.* 13(1): 774–777.
- Wang, S., X. Shi. 2001. Molecular mechanism of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 222(1):3–9.
- Wong C.M., D.L. Anderton, A. Smith, M.A. Wing, M.C. Greven, K.F. Arcaro. 2010. Quantitative analysis of promoter methylation in exfoliated epithelial cells isolated from breast milk of healthy women. *Epigenetics.* 5(7):645–55.
- World Health Organization (WHO). *Minor and Trace Elements in Breast Milk, Report of a Joint WHO/IAEA Collaborative Study (1989).* WHO, Geneva.
- World Health Organization (WHO). *Global targets 2025. Breastfeeding. The goal.* Recuperado el 11 de marzo de 2016 de: http://www.who.int/nutrition/globaltarget2025/infographic_breastfeeding.pdf?ua=1
- World Health Organization, (WHO). 1992. Cadmium in Environmental Health Criteria 134. WHO, Geneva.
- World Health Organization, (WHO). 1990. Methylmercury. In: *Environmental Health Criteria 101.* WHO, Geneva.

- World Health Organization (WHO). 1996. Trace elements in human nutrition and health. WHO, Geneva.
- World Alliance for Breastfeeding Action (WABA) & International POPs Elimination Network (IPEN). 2004. Working Together for a Toxic- Free Future. Recuperado el 06 de abril del 2017 de: <http://www.waba.org.my/whatwedo/environment/pdf/Joint.pdf>
- Wright, R.O., A. Baccarelli. 2007. Metals and neurotoxicology. *J. Nutr.* 137(1): 2809–2813.
- Yamawaki, N., M. Yamada, T. Kan-No. 2005. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19(1):171–181.
- Zhang, L. 2014. Variations in the chemical composition of human milk. En M. Guo, ed. *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*, Elsevier. First Edition. Cambridge. pp. 55–103.

12. ANEXOS

Anexo A: Consentimiento informado



Carta de consentimiento informado

1. Nombre del estudio y patrocinador:

Relación entre los niveles de PUFA y antioxidantes en leche materna de cuatro localidades expuestas a distintos niveles de contaminación química. Proyecto apoyado por...El estudio se llevara a cabo en hospitales públicos que cuenten con servicio de obstetricia en la Cd. de La Paz, Baja California Sur, por investigadores del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C y médicos asociados al proyecto.

2. Propósito del estudio

La estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo con el propósito de determinar la presencia de metales pesados (plomo, mercurio, cadmio) e insecticidas organoclorados (DDT y sus compuestos) en la leche de mujeres sudcalifornianas. Usted ha sido invitada a participar en este estudio porque es originaria de Baja California Sur. Estudiaremos la leche materna de mujeres sudcalifornianas y con residencia en el estado de Baja California Sur. La muestra será tomada en forma manual por las mismas madres a la semana después del nacimiento de su hij@. Al igual que usted, más de cien mujeres serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

3. Procedimientos

Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

- Le pediremos que nos proporcione una cantidad de 20 mL de leche materna, la cual se depositará en un recipiente que será facilitado por el equipo.
- Se le harán algunas preguntas sobre su alimentación, ambiente del hogar y laboral.
- El tiempo que esto tomará no será más de 20 minutos.

4. Posibles riesgos y molestias.

No habrá molestias ya que la toma será manual y por la misma paciente en área privada.

5. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

No recibirá un pago monetario por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted. Un posible beneficio de su participación en este estudio es que los resultados de las pruebas de laboratorio que le realizaremos le servirán para conocer su estado de salud. Además, los resultados de este estudio brindaran información relevante para el mejor manejo de personas como

usted para brindar información de gran utilidad para futuros programas de prevención primaria y secundaria del binomio madre e hijo.

6. Participación o retiro.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en el momento que lo desee no modificará de ninguna manera el que nosotros le brindemos los resultados hasta el momento recabados.

Su participación implica el responder una entrevista, se le pedirá responda sobre datos personales. Las entrevistas se llevan a cabo en forma individual y confidencial. Pudiera ser que dentro de las preguntas en el cuestionario o durante la entrevista, alguna de las preguntas le hiciera sentir incomoda, pero usted tiene todo el derecho de no responder a cualquier pregunta que le incomode. Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o largo del estudio a las personas encargadas del estudio.

7. Privacidad y confidencialidad.

La información que se obtenga como parte del estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla (nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales serán guardados por separado para mantener confidencialidad de sus respuestas a los cuestionarios y de los resultados de sus pruebas clínicas. Sus datos personales, cuestionarios y resultados serán guardados en un archivero bajo llave en las oficinas del CIBNOR. Solo el equipo de investigación tendrá acceso a su información.

El equipo de investigadores y el médico que le realice el examen clínico, sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información sobre usted o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Solo proporcionaremos su información si fuera necesario proteger sus derechos o bienestar (por ejemplo si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia) o si lo requiere la ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarla no estará vinculada con la información que nos proporcione en la entrevista ni con los resultados del estudio de gabinete o laboratorio. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en muestras de base de datos. Guardaremos toda su información en base de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida 5 años después de concluir el estudio.

8. Personal de contacto para duda y aclaraciones.

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 20:00 hrs, de lunes a viernes con el Dr. Ramón Gaxiola Robles al celular 6123485229 o con la Dra. Zazil Flores al celular 6121418373 que son los médicos responsables de la investigación o al teléfono 1238500 en el Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste S.C

Km 1 Carretera a San Juan de la Costa "EL COMITAN" Apdo. Postal 128 La Paz, BCS 23097, México.

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en que consiste este estudio, además que he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe

No autorizo

Si autorizo participar en el estudio y proporcionar muestras de leche que se emplearan en el laboratorio para los estudios pertinentes.

Nombre del participante

Firma del participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación,

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del investigador

Fecha

Firma del testigo

Mi firma como testigo certifica que la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre del testigo

Firma del testigo

Fecha

Anexo B: CUESTIONARIO PARA MUJERES DONADORAS DE LECHE

Datos de la mujer donadora de leche	
Nombre	
Fecha y lugar de nacimiento	
Peso	
Talla	
Domicilio	


Preguntas:	Si	No
1. ¿En los últimos 5 años ha viajado o residido en otro lugar al que ocupa ahora?		
3. ¿Ha estado embarazada antes?		
4. ¿Cuántas veces ha estado embarazada (incluyendo esta vez)? 1, 2, 3, 4, 5 o mas		
5. Fecha de su ultimo parto, malparto o aborto:		
7. ¿Ha pensado amamantar a este bebe?		
8. ¿Ha amamantado a sus otros hijos? ¿Por cuánto tiempo?		
10. ¿Está en alguna dieta especial? Cuál:		
11. ¿Hay algunos alimentos que limita, evita o no come? Cuales:		
13. ¿Con que frecuencia come usted pescado: <i>Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.</i>		
14. ¿Con que frecuencia come usted mariscos: <i>Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.</i>		
15. ¿Con que frecuencia come leche/queso de cabra: <i>Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.</i>		
16. Consume algunos de estos productos:		
<i>Vitaminas prenatales</i>		
<i>Otras vitaminas/minerales</i>		
<i>Pastillas con hierro</i>		
<i>Aceite de pescado, omega 3</i>		
<i>Laxantes</i>		
<i>Medicamentos sin prescripción médica (aspirina, tylenol, etc)</i>		
<i>Ninguno</i>		
<i>Otros</i>		
<i>Remedios caseros</i>		
17. Presenta alguna de estas condiciones:		
<i>Alta azúcar en la sangre</i>		
<i>Alta presión de la sangre</i>		
<i>Bajo hierro en sangre</i>		
<i>Diabetes</i>		
<i>Acidez</i>		
<i>Enfermedades renales</i>		
<i>Estreñimiento</i>		
<i>Ninguna</i>		

<i>Otra</i>		
18. ¿Fuma, o alguien de la casa fuma?		
19. ¿Donde trabaja? Casa		
<i>Oficina</i>		
<i>Agrícola</i>		
<i>Comercio</i>		
<i>Industria</i>		
<i>Taller (coches, pintura, eléctrico)</i>		

Anexo C: Cromatogramas secuencias

File: 7Met_BRCAF.ab1 Run Ended: 2017/6/12 21:8:57 Signal G:1832 A:1500 C:74 T:2097
 Sample: 7Met_BRCAF Lane: 15 Base spacing: -15.016356 109 bases in 1418 scans Page 1 of 1

CG C TTT GTG TAT GG A A GT GT GGG ATTAT AGATAAATAAAATTGTGATTGTGGTGTGAGTTTGTGAGATTTTTGGATGGGGATAGGTTGTGGGGTTTTTAGA



File: 7Met_BRCAR.ab1 Run Ended: 2017/6/12 21:8:57 Signal G:62 A:635 C:938 T:545
 Sample: 7Met_BRCAR Lane: 23 Base spacing: -15.016356 115 bases in 1450 scans Page 1 of 1

CCCCAAA T CT CA CA A CT CACCCACACAATCACAAATTTAATTTATCTATAATTCCACAC TTTTCCATTACCACAAAAACCAAAAAACTACCGCTAAACAACAACCTCTCCA





Figura 31. Cromatograma correspondiente a la secuencia positiva para metilación, donante 7.

File: 32Met_BRCAF.ab1 Run Ended: 2017/6/12 21:8:57 Signal G:2032 A:1588 C:77 T:2300
 Sample: 32Met_BRCAF Lane: 11 Base spacing: -15.016356 108 bases in 1417 scans Page 1 of 1

TG C CTT GTG TAT GG A A GT GT GGG ATTATAGATAAATAAAATTGTGATTGTGGTGTGAGTTTGTGAGATTTTTGGATGGGGATAGGTTGTGGGGTTTTTAGA



File: 32Met_BRCAR.ab1 Run Ended: 2017/6/12 21:8:57 Signal G:72 A:875 C:1357 T:829
 Sample: 32Met_BRCAR Lane: 19 Base spacing: -15.016356 112 bases in 1460 scans Page 1 of 1

CCCCAAA T CT CA CA A CT CACCCACACAATCACAAATTTAATTTATCTATAATTCCACAC TTTTCCATTACCACAAAAACCAAAAAACTACCGCTAAACAACAACCTCTC




Figura 32. Cromatograma correspondiente a la secuencia positiva para metilación, donante 32.