

Utilidad del bandeo cromosómico con la enzima ALU I para la identificación de zonas metiladas en cáncer de mama.

Alicia Rojas-Atencio, Leonard Yamarte, Karelis Urdaneta, Marisol Soto-Álvarez, Francisco Álvarez Nava, Jenny Cañizales, Maribel Quintero, Raquel Atencio y Richard González.

Instituto de Investigaciones Genéticas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: cáncer de mama, metilación del DNA, enzima de restricción ALU I, bandeo cromosómico.

Resumen. El cáncer es un conjunto de trastornos que comparten la característica común de un crecimiento celular descontrolado, teniendo la facultad de comenzar en las células, generando dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación celular (tumor o neoplasia) y la capacidad invasiva de estas células, proliferando y colonizando otros tejidos (metástasis). La metilación del DNA es un proceso epigenético que recurrentemente ha sido involucrado como un factor importante en la patogenia de esta enfermedad el cual participa en la regulación de la expresión génica directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura “cerrada” de la cromatina. El objetivo de este trabajo fue determinar regiones hipermetiladas en muestras de extendidos cromosómicos mediante la utilización de la endonucleasa de restricción *Alu I* y relacionar estas regiones con sitios de localización de genes supresores de tumores relacionados con el cáncer de mama. Se analizaron 60 muestras de sangre periférica de mujeres con diagnóstico de cáncer de mama a las cuales se les realizó cultivo celular; los extendidos cromosómicos fueron teñidos con Giemsa previamente digeridos con la enzima *Alu I*. Se observaron cromosomas con regiones centroméricas y no centroméricas teñidas en el 37% de los casos, comprobándose que en el 95,46% de los casos existen genes asociados descritos, como metilados en cáncer de mama. Ejemplo de ellos son los localizados en los cromosomas 1q, 2q, 6q, y regiones centroméricas no teñidas usualmente como en los cromosomas 3, 4, 8, 13, 14, 15, y 17. Se sugiere la importancia de esta técnica ya que permite la visualización total del genoma, pudiendo localizar genes metilados relacionados con cáncer de mama y, de esta manera dirigir la terapia de forma específica, logrando una mejor respuesta terapéutica.

Utility of chromosome banding with ALU I enzyme for identifying methylated areas in breast cancer.

Invest Clin 2012; 53 (4): 331 - 341

Key words: breast cancer, methylation of DNA, restriction enzymes ALU I, chromosome banding.

Abstract. Cancer is a group of disorders characterized by uncontrolled cell growth which is produced by two successive events: increased cell proliferation (tumor or neoplasia) and the invasive capacity of these cells (metastasis). DNA methylation is an epigenetic process which has been involved as an important pathogenic factor of cancer. DNA methylation participates in the regulation of gene expression, directly, by preventing the union of transcription factors, and indirectly, by promoting the "closed" structure of the chromatin. The objectives of this study were to identify hypermethylated chromosomal regions through the use of restriction *Alu I* endonuclease, and to relate cytogenetically these regions with tumor suppressive gene loci. Sixty peripheral blood samples of females with breast cancer were analyzed. Cell cultures were performed and cytogenetic spreads, previously digested with *Alu I* enzyme, were stained with Giemsa. Chromosomal centromeric and not centromeric regions were stained in 37% of cases. About 96% of stained hypermethylated chromosomal regions (1q, 2q, 6q) were linked with methylated genes associated with breast cancer. In addition, centromeric regions in chromosomes 3, 4, 8, 13, 14, 15 and 17, usually unstained, were found positive to digestion with *Alu I* enzyme and Giemsa staining. We suggest the importance of this technique for the global visualization of the genome which can find methylated genes related to breast cancer, and thus lead to a specific therapy, and therefore a better therapeutic response.

Recibido: 05-03-2012 Aceptado: 20-09-2012

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la causa más común de mortalidad por cáncer en mujeres a nivel mundial (1). En Venezuela constituye la segunda causa de muerte por cáncer en nuestras mujeres. (2). El cáncer de mama al igual que muchos otros tiene un origen multifactorial en el que intervienen, la activación de oncogenes, la inactivación de genes supresores tumorales, así como la disfunción de los genes reparadores del DNA (3). Sumado a las alteraciones genéticas, se están evidenciando cambios en el DNA ge-

nómico tales como los patrones de metilación anormal de citosinas que ocurren dentro de los dinucleótidos CpG; teniendo en cuenta que aproximadamente el 50% de los genes humanos presentan estos dinucleótidos en sus secuencias reguladoras 5% las cuales son conocidos como islas CpG, este representa un fenómeno importante para la aparición de los procesos cancerosos (4).

La detección de esta malignidad en etapas tempranas de su desarrollo es la clave para que los tratamientos que se apliquen sean más eficaces. Sin embargo, un 30% de las mujeres con cáncer de mama lo-

calizado desarrollan enfermedad metastásica y, por otro lado, alrededor de 15% de los tumores invasivos, no son diagnosticados utilizando la mamografía, principal herramienta diagnóstica para etapas iniciales (5-6). Otras herramientas pronósticas utilizadas incluyen los marcadores como el CAE y el CAE 15,30, utilizados para el monitoreo del cáncer de mama, sin embargo hoy en día menos utilizados por su baja sensibilidad y especificidad (7-8).

Nuevas investigaciones apuntan hacia la aparición de promotores de genes hipermetilados que asoman como una herramienta moderna para la identificación de marcadores genéticos que, en un futuro podrán ser utilizados como blancos terapéuticos para la resolución de este tipo de enfermedad. Un ejemplo de ellos son los genes supresores p16, APC, y el RASSF1A, en los cuales se han encontrado frecuencias de metilación similares entre un 40 y un 53%, constituyéndose en un elemento importante en la detección molecular de este tipo de tumor (9-13). La metilación del DNA es el mecanismo epigenético conocido más antiguo y más estable que se correlaciona con la represión génica. Esta modificación consiste en la adición enzimática de un grupo metilo al residuo de citosina de la cadena del DNA. Esta reacción es mediada por las DNA-metiltransferasas (DNMTs) en presencia del donador de metilos (S-adenosilmetionina, SAM), resultando 5-metilcitosina. En los mamíferos la metilación ocurre en los dinucleótidos CpG (citosinas que son inmediatamente seguidas de una guanina). En el genoma humano existen 2.8×10^7 dinucleótidos CG susceptibles de ser metilados y de ellos 70-80% normalmente se encuentran metilados. Fisiológicamente se observa una densa metilación en regiones específicas cromosómicas (secuencias repetitivas inter o intragénicas, satelitales y centrosómicas) que contienen gran cantidad de dinucleótidos CG, mientras que la

metilación es nula en las islas de CpG (zonas ricas en CG) de las secuencias de los promotores génicos. Muchos genes pueden ser inactivados en un solo tipo de cáncer a través de la metilación de estos promotores (14). La enzima ALU I es una endonucleasa de restricción la cual reconoce las secuencias ALU, estas son secuencia de DNA altamente repetidas que cubren aproximadamente el 10% del genoma humano siendo su distribución heterogénea; están presentes en aproximadamente 300.000-600.000 copias, representando un 3%-6% del genoma, encontrándose principalmente en la regiones promotoras de los genes relacionados con cáncer. La enzima ALU I corta el DNA cromosómico a lo largo de los ejes. En citogenética, en los patrones de bandeo inducido por esta enzima se observa la distribución de los patrones de una secuencia altamente repetitiva del DNA Satélite; su sitio específico de reconocimiento es en las uniones citosina-guanina (15, 16), al cortar la enzima se visualizarían, luego de la tinción bloques claros, los cuales corresponderían a áreas no metiladas (17-18); Xiang y col. en 2011, caracterizaron la metilación de las regiones ALU de pacientes con cáncer gástrico, observando más del 80% de áreas metiladas (19). Aprovechando esta propiedad, se planteó la utilización de la enzima ALU I, colocada sobre una lámina portaobjeto contentivo de una muestra cromosómica de pacientes con cáncer de mama; al estar metilada, esta área se visualizaría como zonas oscuras indicando la presencia de regiones hipermetiladas en el genoma de pacientes con cáncer de mama.

MATERIALES Y MÉTODO

Se analizaron 60 muestras de sangre periférica, de pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, referidas del Servicio de Oncología Quirúrgica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, Ve-

nezuela y 30 pacientes sanos como control para el bandeo con la enzima ALU I. El proyecto fue aprobado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Genéticas de la Universidad del Zulia, y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los pacientes. La muestra utilizada fue de 2 mL de sangre periférica. Como criterio de inclusión se estableció el que las pacientes no hubiesen recibido quimioterapia, ni radioterapia. Las muestras de sangre periférica se procesaron para cultivo cromosómico, siguiendo la técnica de Yunis descrita en 1981(20). Se utilizó técnica de bandeo G (21) y con la enzima ALU I, siguiendo el protocolo de preparación de la enzima recomendado por la casa fabricante (Promega); la técnica de bandeo utilizada para ALU I, fue la descrita por Kaelbling y col. y Verman y Babu en 1995 (22-23). Se analizaron 20 metafases por pacientes en ambas técnicas; los cariotipos fueron descritos de acuerdo a la versión referida en el ISCN 2005 (24). Las regiones hipermetiladas localizadas en los cromosomas, según la región teñida, fueron llevadas a la base de datos del GenBank (25) para identificar los genes comprometidos en la región metilada.

RESULTADOS

Se analizaron los cariotipos de sangre periférica de las 60 pacientes con diagnóstico de cáncer de mama, de los cuales en 45(75%) se clasificaron como carcinoma in situ, el resto como carcinoma infiltrante, histológicamente fueron definidos en un 86% como carcinoma ductal y 14% como lobulillares. La edad promedio de la muestra de la población fue 51,13 años. Se comprobó la presencia de anomalías numéricas y estructurales en 23 de los casos (38,33%), 19 de los casos (20,94%), correspondieron a anomalías numéricas y en 4 de ellos se presentó una combinación de anomalías numéricas y estructurales que correspondie-

ron a una delección del brazo largo del cromosoma 11, traslocaciones cromosómicas que involucraron al cromosoma 1 con el cromosoma 18 y el 20, y una traslocación 17,20 (17,39%). Los restantes 37 casos (61,67%) resultaron normales. Las anomalías numéricas correspondieron a monosomías de los cromosomas X, 1, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 y 22; dentro de las trisomías estas correspondieron a los cromosomas 11 y 18 (Tabla I).

Se realizó la digestión de las muestras cromosómicas de los casos y los controles, observándose en los controles patrones normales de digestión, los cuales coinciden con la presencia de regiones centroméricas teñidas en los cromosomas 1, 9 y 16. En las pacientes con cáncer de mama se observó que 22 de ellas (36,66%) presentaron regiones anormalmente teñidas, solo en una de las regiones metiladas observadas no se encontró asociación en la literatura con genes metilados en cáncer de mama (Tabla II), lo que resultó altamente significativo. Ejemplo de ellas se observan en los cromosomas 2 (2q23-2q32.2) (Fig. 1a); así como también se observaron cromosomas con una banda Centromérica heterocromática muy pronunciada en los cromosomas 3 y 8 (Fig. 1b y 1c).

DISCUSIÓN

Las anomalías cromosómicas en cáncer de mama han sido encontradas en más de un 80% de los casos y ha constituido uno de los hallazgos importantes reportados con valor pronóstico en esta patología (26-27). En este estudio se encontró que solo el 38,33% de las pacientes presentó algún tipo de anomalía cromosómica. Este hecho se debe a que la muestra utilizada para este trabajo fue sangre periférica y no tejido tumoral, pudiendo corresponder estas anomalías a células tumorales circulantes en sangre periférica, relacionadas con la

TABLA I
ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS ENCONTRADAS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Caso	Edad	Cariotipo
1	46 a	32~45, XX, -6, -7, -8, -9, -13, -14, -15, -16, -17, -19, -19 [8], 46, XX [2]
2	46 a	39~45, X, -X, -1, -2, -3, -5, -8, -12, -14, -15, -19, -21, -22, [5], 46, XX [7]
3	51 a	39, XX, -3, -6, -8, -8, -13, -14, -20 [1], 46, XX [21], poliploidía [2]
4	58 a	45~47, XX, -1, +8, +12, +19 [4], 46, XX [11]
5	35 a	43~45, X, -X, -2, -4, -8, -9, -10, 17, -19, -21, -22 [7], 46XX [2]
6	67 a	32~45, XX, -6, -7, -13, -17, -18, -21, -22, -22, +t(17q; 20q) [5] 46, XX [14]
7	57 a	39~52, XX, -1, -2, -4, -5, -7, -9, -11, -13, -15, -16, 18, -21, +1, +2, +5, +6, +9, +12, +13, +14, +18, +20, +21 [5], 46, XX [8]
8	59 a	44, X, -X, -18, + t(1; 18)(q23;q21) [2], 46, XX [15]
9	45 a	29~45, X, -X, -1, -2, -3, -7, -9, -9, -13, -13 [4], 46, XX [15]
10	67 a	32~46, XX, -1, -2, -3, -7, -9, -11, -13, -14, -15, -16, -20, -21, -22, [8], 46, XX [14]
11	55 a	32~45, XX, -3, -9, -6, -7, -11, -12, -12, -20 [6], + t(1; 20)(q15, q17), 46, XX [14]
12	44 a	43~46, XX, -13, -16, -18, [3], 43, XX, -13, -16, -17, -19, + mar [1], 46, XX [16]
13	37 a	45, XX, -7, [3]/ 44, XX, +11, -17, -18 [4], 46, XX [13]
14	44 a	42, XX, -18, -20, -22, [3], 42, X, -X, -6, -7, -9 [2], 44, X, -X, -1 [2], 41, XX, -6, -13, -14, -15, -21 [3], 46, XX [12]
15	85 a	45, XX, -11 [4], 44, XX, +18, -22, -22 [2], 46, XX [14]
16	57 a	43, XX, -18, -20, -22 [2], 46, XX, +18, -22 [3], 42, XX, -7, -11, -15, -16, [2], 42, XX, -15, -22, -22, + del(11)(q23) [4], 46, XX [9]
17	73 a	45, XX, -20 [15]
18	59 a	38~46, XX, -1, -4, -12, -13, -16, -17, -20 [4], 43, XX, -13, -16, -17, -19, + mar, [1], 46, XX [10]
19	45 a	46, XX, del (16)(p23) [3], 46, XX [17]
20	62 a	41~45, XX, -5, -7, -8, -9, -21 [5], 46, XX [7]
21	47 a	43~45, XX, -7, -13, -14 [3], 47, XX, + mar [2], 46, XX [17]
22	68 a	43~45, XX, -8, -10, -11 [3], 46, XX [11], 39~45, X, -X, -4, -8, -11, -12, -14 [3], 46, XX [10]
23	50 a	39~45, XX, -1, -3, -7, -14 [5], 46, XX [15]

presencia de micrometastasis (28). Por otro lado, una abrumadora cantidad de evidencias recientemente publicadas han demostrado que la hipermetilación de islas CpG está implicada en la pérdida de expresión de una gran cantidad de genes responsables de la aparición de cánceres (29-33). Esta

metilación involucra principalmente a los promotores de genes relacionados con procesos cancerosos, lo cual ofrece ventajas cuando son comparados con otras alteraciones del DNA; estos eventos podrían proveer marcadores biológicos ideales para el diagnóstico molecular y detección temprana del

TABLA II
ÁREAS CROMOSÓMICAS METILADAS Y SU ASOCIACIÓN CON CÁNCER DE MAMA

Nº casos con genes metilados	Área cromosómica metilada	Gen comprometido	Estudios relacionados con ca de mama
2	2q23-q25	Factor de transcripción E2F, N-myc interactor	Carcinogénesis. 2009 Feb; 30(2):269-74
1	2q32-qter	Gen de diferenciación neurogénica	British Journal of Cancer (2005) 93, 1029-1037
1	3q12-q16	Subfamilia de receptores nucleares	J Clin Invest. 2011 Aug; 121(8):3220-32.
3	6q15- q25	Proteína asociada a la caspasa B mitógeno activador de proteína quinasa	Exp Mol Med. 2012 Feb 15. [Epub ahead of print]
5	6q25-qter	Genes receptores de estrógenos	Breast Cancer Res 2007; 94: R57
1	1q25-1q32	Región promotora traslocada para activar el oncogen MET	Br J Cancer. 2006 Nov 20; 95:1439-47
1	1q32-qter	Subfamilia de genes receptores nucleares	Cancer Research 1999; 59: 6091-6096
1	18q11-q25	Gen de la interfase microfibrilar de la elastina y factor de inducción de muerte celular	Molecular Cancer 2010, 9:51, 1-13
2	8p12-13	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos	BMC cancer 2006; 245: 1471-84
2	17q12-q23	Gen neurofibromatosis, Her 2 neu	Histol Histopathol. 2012 Mar; 27(3):377-85.
1	13q14-qter	Receptor 6 del ácido lisofosfatídico	Sin reporte asociación con ca de mama
2	16q12-q22	Factor de transcripción 1 proteína dedos de zinc	Molecular Cancer 2010, 9:51, 1-13

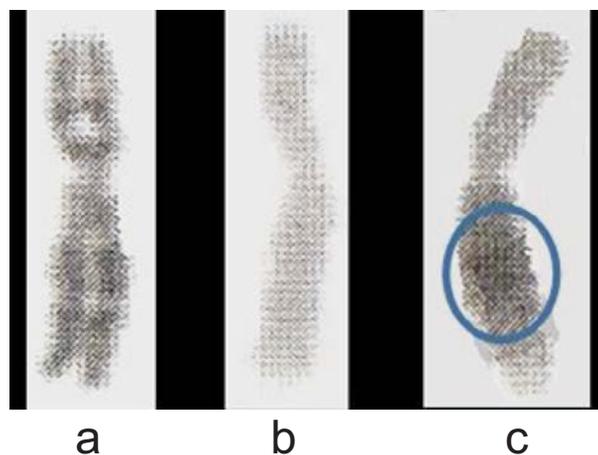


Fig 1a. Cromosoma 2 (a) con bandas G. (b) Normal *Alu I* y (c) presencia de región no Centromérica marcada 2q23q32.

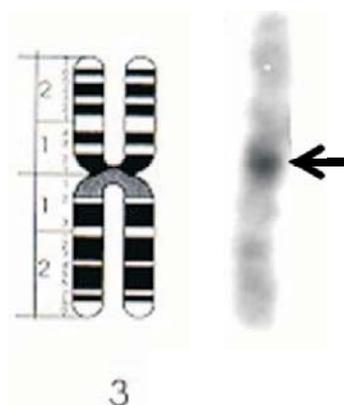


Fig. 1b. Cromosoma 3 Con región metilada a nivel de 3q12q13 (flecha).

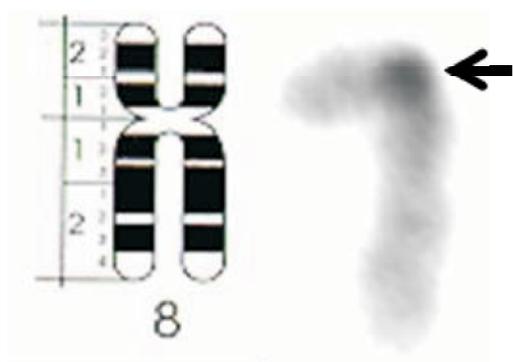


Fig. 1c. Cromosoma 8 con región metilada en 8p12q13 (flecha).

cáncer (1). Por otro lado, la utilización reciente de productos demetilantes en estos pacientes podría convertirse en la terapia más acertada y efectiva en estos estados de hipermetilación de promotores de genes implicados en cáncer (34-35). La utilización de enzimas de restricción para la identificación de zonas metiladas comenzó a utilizarse en la década de los 90. Mediante esa técnica la combinación del tratamiento con bisulfito y amplificación con PCR, resultaba en la conversión de residuos de citosina no metilados a timina y residuos de citosina metilados a citosina. Esta secuencia de metilación lleva a la creación de nuevos sitios de restricción enzimática; en estos casos se utilizó la enzima *Bst*UI (CGCG) (36, 37).

En este estudio se encontraron 22 regiones teñidas anormalmente luego de la digestión con la enzima *ALU* I; con excepción de uno de los casos, todos coincidieron con genes responsables de la aparición de cáncer de mama. Ejemplo de ello lo constituye la región heterocromática presente en el cromosoma 2, en el cual se han descrito una gran cantidad de genes asociados a algunas enfermedades importantes y con funciones muy específicas. En el encontramos genes para la anemia de Fanconi en el locus (2q16.1) o la enfermedad de Parkinson en el locus (2q22-q23); sin embargo, en la región del cromosoma 2 (2q23-q32.2) en la que obtuvimos metilación, actualmente, según la base de datos del Genbank (23), se ha encontrado un gen asociado con el cáncer de mama que pudieran estar siendo afectado por dicha metilación (38). El gen ATF-2 o Factor de Transcripción Activador 2 presente en el loci (2q31.1) es normalmente activado en respuesta a señales que convergen en la proteína-quinasa de estrés p38 y JNK. Este gen tiene diversos efectos en el crecimiento y progresión de tumores en mamíferos. (39) La ubicación del gen ATF-2 coincide con la región oscura que consideramos presenta metilación.

Otra de las zonas marcadas fue en el cromosoma 6 en la región (6q15-q25.3); en la región (6q25.1) se encuentra el gen *ERα* (*Estrogen Receptor α*), el cual se ha asociado en un 60-70% con el cáncer de mama cuando se encuentra metilado, aun cuando su promotor no se encuentra en la isla CpG existe una buena correlación con la pérdida de expresión del *ERα*, por lo cual podríamos sugerir que en este caso particular existe una relación entre la región marcada, gen *ERα* afectado por la metilación y la presencia del cáncer de mama en esta paciente. Teniendo en cuenta que el desarrollo y proliferación celular están reguladas en la mama normal por hormonas esteroideas (como estrógenos y progesterona) a

través de receptores específicos en los epitelios ductales y lobulillares, no sorprende que muchos tumores, en especial los de cáncer de mama, mantengan características de dependencia hormonal. Sin embargo, a medida que los tumores progresan adquieren una independencia del aporte de estas hormonas de modo que se alteran los mecanismos de control del crecimiento. Muchos tumores avanzados pierden la expresión de los receptores de estrógenos *ER* por la pérdida de heterocigosidad de la región (6q25). La pérdida de expresión de receptores hormonales, o su alteración, se considera de mal pronóstico en el cáncer de mama (11, 12, 40-42). En el presente estudio se encontraron 5 pacientes con probables áreas metiladas que involucran este gen (Tabla II). Así mismo, es importante señalar que a nivel de la región 1q24-q32, se ha localizado genes asociados con diferentes tipos de cáncer entre los cuales se encuentra el cáncer de mama. Mención especial merece la región 1q32, donde han sido localizados genes relacionados con la superfamilia de los genes RAS y genes responsables de otros tipos de cáncer como los gliomas malignos. (43). En cuanto al cáncer de mama se han relacionado alrededor de 11 tipos de genes localizados en el cromosoma 1 relacionados con progresión de la enfermedad, principalmente en cánceres de mama grado III (44-46).

Por otro lado, Letessier y col. en el 2006 (47), reportaron la asociación de genes localizados en los cromosomas 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, y 20q13 con impacto pronóstico en cáncer de mama. Más recientemente los cambios de metilación en el DNA han sido asociados con progresión de la enfermedad (48). En este trabajo se encontraron zonas hipermetiladas en las regiones 8p12 (Fig. 1b) y 17q12. Recientemente se han encontrado nuevos genes metilados relacionados con cáncer de mama, EMELIN 2, (18p11.3), SALL 1

(16q12.1), DBCI (9q32-q33), FBLN2 (3p25.1), CIDE, (18p11.21) (41). En esta investigación se encontraron dos casos con área metilada en la región 16q12-q13 y un caso con área metilada en la región 18p11.-p15 (49).

En base a estos hallazgos se asume que el bandedo cromosómico con la enzima *ALU I* podría resultar una herramienta valiosa para la evaluación inicial de los pacientes con cáncer de mama, ya que permitiría visualizar de una manera general el genoma del individuo, observar las regiones metiladas que se presenten y dirigir la confirmación molecular de forma más específica. En un futuro permitiría dirigir terapias específicas a cada uno de los pacientes. Se sugiere la confirmación molecular de estas áreas metiladas que permitan corroborar estos hallazgos y, de esta manera, pueda ser utilizada como una técnica rutinaria en estos pacientes. Por otro lado, la utilización reciente de productos hipometilantes en la terapéutica de pacientes con cáncer, permitirá comprobar si son efectivos para eliminar la situación de hipermetilación de genes promotores relacionados con cáncer.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto Financiado por el CONDES-LUZ N° CC-1036-08.

REFERENCIAS

1. Buyru N, Altinisik J, Ozdemir J, Demokan S, Dalay N. Cancer Invest 2009; 27:307-312.
2. Ministerio Del Poder Popular Para La Salud (2007). Anuario de Epidemiología de 2006; Caracas-Venezuela.
3. Das PM, Singal, R. DNA methylation and cancer J Clin Oncol 2004; 22:4632-4642.
4. Widschwendter M, Jones, PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. Oncogene 2002; 21: 5462-5482.
5. Patrick L, Fitzgibbon S PL, Page DL, Weaver D, Thor AD. Prognostic factors in

- breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 966-978.
6. **Couch FJ, Weber BL.** Breast cancer; in Scriver CR, Beaudet AL, Slyws D, Valle D (eds): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, McGraw-Hill, 2001; 999-1031.
 7. **Muller, HM, Widdschwendter A, Fiegl H, Ivarsson, L, Goebel, G, Perkmann G.** DNA methylation in serum of breast cancer patients. An independent prognostic marker. Cancer Res 2003; 63: 7641-7645.
 8. **Bozcuk H, Uslu G, Pestereli E, Samur M.** Predictors of distant metastasis at presentation in breast cancer: a study also evaluating associations among biologicals indicators. Breast Cancer Res 2001; 68:239-248.
 9. **Roa S, Anabalón RL, Tapia EO.** Patrón de metilación génica en el cáncer de mama. Rev Méd Chile 2004; 132: 1069-1077.
 10. **Adonis RW, Aguayo GF, Cordero SE.** Evaluación de hipermetilación del gen p16INK4 alfa en cáncer escamoso de pulmón en pacientes chilenos. Rev Chile Enf Resp 2006; 22:7-12.
 11. **Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, Huan S.** Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. Breast Cancer Res 2007; 94:50-57
 12. **Gayatri S, Sameer M, Yi-hsin Y, Rajinder P, Priya H, Siddartha DG, Ranju R.** Prognostic relevance of promoter hypermethylation of multiple genes in breast cancer patients. Cell Oncol 2009; 31: 487-500.
 13. **Laird PW.** The power and the promise of DNA methylation markers. Nature Rev Genet 2003; 3:253-266.
 14. **Jones PA, Baylin SB.** The epigenomics of cancer. Cell 2007; 128:683-692.
 15. **Mezzanotte R, Ferrucci L, Vanni R, y Bianchi U.** Selective digestion of human metaphase chromosome by Alu I restriction endonuclease. J Histochem Cytochem 1983; 31: 553-556.
 16. **Bianchi M, S Bianchi NO, Pantelias GE, Wolf Y** The mechanism and pattern of banding induced by restriction endonucleases in human chromosomes. Chromosoma 1985; 91(2): 131-136.
 17. **Maniotis AJ, Vally-Nagy K, Karavitis J, Moses J, Boddipali V, Wang Y.** Chromatin organization measured by AluI restriction enzyme changes with malignancy and is regulated by the extracellular matrix and the cytoskeleton. Am J Pathol 2005; 166: 1187-1203.
 18. **Bickle TA, Krüger DH.** Biology of DNA restriction. Microbiol Rev 1993; 57: 434-450
 19. **Xiang S, Liu Z, Zhang B, Zhou J, Zhu BD, Ji JD.** Methylation status of individual CpG sites within Alu elements in the human genome and Alu hypomethylation in gastric carcinomas. BMC Cancer 2010; 17: 1-11.
 20. **Yunis J.** New chromosome techniques in the study of human neoplasia. Human Pathol 1981; 12:540-549.
 21. **Yunis J, Sanchez, O.** The G-banded prophase chromosomes of man. Human Genet; 1975; 2: 1-6.
 22. **Kaelbling M, Miller DA, Miller OJ.** Restriction enzyme banding of mouse metaphase chromosomes. Chromosoma. 1984; 90: 128-132.
 23. **Verma RS, Babu A.** Human Chromosomes Principles and Techniques. MC Graw-Hill, Inc. 1995; 2^{da} edición, p 235-240.
 24. **Shaffer L, Tommerup N.** International System for human cytogenetic nomenclature ISCN (2005). Ed. Karger. Publisher in collaboration with Cytogen Gen Res.
 25. Genbank.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/22538421?Report>
 26. **Rojas de Atencio A, Gonzalez L, Urdaneta K, Soto-Alvarez M, Prieto-Carrasquero M, Fulcadero W, Quintero M, Boscan A, Alvarez-Nava F.** Hallazgos citogenéticos en carcinoma ductal de mama. Invest Clin 1999; 40(3):179-190.
 27. **Pandis N, Idvall I, Bardi G, Jin V, Gurunova, Mertens F, Olsson H, Ingrar C, Mitelman F, Heim S.:** Correlation between karyotype pattern and clinicopathologic features in 125 breast cancer cases. Int J Cancer 1996; 66:191-196.
 28. **Hekimian K, Meisezahl S, Trompelt K, Rabenstein C, Pachmann K.** Epithelial cell dissemination and readhesion: Analysis of factors contributing to metastasis formation in breast cancer. International

- Scholarly Research Network (2012), 2012, Article ID 601810, 8 pages.
29. **Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E.** Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995; 81, 197-205.
 30. **Seung-Jin H, Young-Ho K, Young-Deok Ch, Ki-ouk M, Sang-Wook Ch, Mun-gan R.** Relationship between the extent of chromosomal losses and the pattern of CpG methylation in gastric carcinomas. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 790-805.
 31. **Szyfa M, Pakneshanb P, Rabbani S.** DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol* 2004; 68 (6): 1187-1197.
 32. **Tommasi S, Karm D, Wu X, Yen Y, Pfeifer G.** Methylation of homeobox genes is a frequent and early epigenetic event in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009; 1: 1-17.
 33. **Ramchandani S, Macleod AR, Pinard M, Von Hofe E, Szyf M.** Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:684-689.
 34. **Leslie MC, Bar-Eli M.** Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. *J Cell Biochem* 2005; 94: 25-38.
 35. **Gupta S, Campbell D, Dérillard D, Davis RJ.** Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1995; 267: 389-393.
 36. **Xiong Z, Laird P.** Cobra: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(12): 2532-2534.
 37. **Sadri R, Hornsby PJ.** Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 5058-5059.
 38. **Ozawa K, Sudo T, Soeda E, Yoshida MC, Ishii S.** Assignment of the human CREB2 (CRE-BP1) gene to 2q32. *Genomics* 1991; 10: 1103-1104.
 39. **Maekawa T, Shinagawa, T, Sano T, Sakuma T, Nomura, S, Nagasaki K.** Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Molec Cell Biol* 2007; 25: 1730-1744.
 40. **Mosselman S, Polman J, Dijkma R.** ER- β . Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53.
 41. **Clemons M, Goss P.** Mechanisms of disease: Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 276-285.
 42. **Majewska F, Kordek R, Krawczyk B.** Studies on the methylation status of CpG sequences located in promoters of selected tumor suppressor genes in breast cancer cells. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* 2006; 25:1025-1028.
 43. **F. Shimizu T, Katagiri M, Suzuki TK, Watanabe S, Okuno Y.** Cloning and chromosome assignment to 1q32 of a human cDNA (RAB7L1) encoding a small GTP-binding protein, a member of the RAS superfamily. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 77:261-263.
 44. **Riemenschneider M, Schges, M Wolter M, Reifenberger J, Bostro J, Kraus J, Schlegel U, Reifenberger G.** Amplification and overexpression of the *MDM4* (*MDMX*) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without *TP53* mutation or *MDM2* amplification. *Cancer Res* 1999; 59: 6091-6096.
 45. **Orsetti B, Nugoli M, Cervera N, Lasorsa L, Chuchana P, Rougé C, Ursule I, C.** Genetic profiling of chromosome 1 in breast cancer: mapping of regions of gains and losses and identification of candidate genes on 1q. *Br J Cancer* 2006; 95:1439-1447.
 46. **Mackay A, N, Fenwick K, Iravani M, Grigoriadis A, Dexter T.** A high-resolution integrated analysis of genetic and expression profiles of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 118:481-498.
 47. **Letessier A, Sircoulomb F, Ginestestier Ch, Cervera N, Monville F, Gelsi-Goyer V.** Frequency, prognostic impact and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12 and q13 amplifications in breast cancer. *BMC cancer* 2006; 245: 1471-1484.
 48. **Fernandez S, Snider K, Zhong Wu Y, Russo I, Plass Ch, Russo J.** DNA methyl-

- ation changes in human cell model of breast cancer progression. *Mut Res* 2010; 688: 28-35.
49. **Hill V K, Hesson LB, Dansranjavin T, Dalloashraf L, Bieche I, Vacher S, Tommasi S, Dobbins T, Gentle D, Euhus D, Lewis C, Dammann R, Ward RL, Minna J, Maher ER, Pfeifer GP, Latif F.** Identification of 5 novel genes methylated in breast and other epithelial cancers. *Mol Cancer* 2010; 9:51-64.