



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

**Determinación de factores y marcadores predictivos
para cáncer de mama. Estudio Piloto**

Tesis para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Córdova Serrano Mónica Lizzeth

Director de tesis: **Dr. Sergio Zarazúa Guzmán**

Codirector de tesis: **Dra. Andrea Guadalupe Rodríguez López**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

FECHA: JUNIO, 2024



UASLP-Sistema de Bibliotecas
Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Determinación de factores y marcadores predictivos para cáncer de mama. Estudio Piloto © 2024 por Mónica Lizzeth Córdova Serrano tiene licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Este proyecto se realizó en: *Laboratorio de Neurotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas* adscrito a la *Universidad Autónoma de San Luis Potosí*, *Laboratorio de Nanotecnología Aplicada en el área de CARIEM (Centro de Aplicación de la Radiación, Infrarroja, Energías Alternativas y Materiales)* de *Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT)* adscrito a la *Universidad Autónoma de San Luis Potosí* y *Centro de Investigación y Desarrollo Oncológico* en las instalaciones del *Centro Regional de Enfermedades Oncológicas (CREO)*, en el periodo comprendido entre *agosto 2022* y *diciembre 2023*, bajo la dirección del *Dr. Sergio Zarazúa Guzmán, Dra. Andrea Guadalupe Rodríguez López y Dra. Aida Catalina Hernández Arteaga*. El presente proyecto fue realizado con recursos propios de los investigadores.

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 003382. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 805547. Número de CVU: 1146003.

Los datos del trabajo titulado *Determinación de factores y marcadores predictivos para cáncer de mama. Estudio piloto* se encuentran bajo el resguardo del Laboratorio de Neurotoxicología de la Facultad de Ciencias Químicas que pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Solicitud de Registro de Tesis Maestría

San Luis Potosí SLP a Junio / 10 / 2024

Comité Académico

En atención a: Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Coordinadora General de Posgrados FCQ

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de tema de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: Determinación de factores y marcadores predictivos para cáncer de mama. Estudio Piloto, que desarrollará la estudiante: Mónica Lizzeth Córdova Serrano, bajo la dirección y/o Co-dirección de: Dr. Sergio Zarazúa Guzmán, Dra. Andrea Guadalupe Rodríguez López y Dra. Aida Catalina Hernández Arteaga.

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará estudios con seres humanos y muestras derivadas de los mismos.

No. de Registro Estatal: SLP/13-2022

Sí debido a que: Se trabajará con estudios con seres humanos y muestras derivadas.

No

No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

A T E N T A M E N T E



Q.F.B Mónica Lizzeth Córdova Serrano



Dr. Sergio Zarazúa Guzmán



SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO
SAN LUIS POTOSÍ



POTOSÍ
PARA LOS POTOSINOS
GOBIERNO DEL ESTADO 2011-2017

SALUD
SERVICIOS DE SALUD

DG/DAM/SCES/OF. N^o 26712 /2022

13 de diciembre de 2022
Código: 2S.3

ASUNTO: Evaluación de Protocolo Registro Estatal SLP/13-2022.

San Luis Potosí, S.L.P.

DRA. ALMA GABRIELA PALESTINO ESCOBEDO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
AV. DR. MANUEL NAVA No.6
ZONA UNIVERSITARIA C.P. 78210
C I U D A D

Hago de su conocimiento que el pasado 6 de diciembre del 2022, en Sesión Ordinaria del Comité Estatal de Ética en Investigación, realizó la Evaluación del Protocolo de Investigación:

Determinación de Factores y Marcadores Predictivos para Cáncer de Mama. Estudio Piloto.	Dr. Sergio Zarazúa Guzmán
Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí	
REGISTRO ESTATAL SLP/13-2022	

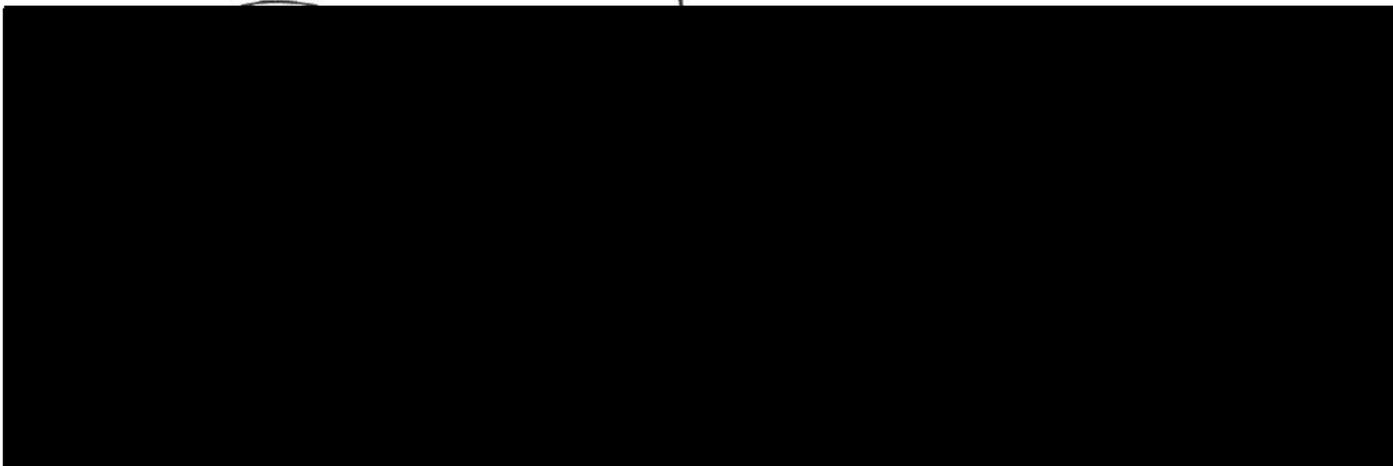
Siendo el dictamen por consenso:

OPINIÓN TÉCNICA FAVORABLE

Lo anterior, con fundamento en el TÍTULO QUINTO de la Ley Estatal de Salud, que establece las bases, condiciones y normatividad en materia de Investigación para la Salud, y la NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de Proyectos de Investigación para la Salud en Seres Humanos.

En base a la Guía Nacional para la Integración y Funcionamiento de los Comités de Ética en Investigación, el Comité tendrá la facultad de solicitar el seguimiento del estudio en cualquier fase de su desarrollo, su cumplimiento de acuerdo al Protocolo autorizado y a la Guía de buena Práctica Clínica, para garantizar la protección del sujeto participante al estudio, y cumplir con las disposiciones que marca el Reglamento Interno del Comité Estatal de Ética en Investigación, en donde establece autorizar el Registro Estatal en su Capítulo X, Artículo No. 45, el Investigador Titular se obliga como parte de los compromisos adquiridos, a entregar con periodicidad semestral los avances de la Investigación al Comité de Ética en Investigación en Salud.

Reciba un cordial saludo.



edv

"2022, AÑO DE LAS Y LOS MIGRANTES DE SAN LUIS POTOSÍ"

294336
217454



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

**Determinación de factores y marcadores predictivos
para cáncer de mama. Estudio Piloto**

Tesis para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Córdova Serrano Mónica Lizzeth

SINODALES:

Presidente:	Dr. Jorge Armando Jiménez Ávalos
Secretario:	Dra. Andrea Guadalupe Rodríguez López
Vocal:	Dr. Sergio Zarazúa Guzmán
Suplente:	Dra. Aida Catalina Hernández Arteaga

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

FECHA: JUNIO, 2024

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán. Director de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Andrea Guadalupe Rodríguez López. Codirectora de tesis. Adscrito a Instituto Nacional de Salud Pública de México. Departamento de Salud Sexual y Reproductiva.

Dr. Aida Catalina Hernández Arteaga. Asesora externa. Adscrito a Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT).

Dr. Jorge Armando Jiménez Ávalos. Asesor externo. Adscrito a Centro de Investigación y Desarrollo Oncológico (CIDO).

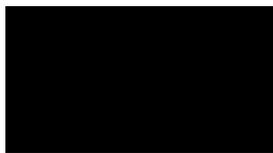
Dr. Dante Guillermo Mejía Torres. Asesor clínico. Adscrito a Centro Regional de Enfermedades Oncológicas (CREO).

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a junio/ 10 /2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 10 del mes de junio del año 2024 El que suscribe Mónica Lizzeth Córdova Serrano Alumna del programa de posgrado Maestría en Ciencias Farmacobiológicas adscrito a Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Sergio Zarazúa Guzmán, Dra. Andrea Guadalupe Rodríguez López y Dra. Aida Catalina Hernández Arteaga y cede los derechos del trabajo titulado Determinación de factores y marcadores predictivos para cáncer de mama. Estudio piloto a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección (sergio.zarazua@uaslp.mx, andrea.rodriguez@uaslp.mx, aida.arteaga@uaslp.mx y a254736@alumnos,uaslp.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Q.F.B. Mónica Lizzeth Córdova Serrano

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a junio/ 03 /2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada **Determinación de factores y marcadores predictivos para cáncer de mama. Estudio piloto**, presentada por la autora **Mónica Lizzeth Córdova Serrano**. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de **24 %** excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E



Dr. Sergio Zarazúa Guzmán
Coordinador Académico del Posgrado
en Ciencias Farmacobiológicas

DEDICATORIA

A mi familia, que me han dado su apoyo en todo momento y que gracias a ellos reconozco el valor del amor incondicional y de estar unidos.

A mi novio, que siempre ha estado presente desde el día uno y me ha impulsado en cada una de mis metas.

A mis asesores, que han sido parte fundamental de mi desarrollo profesional.

A todas las mujeres, porque este trabajo es para cada una de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el **Dr. Sergio Zarazúa** por aceptarme como su alumna y siempre estar con la disponibilidad de recibirme ante cualquier duda y la mayor disposición de apoyarme en lo que ocupara.

A la **Dra. Andrea Rodríguez** por inspirarme y animarme a continuar por el camino de la investigación y siempre en pro de la salud de la mujer, además de brindarme su confianza para llevar a cabo la realización de este proyecto.

A la **Dra. Aida Hernández**, que desde el primer día de conocerla me brindo todo su apoyo y conocimiento, además de recibirme en su equipo de investigación y reafirmar que cuando las cosas se realizan en equipo, todo sale mucho mejor. Junto a ella le quiero agradecer al **Dr. Hiram Joazet** por también brindarme su apoyo y conocimiento en Espectroscopia Raman y TEM; además a los chicos de servicio social del Laboratorio de Nanotecnología Aplicada, Sergio Cortés González, Gisele Karely Pérez Nájera y Roberto Elías Juárez Muñoz quienes me apoyaron en gran parte de la síntesis y caracterización de AgNPs.

Al **Dr. Dante Mejía** y **Dr. Armando Ávalos** por confiar y apoyar desde el primer día en este bonito proyecto, además de abrirme las puertas del CREO para la captación de las pacientes y voluntarias, y siempre brindarme sus valiosos consejos.

A la **Dra. Karen Palomo** y al **Dr. Juan Diego** por recibirme en su laboratorio y siempre tener la disponibilidad y amabilidad para asesorarme en la parte experimental de biología molecular.

Al **Dr. José de Jesús Zermeño** por sumarse a este proyecto y ayudarnos con la captación de las pacientes, además de brindar su valioso conocimiento.

A la **Dra. América Mares** por apoyarme en la interpretación de los resultados de genotipificación del gen, además de que siempre estuvo en amable disposición de apoyar durante la realización del proyecto.

Al **M.S.P. Carlos Coronado**, por siempre estar con la mejor disposición de ayuda desde que inicio el proyecto, específicamente con el desarrollo de la metodología.

A mis amigos y médicos estomatólogos, **Rocío Robledo** y **Alberto Alemán**, por brindar su conocimiento y ayudarme con la evaluación dental de las voluntarias.

A mis **voluntarias y pacientes** por confiar en este proyecto y por su valiosa participación, ya que sin ustedes este proyecto no hubiera sido posible.

A **mi familia**, en primer lugar a mis padres, **Mónica y Javier** por su amor y apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, por ser mi ejemplo a seguir y por qué gracias a ellos, soy lo que soy, también a mis hermanos, **Itzel y Eduardo** que siempre han creído en mí y son inspiración en mi vida, junto a ellos le agradezco a mi cuñado **Carlos**, quien llegó para hacer que todo fuera aún más divertido en familia. También le agradezco a mi **hermano Erik** por sus valiosos consejos de vida, a mi **cuñada Cindy** por su apoyo y participación en este proyecto y a mi pequeña **Lorettito**, que llegó a esta familia para mejorarla en todos los sentidos.

A mi novio, **Roberto Blanco**, mi persona, por ser mi compañero de vida y ser incondicional desde el primer día, brindándome todo su amor, apoyo y consejos, y haciéndome saber que mientras estemos juntos, todo saldrá bien. Y con él, también a su familia: a sus **hermanas, mami y abuelita**, que igualmente me han apoyado y dado ánimos cuando lo he necesitado.

A parte de mis mejores amigos que conocí en carrera y se convirtieron en familia, mi sis, **Ana González** que siempre me ha apoyado desde el primer momento de conocernos y se ha convertido en mi confidente, a **Diana Soto**, que siempre contagia su alegría y buen sentido del humor a quien la rodea, a **Ada Hernández**, que es una persona con gran corazón y siempre está dispuesta a ayudarte cuando lo necesitas, a **Susy Castro**, que siempre ha sido una amiga que sabe escuchar y darte un consejo, a **Oscar Ponce y Carlos Hernández**, por estar para mí cuando lo necesito y siempre hacer que todo sea más divertido.

A dos de mis mejores amigos que se han convertido en mis incondicionales, **Kevin Cardona**, porque incluso a la distancia siempre estuvo pendiente de mí y me brindó todo su apoyo, y a **Alberto Alemán**, por brindarme una gran amistad desde el primer momento de conocernos y siempre apoyarme y escucharme.

A **Rocío Robledo**, una de las amistades más valiosas que tengo, y a quien siempre le agradeceré el estar conmigo en las buenas y en las malas.

A **Omar Urbina, Mónica Nambo y Yamili Rangel**, por todo su apoyo durante esta etapa de maestría y por hacer que todo fuera más divertido y llevadero, y que lo que empezó como solo compañerismo, terminó en una bonita amistad.

A mi pequeño **Pucky**, que llegó a mi vida hace ya casi 14 años y ha estado presente en cada uno de mis logros y por supuesto a mis gorditas, **Ahri y Hennita**, que igualmente han estado conmigo y me acompañaron en cada una de mis desveladas.

RESUMEN

Actualmente se ha propuesto el uso de biomarcadores para el cáncer de mama (CaMa), como el ácido sialico (AS), el cuál ha demostrado ser un rasgo característico en la saliva de estas pacientes. Dentro de su etiología multifactorial, el uso de anticonceptivos hormonales (AH) ha aumentado a nivel mundial, se conoce que una exposición prolongada a estrógenos tanto exógenos como endógenos, puede favorecer su desarrollo, además se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relacionados con su biosíntesis y metabolismo, uno de ellos en el gen *ESR1* que codifica para receptores de estrógeno, denominado rs3020314. En este trabajo se evaluaron las concentraciones de AS (analizadas por Raman SERS) y el SNP rs3020314 (mediante PCR tiempo real) a manera de biomarcadores de riesgo en 13 pacientes con CaMa y 30 mujeres sanas. La concentración media de AS para las pacientes fue de 18.15 mg/dL y de 5.51 mg/dL para el grupo control. Para la evaluación del SNP, se obtuvo la frecuencia de genotipos, la variante más frecuente para ambos grupos de estudio fue la heterocigota (CT), seguida de la heterocigota mutada (TT) para pacientes y homocigota silvestre (CC) para el grupo control. Se realizó un análisis multivariado a través de regresión logística para identificar factores de riesgo para CaMa modificables y no modificables asociados con la presencia del SNP del gen *ESR1*. De acuerdo, con estos resultados, no se encontró ninguna asociación entre estos factores de riesgo y la presencia del SNP.

Palabras clave: Cáncer de mama, biomarcador, ácido sialico, polimorfismo genético, gen *ESR1*.

ABSTRACT

Currently, the use of biomarkers for breast cancer (BC) has been proposed, such as sialic acid (SA), which has been shown to be a characteristic feature in the saliva of these patients. Within its multifactorial etiology, the use of hormonal contraceptives (HA) has increased worldwide, it is known that prolonged exposure to both exogenous and endogenous estrogens can favor its development, and single nucleotide polymorphisms (SNP) have also been found related to its biosynthesis and metabolism, one of them in the *ESR1* gene that codes for estrogen receptors, called rs3020314. In this work, AS concentrations (analyzed by Raman SERS) and the SNP rs3020314 (using real-time PCR) were evaluated as risk biomarkers in 13 patients with BC and 30 healthy women. The mean SA concentration for patients was 18.15 mg/dL and 5.51 mg/dL for the control group. For the evaluation of the SNP, the frequency of genotypes was obtained, the most frequent variant for both study groups was heterozygous (CT), followed by mutated heterozygous (TT) for patients and wild-type homozygous (CC) for the control group. A multivariate analysis was performed through logistic regression to identify modifiable and non-modifiable risk factors for CaMa associated with the presence of the *ESR1* gene SNP. In agreement, with these results, no association was found between these risk factors and the presence of the SNP.

Keywords: Breast cancer, biomarker, sialic acid, genetic polymorphism, *ESR1* gene.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Definición de cáncer de mama	3
2.2 Clasificación.....	3
2.3 Factores de riesgo.....	5
2.3.1. Métodos Anticonceptivos.....	7
2.3.1.1 Relación con el cáncer de mama.....	10
2.3.2 Mutaciones genéticas.....	11
2.3.2.1 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).....	12
2.3.2.1.1 Gen ESR1.....	13
2.4 Diagnóstico.....	15
2.4.1 Ácido Siálico como biomarcador.....	17
2.4.2 Espectroscopia Raman “SERS”.....	19
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos específicos.....	23
6. Metodología	24
6.1 Diseño del estudio clínico.....	24
6.1.1 Diseño del estudio.....	24
6.1.2 Lugar de realización.....	24
6.1.3 Universo del estudio.....	24
6.1.4 Método de muestreo.....	24
6.1.5 Tamaño de muestra.....	24
6.1.6 Criterios de selección de pacientes.....	25
6.1.7 Criterios de selección de controles sanos.....	25

6.1.8	Variables de estudio.....	27
6.1.9	Aspectos éticos.....	29
6.1.10	Plan de trabajo.....	29
6.1.10.1	Toma de muestra de saliva.....	30
6.1.10.2	Toma de muestra de sangre.....	30
6.1.10.3	Análisis de muestras de saliva.....	30
6.1.10.4	Análisis de muestras sanguíneas.....	31
6.2	Equipos y reactivos.....	32
6.2.1	Equipos.....	32
6.2.2	Reactivos.....	32
6.3	Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata.....	33
6.3.1	Síntesis de nanopartículas de plata.....	33
6.3.2	Caracterización de nanopartículas de plata.....	33
6.3.2.1	Dispersión de Luz Dinámica (DLS).....	33
6.3.2.2	Espectroscopía de Transmisión Óptica.....	34
6.3.2.3	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	34
6.3.3	Calibración de ácido siálico mediante la técnica Raman-SERS.....	34
6.3.4	Medición de ácido siálico en muestras de saliva.....	35
6.4	Genotipificación del polimorfismo del gen ESR1 (rs3020314).....	36
6.4.1	Extracción de ADN genómico.....	36
6.4.2	PCR tiempo real.....	36
6.5	Análisis estadístico.....	37
7.	Resultados.....	38
7.1	Características demográficas y clínicas.....	38
7.2	Medición de ácido siálico.....	39
7.2.1	Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata.....	39
7.2.1.1	Tamaño de AgNPs.....	39
7.2.1.2	Potencial Zeta de AgNPs.....	40

7.2.1.3 Espectroscopia de Transmisión Óptica.....	40
7.2.1.4 Microscopia electrónica de Transmisión.....	40
7.2.2 Calibración de ácido siálico por la técnica Raman-SERS.....	40
7.3.2 Concentración de ácido siálico en saliva.....	41
7.3 Factores de riesgo en grupo control.....	43
7.4 Genotipificación del polimorfismo rs3020314.....	44
7.4.1 Regresión logística multivariada.....	44
8. Discusión de resultados.....	45
9. Conclusiones.....	75
10. Referencias bibliográficas.....	76
Glosario.....	87

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama (CaMa) es el tipo de cáncer con mayor incidencia y la principal causa de muerte entre las mujeres a nivel mundial. Esto es debido a que en la mayoría de los casos la enfermedad se diagnostica en etapas avanzadas, por lo que la detección temprana sigue siendo fundamental para su control, ya que la tasa de supervivencia relativa puede llegar a ser del 100% si se detecta en estadio 0 o I, y disminuye hasta un 22% en el estadio IV.

Es importante mencionar que los métodos de diagnóstico, como la mamografía, solo están indicados para mujeres a partir de 40 años, de esta manera el diagnóstico se encuentra limitado para las mujeres menores a 40 años, con ello, existe la necesidad de investigar nuevos enfoques basados en diagnóstico molecular, como el uso de biomarcadores. Actualmente, se ha demostrado que los niveles de ácido siálico (AS) en saliva son un rasgo característico en las pacientes con CaMa y, por lo tanto, se han sugerido como un marcador predictivo no invasivo complementario al diagnóstico en pacientes con este tipo de cáncer.

Además, de acuerdo con su etiología, el CaMa es multifactorial, es decir, se da entre interacciones de factores modificables, como puede ser la inactividad física, el sobrepeso u obesidad, historial reproductivo, uso de anticonceptivos hormonales (AH), entre otros, y no modificables, como el sexo, el envejecimiento, antecedentes familiares y las mutaciones genéticas, estos últimos, desafortunadamente no dependen del individuo.

Con base en lo anterior, dando especial enfoque en la población de mujeres jóvenes, uno de los factores modificables menos evaluados y más controversiales es el uso de AH. De acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS) la cifra de mujeres en edad reproductiva a nivel mundial en el 2021 fue de 1900 millones, de las cuales, 851 millones utilizaban AH. Aunque aún no se determina el mecanismo por el cual los AH se asocian con el CaMa, se conoce que una exposición prolongada a hormonas

endógenas y exógenas (estradiol y progesterona) favorecen el riesgo para su desarrollo.

Recientemente se han realizado estudios de casos y controles, los cuales evalúan polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) involucrados en la biosíntesis y metabolismo de los estrógenos que podrían participar en el desarrollo de la enfermedad. Dentro de estos estudios se han encontrado posibles mutaciones en el gen *ESR1* que codifica para una de las isoformas del receptor de estrógeno (RE), resultando así con distintos SNP relacionados como factor de riesgo, uno de ellos, rs3020314.

Debido a esto, se propuso evaluar las concentraciones de AS y determinar el SNP del gen *ESR1* (rs3020314) a manera de biomarcadores de riesgo para favorecer la detección temprana del CaMa ante el uso de AH como factor predisponente.

2. ANTECEDENTES

El CaMa es el cáncer diagnosticado con mayor incidencia y la principal causa de muerte entre las mujeres a nivel mundial con el 23.8 % (2.29 millones) del total de nuevos casos y el 15.4 % (666 mil) del total de muertes relacionadas con él (WHO, 2022).

En México, durante el 2022, 87,880 personas fallecieron a causa de tumores malignos, 7,888 muertes fueron debidas a CaMa, de las cuáles 99.4 % fueron mujeres y 0.6 % fueron hombres. De igual manera, la tasa de mortalidad para mujeres de 20 años y más, es de 18 defunciones por cada 100 mil mujeres, aumentando a 48.24 defunciones en mujeres de 60 años y más (INEGI, 2022). En 2022, se registraron 23,760 nuevos casos de CaMa en México, de acuerdo con el Boletín Epidemiológico Nacional de la semana 52 de la Secretaria de Salud (Secretaria de Salud, 2022). En San Luis Potosí la incidencia se presenta en un rango de 6.96 a 36.04 por cada 100 mil mujeres, así como una tasa de mortalidad de 18.7 por cada 100 mil mujeres (INEGI, 2022).

2.1 Definición de cáncer de mama

El CaMa se define como la proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Son células que han aumentado enormemente su capacidad reproductiva. Las células de CaMa pueden diseminarse a través de la sangre o de los vasos linfáticos y llegar a otras partes del cuerpo, adherirse a los tejidos y crecer formando metástasis (IMSS, 2017). De acuerdo con la Clasificación Internacional de Enfermedades en su décima edición (CIE-10), esta enfermedad se encuentra como tumor maligno de la mama con el código C50.

2.2 Clasificación

Existen distintos tipos de CaMa con características morfológicas y biológicas específicas, las cuáles determinan su pronóstico y tratamiento. Es por ello por lo que se tiene una clasificación, la cual proporciona un diagnóstico preciso de la enfermedad para la toma de decisiones médicas (Tsang & Tse, 2020).

Esta clasificación se basa principalmente en el tipo de CaMa, subtipo molecular y el estadio de la enfermedad. A su vez, el tipo de CaMa depende del área anatómica de la mama afectada (conductos, lóbulos o tejido intermedio), el origen de la célula (carcinoma sí surgen del componente epitelial o sarcoma, sí surgen de los componentes estromales). De esta manera, la mayoría de los CaMa son carcinomas y se subdividen en tres grupos principales de acuerdo con características patológicas e invasividad como: no invasivo (*in situ*), invasivos y metastásicos (Feng et al., 2018).

Los subtipos moleculares del CaMa consisten en la expresión genética de los receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP), factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y del marcador celular de proliferación Ki-67, proporcionando así cuatro subtipos:

- **Luminal A:** RE+, RP ±, HER2 – y niveles bajos de Ki-67, representan aproximadamente el 70 % de los CaMa y suelen ser de bajo grado y mejor pronóstico.
- **Luminal B:** RE+, RP ±, HER2 ± y niveles altos de Ki-67, representan del 10 al 20 % de los CaMa, crecen un poco más rápido que los cánceres luminal A y tienen un pronóstico un poco peor.
- **HER2:** RE-, RP -, HER2 + y niveles altos de Ki-67, representan del 5 al 15 % de los CaMa, crecen más rápido que los cánceres luminales y tienen un pronóstico más grave.
- **Triple negativo:** RE-, RP -, HER2 - y niveles altos de Ki-67, representan del 15 al 20 % de los CaMa, es de alto grado y su comportamiento es más agresivo (Feng et al., 2018; Pisarev et al., 2010).

Por último, la estadificación TNM, de acuerdo con el *Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer* (AJCC, por sus siglas en inglés) se basa en el tamaño del tumor (T1-T4), el estado de los ganglios linfáticos (N0-N3) y el grado de metástasis (M0/M1). Al combinar estos factores se estadifica la enfermedad en cinco etapas (Tsang & Tse, 2020):

- Estadio 0: tumor no invasivo con tamaño < 20 mm.
- Estadio I: tumor invasivo con tamaño > 20 mm. Se subdivide en IA e IB.
- Estadio II: el tumor mide de 20 a 50 mm y se ha propagado en 1 a 3 ganglios linfáticos. Se subdivide en IIA e IIB.
- Estadio III: el tumor es > 50 mm y se detectó en 4 a 9 ganglios linfáticos. Se subdivide en IIIA, IIIB e IIIC.
- Estadio IV: el tumor se ha diseminado a diferentes órganos del cuerpo.

2.3 Factores de riesgo

Un factor de riesgo, en definición se considera cualquier cosa que afecte la probabilidad de que un individuo padezca una enfermedad (Feng et al., 2018).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control, y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. Los factores de riesgo se distinguen en cuatro grandes grupos: 1) biológicos, 2) iatrogénicos o ambientales, 3) de historia reproductiva y 4) de estilos de vida. Los primeros son no modificables; los segundos escapan del control de la población, los del tercer grupo se asocian en beneficios en la salud reproductiva mayores que las posibles desventajas, y los del cuarto grupo son modificables y se enfocan a promover las conductas favorables a la salud que disminuyan el riesgo de desarrollar CaMa (9).

1) Factores de riesgo biológicos:

- **Sexo femenino:** las mujeres tienen una probabilidad 100 veces mayor de padecer CaMa que los hombres, debido al componente hormonal (Feng et al., 2018; Sun et al., 2017).
- **Envejecimiento:** la incidencia del CaMa se relaciona fuertemente con el aumento de edad (40 a 60 años) debido a que a lo largo de los años las células del cuerpo pueden acumular mutaciones genéticas y a su vez los mecanismos de reparación se vuelven menos eficientes (Feng et al., 2018).

- **Historia personal o familiar de CaMa:** tener un pariente de primer grado duplica el riesgo en una mujer, mientras que tener dos parientes de primer grado con la enfermedad, aumenta el riesgo hasta 3 veces (Sun et al., 2017).
- **Antecedentes de hallazgos de hiperplasia ductal atípica, imagen radial o estrellada, así como carcinoma lobulillar in situ por biopsia.**
- **Vida menstrual de más de 40 años** (menarca antes de los 12 años y menopausia después de los 52 años): pueden aumentar el riesgo debido a una mayor exposición a hormonas endógenas (estrógeno y progesterona) (Feng et al., 2018; Sun et al., 2017).
- **Densidad mamaria:** disminuye la posibilidad de detección de un posible CaMa mediante una mamografía, ya que el tejido denso puede ocultarlo (Feng et al., 2018).
- **Mutaciones genéticas:** Ser portador conocido de los genes *BRCA1* o *BRCA2*.

2) Iatrogénicos o ambientales:

- **Exposición a radiaciones ionizantes principalmente durante el desarrollo o crecimiento** (in útero, en la adolescencia).
- **Tratamiento con radioterapia en tórax:** el riesgo aumenta, si la persona recibió radiación siendo adolescente, cuando los senos aún estaban en desarrollo (Feng et al., 2018).

3) Relacionados con la historia reproductiva:

- **Nuligesta.**
- **Primer embarazo a término después de los 30 años de edad.**
- **Terapia hormonal en la peri o postmenopausia por más de cinco años.**
- **Control de natalidad y uso de AH:** la principal fuente de hormonas exógenas (estrógeno y progesterona) son los AH (Sun et al., 2017).

4) Relacionados con estilo de vida:

- **Alimentación rica en carbohidratos y baja en fibra.**

- **Dieta rica en grasas tanto animales como ácidos grasos trans.**
- **Sobrepesos significativo u obesidad:** antes de la menopausia, los ovarios producen la mayor parte del estrógeno del cuerpo, y el tejido graso solo una pequeña parte, después de la menopausia los papeles se invierten; por lo tanto, entre más tejido graso, mayor nivel de estrógenos y con ello, mayor riesgo (Feng et al., 2018).
- **Sedentarismo:** los niveles de actividad física afectan el peso corporal, las hormonas y el equilibrio energético (Feng et al., 2018).
- **Consumo de alcohol mayor a 15 g/día:** eleva el nivel de hormonas relacionadas con el estrógeno en la sangre y activar las vías del receptor de estrógeno (Sun et al., 2017).
- **Tabaquismo.**

Con fines de este trabajo, nos enfocamos principalmente en un factor modificable como es el uso de anticonceptivos hormonales y un factor no modificable, como son las mutaciones genéticas.

2.3.1 Métodos anticonceptivos

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (1993). NOM-005-SSA2-1993, de los servicios de planificación familiar. Los métodos anticonceptivos (MA) son utilizados para regular la capacidad reproductiva de un individuo o una pareja con el fin de evitar un embarazo.

De acuerdo con la OMS, la cifra de mujeres en edad reproductiva (15 a 49 años) a nivel mundial en el 2021 fue de 1900 millones. Entre 2000 y 2020, el número de mujeres que utilizaron un MA pasó de 663 millones a 851 millones, aumentando la tasa de uso de 47.7 % a 49 %. De acuerdo con los datos proporcionados por la Encuesta Nacional de la Dinámica Demográfica (ENADID) en el 2018, el porcentaje de mujeres en edad fértil usuarias de MA en México es de 53.4 %, lo que equivale aproximadamente a 17.6 millones.

Existen diversas maneras de clasificar los MA, entre ellas:

a) Métodos anticonceptivos no hormonales:

- Reversibles:
 - ✓ Métodos de barrera: preservativos masculino y femenino, diafragma, esponja vaginal, dispositivo intrauterino (DIU) T de cobre.
- Permanentes:
 - ✓ Salpingoclasia.
 - ✓ Vasectomía.

b) Métodos anticonceptivo hormonales:

- Anticonceptivos orales.
- Anticonceptivos inyectables.
- Implante subdérmico.
- Parche anticonceptivo.
- Sistema intrauterino (SIU) con liberación hormonal.
- Anillo vaginal.

Los métodos hormonales están compuestos de hormonas sexuales femeninas sintéticas, como estrógenos y progesterona (Díaz & Schiappacasse, 2017). Los AH se consideran métodos temporales y a su vez se clasifican en dos grupos:

- Los combinados de estrógeno y progestina.
- Los que contienen solo progestina.

Para comprender el mecanismo de acción de los AH, es importante recordar la función de las hormonas endógenas, estrógeno y progesterona, así como su regulación durante las fases del ciclo menstrual.

La regulación hormonal del ciclo reproductor femenino se lleva a cabo por medio del “Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada”, el cual está controlado por mecanismos de retroalimentación.

El hipotálamo se encarga de producir la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) la cual a su vez estimula la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) por parte de la adenohipófisis. Estas últimas

dos hormonas estimulan el crecimiento de los folículos ováricos y a la par, la secreción de estrógenos en las células de la granulosa. A la mitad del ciclo, la LH provoca la ovulación y contribuye a la formación del cuerpo lúteo, el cuál produce y secreta estrógenos, progesterona, relaxina e inhibina (Tortora & Derrickson, 2013).

La duración habitual del ciclo reproductor femenino oscila entre 24 a 35 días y se divide en cuatro fases: la fase menstrual, la fase preovulatoria, la ovulación y la fase posovulatoria. Durante la fase preovulatoria existe una secreción creciente de estrógenos e inhibina por parte de las células de la granulosa folicular que permiten la reparación y proliferación del endometrio en el útero, así como al aumento de las secreciones cervicales. Al inicio de la fase preovulatoria, los niveles moderados de estas hormonas ováricas inhiben la liberación de FSH y LH. Sin embargo, durante la última parte de esta fase se encuentran altos niveles de estrógenos, por lo que se ejerce un efecto de retroalimentación positiva estimulando la liberación de GnRH y LH, promoviendo así la ovulación. Durante la fase de ovulación, la LH induce la eclosión del folículo maduro y la expulsión del ovocito secundario. En la fase posovulatoria, los restos del folículo conllevan a la formación del cuerpo lúteo, que al ser estimulado por la LH, produce una secreción aumentada de estrógenos y progesterona, provocando la preparación del endometrio para la llegada de un óvulo fertilizado. Si el ovocito no es fecundado, la actividad secretora del cuerpo lúteo disminuye y se degenera en cuerpo albicans, provocando la menstruación. A medida que los niveles de estrógeno y progesterona disminuyen, la liberación de GnRH, FSH y LH aumenta debido a la pérdida de retroalimentación negativa (Tortora & Derrickson, 2013; Messinis et al., 2014).

El mecanismo de acción de los AH combinados se basa en la inhibición de la ovulación por medio de la supresión de las gonadotrofinas FSH y LH. Los bajos niveles de estas hormonas evitan el desarrollo de un folículo dominante en el ovario y, por lo tanto, no se incrementan los niveles de estrógeno. Lo anterior provoca que no se genere el pico de LH a la mitad del ciclo y de esta manera, se

inhibe la ovulación. Los AH que solo contienen progestágeno incrementan el espesor del moco cervical y pueden bloquear la implantación en el útero, pero no inhiben la ovulación (Messinis et al., 2014).

2.3.1.1 Relación con el cáncer de mama

Como se mencionó anteriormente la exposición prolongada a hormonas ováricas constituye un factor de riesgo para el desarrollo del CaMa. Lo anterior incluye: ciclos menstruales prolongados; producción excesiva de hormonas en la obesidad posmenopáusica; así como el uso de anticonceptivos hormonales y/o terapia de reemplazo hormonal. Aunque se desconocen los mecanismos precisos, existen distintas hipótesis (Del Pup et al., 2019; Finlay et al., 2015).

Una de ellas es enfocada a las progestinas, las cuales pueden estimular la proliferación de células madre normales susceptibles a transformarse o activan a células madre malignas ocultas, promoviendo así la aparición de tumores (Finlay et al., 2015).

Otra hipótesis, se enfoca en los mecanismos hormonales y no hormonales de los estrógenos. El mecanismo hormonal ocurre en los órganos dependiente de hormonas, en los cuales los estrógenos se unen al receptor de estrógeno (RE) para estimular la proliferación celular, sin embargo, es necesario un detonante genotóxico para inducir mutaciones. Por otro lado, se habla de un mecanismo no hormonal en el cual los estrógenos (estrone y estradiol) pueden actuar como carcinógenos químicos endógenos. En este mecanismo, los estrógenos se oxidan de catecol a semiquinonas y posteriormente a quinonas. Este último metabolito puede reaccionar con el ADN formando así aductos despurinantes en el N-3 de Adenina y N-7 de Guanina. Posteriormente, los aductos se desprenden del ADN y dejan sitiosapurínicos. La reparación errónea de los sitiosapurínicos da lugar a mutaciones críticas que podrían iniciar el desarrollo cáncer. El metabolismo de los estrógenos a través de esta vía esta equilibrado por un conjunto de enzimas que minimizan su oxidación a quinonas y con ello, la reacción con el ADN. No obstante, es importante mencionar que existen factores endógenos y exógenos,

como el estilo de vida, la dieta, el envejecimiento, el medio ambiente y factores genéticos que pueden alterar la homeostasis y con ello provocar el inicio del cáncer. Algunos estudios han reportado el desequilibrio en la homeostasis de los estrógenos en el tejido mamario de mujeres con CaMa (Del Pup et al., 2019; Cavalieri & Rogan, 2014).

Normalmente los estudios que asocian el uso de AH con el desarrollo de CaMa han sido realizados a través de estudios de casos y controles en distintas poblaciones, en los cuales se evalúa a los AH en conjunto con otros factores de riesgo.

En un estudio realizado por Bardaweel et al. (2019) evaluaron a 450 mujeres jordanas (n=225 casos y 225 controles; 18-65 años de edad) con la finalidad de explorar cualquier posible relación entre el uso y duración de los anticonceptivos orales (AO) y el riesgo de CaMa. Sus resultados demuestran que el uso regular de AO se asocia de manera significativa con un mayor riesgo de padecer CaMa (OR = 2.25, IC 95% 1.34 – 2.79; $p = 0.002$), mientras que la duración del uso no presentó asociación ($p > 0.05$). Adicionalmente, se encontró que otros factores de riesgo tuvieron asociación significativa con el desarrollo de CaMa, incluyendo: edad de la menarquía y menopausia, embarazo previo, estado menopáusico, así como antecedentes familiares de cáncer.

2.3.2 Mutaciones genéticas

En cuanto a los factores no modificables, datos epidemiológicos de pacientes a nivel mundial con CaMa sin análisis de estratificación por edad, describen que del 10 al 30 % de los casos de CaMa se atribuyen a la historia familiar, es decir que tienen al menos un familiar de primer grado afectado. Un porcentaje menor del 5 al 10 % de los casos de CaMa tienen un componente hereditario fuerte, el cual se genera por mutaciones genéticas en genes de susceptibilidad como el *BRCA1* (breast cancer 1, “cáncer de mama 1”) o *BRCA2* (breast cancer 2, “cáncer de mama 2”) (Feng et al., 2018; Gómez et al., 2017).

Sin embargo, las mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* no explican el desarrollo de cáncer en todas las familias propensas al CaMa, por lo que se han identificado otro tipo de mutaciones en varios genes de susceptibilidad (Gómez et al., 2017).

Las mutaciones se dividen principalmente en: mutaciones altamente penetrantes que se asocian con un riesgo relativo (RR) superior a 5, mutaciones de penetración intermedia que confieren un RR de 1.5 a 5 y los *loci* de baja penetrancia que tienen un RR menor a 1.5, estos últimos suelen ser polimorfismos (Gómez et al., 2017).

2.3.2.1 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Recientemente se han realizado estudios de asociación de casos y controles que permiten la detección y evaluación de pequeños *loci* de riesgo, los cuales se han relacionado a polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Se considera que la exposición a hormonas sexuales representa un factor de riesgo para CaMa. Además, la presencia de SNP en los genes que están involucrados en la biosíntesis y metabolismo de los estrógenos podrían participar en el desarrollo de la enfermedad (Feng et al., 2018; Gómez et al., 2017).

Los efectos de los estrógenos sobre los tejidos diana esta mediados por los receptores de estrógeno (RE), los cuales forman parte una superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción inducibles por ligando, en este caso por estrógeno. A su vez, modulan la transcripción de otros genes y receptores de membrana. En el ser humano, se conocen dos isoformas de los RE, una es el receptor de estrógeno α (RE α) que es codificado por el gen *ESR1* (6q25.1) y otra es el receptor de estrógeno β (RE β) que es codificado por el gen *ESR2* (14q22-24) (Gebreslasie et al., 2019).

Ambos receptores contienen dominios con varios grados de similitud, conservando la capacidad de formar heterodímeros. En el extremo N-terminal se localiza el dominio de activación de función 1 (AF-1) y en el extremo C-terminal se encuentra el dominio de activación de función 2 (AF-2). Estos dominios reclutan varias proteínas, como los correuladores transcripcionales y sus funciones son específicas de cada tejido.

Mientras que AF-1 funciona de manera independiente de estrógeno y AF-2 lo hace de manera dependiente. También se encuentra el dominio de unión a ligando (LBD) que reconoce hormonas estrogénicas, principalmente 17-betaestradiol (E2) y el dominio con mayor identidad (96%) es el dominio de unión al ADN (DBD), que media la interacción de los dímeros RE y los elementos de respuesta a los estrógenos (ERE) de sus genes diana. Por su parte, LBD y DBD se encuentran separados por una región bisagra (Tecalco et al., 2019; Porras et al., 2021).

Además de la vía dependiente de ERE, los RE también tienen la capacidad de regular la transcripción sin la participación de los ERE. Este proceso es mediado por coactivadores y correpresores, incluidos el *BRCA1*, el cual actúa parcialmente como supresor de tumores inhibiendo la señalización de ER α . Como se mencionó en un inicio, el 70 % de los CaMa tienen expresión de este tipo específico de receptor (RE α) por lo cual juega un papel importante en la patogénesis de los CaMa (Feng et al., 2018).

2.3.2.1.1 Gen ESR1

El gen *ESR1* humano se ubica en el locus q.25-1 del cromosoma 6, comprende ocho exones que junto con los intrones abarcan 296 kb y expresa RE α en tejidos diana de estrógenos como útero, mama y ovario (Gebreslasie et al., 2019).

En el tejido mamario humano normal, la expresión de *ESR1* se restringe al compartimento epitelial. Sólo del 7 al 10% de las células expresan RE α . A su vez, este receptor se encuentra ausente en células mioepiteliales diferenciadas y presente en solo una fracción de células luminales, donde los niveles de expresión varían a lo largo de la vida, específicamente después de la pubertad, así como durante los ciclos menstruales, el embarazo y la lactancia. También se ha observado una expresión elevada de *ESR1* en distintos tipos de CaMa, lo que sugiere que la desregulación del nivel de expresión de este gen puede estar implicada en el desarrollo de esta patología, aunque no está claro si esta expresión desregulada es suficiente para impulsar la tumorigénesis en la glándula mamaria humana (24). Sin embargo, se ha propuesto un mecanismo en el cuál se vincula la exposición a los estrógenos con el desarrollo de

CaMa debido a su unión con el receptor en el tejido mamario, estimulando así la proliferación y diferenciación de estas células, lo que ocasiona una mayor susceptibilidad a la transformación por carcinógenos químicos ambientales (Gebreslasie et al., 2019).

Debido a esto, se han evaluado posibles mutaciones en el gen *ESR1* en distintas poblaciones, resultando así con polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) relacionados como factor de riesgo, uno de ellos, denominado rs3020314 (Porrás et al., 2021).

El SNP rs3020314 se encuentra en el intrón 4 del gen *ESR1* en la posición +2464 y ocasiona un cambio de una citosina por una timina (C→T). Esta ubicación intrónica plantea la posibilidad de que se genere un empalme de RNA conocido como D5ER α y por lo tanto, una delección del exón 5 que ocasiona un codón de terminación prematuro en el exón 6 y, por lo tanto, un receptor que carece de los dominios de unión a hormonas y activación de genes. Se ha sugerido que D5ER α puede ser capaz de activar constitutivamente en ausencia de estrógenos (Porrás et al., 2021; Quan et al., 2014; Dunning et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, este polimorfismo ha sido evaluado en distintas poblaciones; el estudio más reciente realizado por Gebreslasie et al. (2017) describe la asociación del SNP de *ESR1* (rs3020314) con la predisposición al CaMa en mujeres sudanesas y, estudiaron la correlación de los genotipos de este SNP con factores de riesgo. Se observó una asociación significativa de CaMa con el genotipo CT de SNP rs3020314 ($p = 0.02$) en comparación con el genotipo CC de tipo silvestre. Además, el genotipo CT también se asoció con factores de riesgo como un IMC elevado (≥ 25 Kg/m²) y una edad de menarquía temprana (≤ 13 años). Con lo que concluyeron que este SNP podría contribuir a un mayor riesgo de CaMa en las mujeres sudanesas.

En otro estudio realizado por Quan et al. (2014) probaron en mujeres de ascendencia europea y africana las asociaciones entre el riesgo de CaMa y un conjunto específico de 20 genes que se sabe que están involucrados en la síntesis, el metabolismo y la

respuesta de los estrógenos, entre ellos rs3020314. Se observó una asociación significativa de CaMa con el genotipo CT ($p=0.00009$), esto únicamente en mujeres de ascendencia europea. Un tercer estudio que confirma esta asociación es el realizado por Dunning et al. (2009) en el cual encontraron una asociación con un aumento en la susceptibilidad al CaMa con un modo de acción dominante en las poblaciones europeas. Además, el aumento del riesgo parece recluirse en gran medida al riesgo de tumores con RE positivos. La región etiquetada por SNP rs3020314 contiene una secuencia que está más conservada en especies de mamíferos que el resto del intrón 4, y puede alterar sutilmente la proporción de dos formas de empalme de ARNm (26).

2.4 Diagnóstico

La valoración adecuada de los signos y síntomas en relación con la mama, deben tomar en cuenta: edad, factores de riesgo, bilateralidad, exámenes previos, y síntomas. La posibilidad de que una masa palpable sea maligna aumenta a mayor edad, en la posmenopausia y con las siguientes características en el examen físico: consistencia firme, aspecto sólido, bordes irregulares, escaso desplazamiento sobre la piel, la región costal o los tejidos que le rodean, unilateral, no dolorosa y la presencia de adenopatías axilares (Secretaría de Salud, 2011).

Se debe referir a una unidad especializada de mama a las mujeres con:

- Tumoración mamaria de características malignas a cualquier edad.
- Alteraciones de la piel como ulceración, retracción de la piel o pezón, engrosamiento de la piel.
- Nueva tumoración en mujeres con nodularidad preexistente.
- Nodularidad asimétrica que persiste después de la menstruación en mujeres menores de 35 años con antecedentes familiares de CaMa o en mujeres de 35 o más años de edad.
- Descarga sanguinolenta, abundante o persistente por el pezón.

La detección del CaMa con el uso de la mamografía de tamizaje es una herramienta que permite diagnosticar de manera temprana la enfermedad, este estudio se

realiza a partir de los 40 años de edad y así cada 2 a 3 años; en caso de que se encuentre la presencia de una masa palpable en glándula mamaria, se debe realizar el estudio de ultrasonido, además existen otras técnicas de imagen complementarias como son: radiografías, tomografía computarizada (TC) e imagen por resonancia magnética (IRM), aunque el examen de biopsia sigue siendo la mejor opción para la decisión diagnóstica y terapéutica final por su confirmación a través del estudio histopatológico (IMSS, 2017; Liang et al., 2018).

Sin embargo, la detección temprana sigue siendo una parte fundamental para el control del CaMa, ya que la tasa de supervivencia relativa a 5 años llega a ser del 100% si se detecta en estadio 0 o I; mientras que el porcentaje disminuye a 93 y a 72% en los estadios II y III, respectivamente; y se reduce al 22% cuando se diagnostica en el estadio IV (Hernández et al., 2017).

Los métodos de diagnóstico también influyen en la tasa de supervivencia, debido a que se encuentran limitados para las mujeres menores de 40 años, es por ello por lo que se busca explorar enfoques innovadores basados en diagnóstico molecular como la identificación de biomarcadores específicos.

En un estudio previo realizado en San Luis Potosí, S.L.P., por Hernández et al (2017) determinaron la concentración de ácido siálico (AS) en saliva como biomarcador para diagnóstico de CaMa en mujeres. Se evaluaron 206 muestras de saliva, 106 de mujeres sanas y 100 de pacientes con diagnóstico de CaMa. Se determinó la concentración de AS mediante la técnica de Superficie Amplificada por Dispersión Raman (SERS, por sus siglas en inglés "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) producida por nanopartículas de plata (AgNPs) reducidas con citrato, se concluyó que las concentraciones de AS del grupo control (mujeres sanas) presentaban una distribución normal con una media estimada de 3.5 ± 1.0 mg/dL a comparación de las pacientes con CaMa donde existe una amplia dispersión de concentraciones que varían de 5 a 40 mg/dL, con una media de 18.3 ± 9.7 mg/dL.

2.4.1 Ácido siálico como biomarcador

El término «ácido siálico» etimológicamente proviene del griego «*sialos*» cuyo significado es saliva (Reglero et al., 2007). De los diversos ácidos siálicos naturales, el más común es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), es la forma predominante y casi la única que podemos encontrar en fluidos corporales y tejidos humanos (Garimaldi et al., 1983). La fórmula química del AS es $C_{11}H_{19}NO_9$ y está compuesta por un anillo de piranosa que consta de cinco átomos de carbono y un átomo de oxígeno, un N-acetil (N-CH₃CO), un grupo carboxilo (CO-OH) y un residuo de glicerol (C₃H₇O₃). En el ser humano están presentes en líquido cefalorraquídeo, saliva, suero y orina, pero lo más frecuente es que se encuentren formando parte de estructuras macromoleculares glucídicas tales como mucinas, glicoproteínas y glucolípidos (Hernández et al., 2019).

Dentro de este contexto, existe lo que se conoce como sialilación, un estado alterado del mismo está asociado con el cáncer, ya que la sialilación de glicoproteínas regula las propiedades celulares, como la adhesión célula-célula y célula-matriz, la migración de las células, la respuesta a estímulos extracelulares y la interacción con las células inmunitarias. Las células de CaMa utilizan las diversas funciones del AS para su progresión y metástasis (Nagasundaram et al., 2020; Pally et al., 2021).

El AS se biosintetiza en el citosol utilizando N-acetilmanosamina (ManNAc) y se activa con monofosfato de citidina (CMP) en el núcleo, seguido de la adición de AS a las glicoproteínas mediante sialiltransferasas (Nagasundaram et al., 2020). Las sialiltransferasas son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de AS a los oligosacáridos. Estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana de la red trans del aparato de Golgi. Se conocen 20 sialiltransferasas las cuales presentan diferencias en la afinidad por el sustrato que reconocen y se clasifican en función del tipo de enlace que forman. Los AS pueden estar unidos en enlace α -2,3 o α -2,6 a residuos de galactosa (Gal) o en enlace α -2,6 a residuos de N-acetil galactosamina (GalNAc) y en enlace α -2,8 a otro residuo de AS. Los diferentes tipos de enlace que forman da

como resultado una gran diversidad de estructuras derivadas del AS (Morales & Vallejo, 2007).

En las membranas de células bien diferenciadas se encuentra el AS localizado en posición α -2,3. Conforme las células se van diferenciando, la sialiltransferasa encargada de lograr esta posición deja de funcionar, ya que los operones de los genes que transcriben para esta enzima se encuentran afectados, y la glucoproteína comienza a expresar AS en la posición α -2,6. En ciertos procesos patológicos, como la oncogénesis y las metástasis, ocurren alteraciones en la glucosilación que se asocian con el incremento o disminución de su actividad. La sialiltransferasa α -2,6 se sobreexpresa en varios tipos de cáncer, como el mamario, el colorrectal, el hepatocarcinoma y el cervicouterino (Berrones et al., 2012).

Con base a lo anterior, podemos asumir que las actividades fisiológicas del cáncer son dinámicas y aberrantes, lo que a menudo conduce a la generación o sobreexpresión de biomarcadores específicos en comparación con su estado normal (Liang et al., 2018). Se ha propuesto el AS como biomarcador, debido a que se ha encontrado en la membrana de células neoplásicas, incluidas las de mama, su aumento favorece la movilidad celular, facilitando así la separación de las células del tumor primario, con ello su expresión anormal se asocia con carcinogénesis y metástasis tumoral. Además, la cantidad de AS en biofluidos como la saliva y el suero reflejan el tumor maligno porque el AS puede desprenderse o secretarse de las células tumorales (Hernández et al., 2017; Nagasundaram et al., 2020; Vinogradova et al., 2014).

Con esto se ha demostrado que los niveles elevados de AS son un rasgo característico en la saliva de pacientes con CaMa y, por lo tanto, se han sugerido como un marcador predictivo no invasivo para pacientes con este tipo de cáncer (Vinogradova et al., 2014).

Teniendo en cuenta la importancia de las funciones biológicas y fisiopatológicas del AS, se han desarrollado métodos sencillos y sensibles para su detección.

2.4.2 Espectroscopia Raman “SERS”

En 1928, C.V. Raman demostró el concepto de dispersión inelástica de fotones al interactuar con la materia. En esta técnica fotónica se obtiene información química y estructural de diversas sustancias. La frecuencia de los fotones emitidos se desplaza a valores mayores o menores en comparación con la frecuencia de los fotones incidentes, este fenómeno se denomina Efecto Raman (Singh et al., 2012).

El análisis consiste en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia ν sobre la muestra de interés. Los fotones del haz incidente presentan colisiones elásticas (alrededor del 99%) con los átomos de la muestra sin perder energía, sin embargo, el 1% restante de esos fotones presentan colisiones inelásticas en las cuales existe transferencia de energía que modifica la frecuencia de los fotones dispersados que forman la llamada dispersión Raman, la cual contiene información sobre la composición y estructura de la muestra debido a que las moléculas son excitadas a un estado vibracional distintos del que tenían antes del choque (Hernández et al., 2017; Vinogradova et al., 2014).

La diferencia de energía entre los fotones se analiza con un espectrómetro óptico para generar el espectro vibracional "Raman" el cual es único para cada tipo de compuesto y sirve como una "huella digital" para identificarlo. A pesar de ello, la dispersión Raman es un efecto débil y frecuentemente es enmascarado por la fluorescencia. Las muestras biológicas suelen ser fluorescentes y plantean un gran desafío a la hora de registrar espectros Raman (Singh et al., 2012).

Es por ello que en 1974 tras una serie de experimentos por intentar registrar el espectro Raman de la piridina sobre un electrodo de plata, se llegó a la conclusión de que la señal Raman aumentada, no podía explicarse únicamente por el incremento del área superficial producida por el efecto redox, sino que se estaba produciendo el efecto SERS (Hernández et al., 2017).

En SERS, la muestra se adsorbe sobre una superficie metálica rugosa o nanopartículas, generalmente de cobre, plata u oro. La mejora observada en los

espectros SERS se debe principalmente a dos efectos: el efecto electromagnético y el efecto químico (Singh et al., 2012).

El mecanismo electromagnético (ME) del SERS se basa en un fenómeno conocido como plasmón de resonancia superficial localizado (LSPR), el cual crea regiones de intenso campo EM alrededor de la superficie de la nanopartícula que produce mejoras de señal que van desde 10^6 a 10^{12} , combinado con la interacción química directa entre la molécula y la superficie metálica (Hernández et al., 2017; Singh et al., 2012).

El efecto SERS está determinado por tres componentes principales: la molécula, la nanoestructura metálica y la radiación EM. La absorción y dispersión de la luz por las nanopartículas metálicas se considera su propiedad más importante. El factor de intensificación debido al efecto SERS depende de: la forma y tamaño de las nanopartículas y de la distancia a la que se encuentra la molécula sobre la superficie metálica (1-10 nm de distancia) ya que es una técnica de corto alcance (Hernández et al., 2017).

Actualmente, la determinación de AS por SERS tiene un gran potencial, debido a que esta técnica funciona como sonda analítica molecularmente específica para la detección altamente sensible de señales Raman débiles de analitos en bajas concentraciones. Las suspensiones coloidales de plata de tamaño nanométrico son los sustratos SERS más comunes debido a su facilidad de preparación, larga vida útil y alto factor de mejora de la señal Raman que puede excitarse desde la región espectral UV a la infrarroja (Hernández et al., 2017; Vinogradova et al., 2014).

El análisis de AS en biofluido por SERS tiene varias ventajas, como rapidez, bajo costo y no invasividad, y tiene una aplicación clínica potencial (Liang et al., 2018).

Además de lo mencionado anteriormente, el AS también pudiera ser utilizado como biomarcador de riesgo para favorecer la detección temprana de CaMa en las mujeres jóvenes teniendo como factor predisponente, el uso de AH.

Previamente, en nuestro grupo de investigación, se evaluó la relación entre el uso de AH y las concentraciones de AS detectado en saliva en un grupo de mujeres sanas.

Para ellos, las voluntarias se dividieron en 3 grupos: grupo control, uso de anticonceptivos hormonales menor a 4 años y uso de anticonceptivos hormonales mayor a 4 años. Para la cuantificación de AS se utilizó la técnica Raman-SERS, se dividieron en tres grupos las concentraciones obtenidas de AS: normal (≤ 4 mg/dL), en riesgo (> 4 a 7 mg/dL) y alterado (> 7 mg/dL). La concentración máxima de AS detectado fue de 9.2 mg/dL. Todas las voluntarias que utilizaban sistema intrauterino (SIU), el 64% de las que utilizaban anticonceptivos orales y el 75 % de las que usaban implante subdérmico, presentaron concentraciones de riesgo y alterado. Con esto, se concluyó que el uso de AH modifica las concentraciones de AS, presentando una mayor concentración del mismo aquellas voluntarias que utilizaban el SIU, los anticonceptivos orales e implante subdérmico a comparación de las que no (Rodríguez et al., 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el CaMa sigue siendo un problema de salud pública, al ser de mayor incidencia y la principal causa de muerte entre las mujeres a nivel mundial, se requiere orientar la investigación en la detección temprana. En la actualidad, los métodos de detección temprana del CaMa se encuentran limitados, enfocándose principalmente en mujeres mayores a 40 años. Esta situación excluye a un grupo importante de mujeres con riesgo de desarrollar la enfermedad, como las mujeres jóvenes que aún no cumplen con los criterios para la detección convencional, como la mamografía.

Estudios previos han demostrado que el AS medido en muestras de saliva puede ser utilizado como biomarcador de detección temprana llegando a ser una prueba complementaria para el diagnóstico de CaMa, además que pudiera implementarse como prevención, ya que permitiría ampliar el rango de edad para la detección de CaMa, incluyendo a mujeres jóvenes en riesgo.

Desde el punto de vista preventivo, es importante proporcionar más información a las mujeres jóvenes sobre los factores de riesgo asociados al CaMa, principalmente aquellos modificables, como es el uso de AH, el cuál de acuerdo con la OMS la cifra de mujeres en edad reproductiva (15 a 49 años) a nivel mundial en el 2021 fue de 1900 millones, de los cuales, 851 millones usaban AH. Y con ello generar una mayor conciencia sobre su uso, ya que se ha descrito que la exposición prolongada a hormonas endógenas y exógenas (estradiol y progesterona), puede ser la causa de esta asociación con el CaMa. Además, entre los factores no modificables, se encuentran las mutaciones genéticas, en las cuales se han descrito SNP involucrados con la biosíntesis y el metabolismo de estrógenos, uno de ellos en el gen *ESR1* que codifica para una de las isoformas del receptor de estrógeno, denominado rs3020314.

Con base en lo anterior, la evaluación de las concentraciones de AS y determinación del SNP en el gen *ESR1* (rs3020314) a manera de biomarcadores de riesgo pueden favorecer la detección temprana del CaMa ante el uso de anticonceptivos hormonales como factor predisponente.

4. HIPÓTESIS

Mujeres que no usan anticonceptivos hormonales (AH) y que carecen del polimorfismo rs3020314 en el gen *ESR1* tendrán un menor riesgo de desarrollar cáncer de mama (CaMa) a lo largo de su vida y exhibirán concentraciones más bajas de ácido siálico (AS) en comparación con las mujeres que si usan AH o que ya tienen un diagnóstico de CaMa, especialmente aquellas que también presentan el SNP en el gen *ESR1*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar las concentraciones de ácido siálico y determinar el SNP del gen *ESR1* (rs3020314) a manera de biomarcadores de riesgo para favorecer la detección temprana del cáncer de mama ante el uso de anticonceptivos hormonales como factor predisponente.

5.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas metálicas para la calibración y determinación de ácido siálico mediante la técnica Raman-SERS.
- Cuantificar las concentraciones de ácido siálico en mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y en el grupo de mujeres control.
- Evaluar la presencia de SNP *ESR1* (rs3020314) en mujeres diagnosticadas con cáncer de mama y en el grupo de mujeres control mediante PCR tiempo real.
- Establecer la asociación entre el uso de anticonceptivos hormonales y la concentración de ácido siálico en los grupos de estudio.
- Evaluar factores de riesgo modificables y no modificables relacionados con el SNP *ESR1* (rs3020314) como un biomarcador de riesgo de cáncer de mama en mujeres sanas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio clínico

6.1.1 Diseño del estudio

Estudio tipo cuantitativo, analítico, de casos y controles cuyo alcance es correlacional. Por el momento de recolección de datos, se considera retrospectivo y por la cinética del estudio: transversal.

6.1.2 Lugar de realización

Laboratorio de Neurotoxicología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio de Nanotecnología Aplicada, Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT), Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Pacientes consulta privada - Centro de Investigación y Desarrollo Oncológico en las instalaciones del Centro Regional de Enfermedades Oncológicas (CREO), San Luis Potosí, S.L.P.

6.1.3 Universo del estudio

El estudio se llevó a cabo con pacientes diagnosticadas con CaMa y controles sanos.

6.1.4 Método de muestreo

El muestreo fue de tipo no probabilístico, por conveniencia.

6.1.5 Tamaño de muestra

Al tratarse de un estudio piloto, se incluyeron 13 pacientes con diagnóstico de CaMa y 30 controles sanos, con un total de 43 participantes.

6.1.6 Criterios de selección de pacientes

- Criterios de inclusión:
 - ✓ Sexo femenino.
 - ✓ Diagnóstico confirmado de CaMa en cualquier estadio.
 - ✓ Firma del consentimiento informado y cuestionario contestado (datos demográficos, historial reproductivo, antecedentes médicos personales y familiares).
- Criterios de no inclusión:
 - ✓ Diagnóstico de diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedades autoinmunes o procesos inflamatorios.
 - ✓ Embarazo o lactancia.
 - ✓ Consumo de medicamentos antiinflamatorios y corticoesteroides en los últimos tres meses.
- Criterios de eliminación:
 - ✓ Retiro voluntario del estudio antes de concluir el seguimiento.
 - ✓ Limitaciones técnicas para obtener y/o procesar la muestra sanguínea.

6.1.7 Criterios de selección de controles sanos

- Criterios de inclusión:
 - ✓ Sexo femenino.
 - ✓ Edad mayor a 18 años.
 - ✓ Presencia de menstruación.
 - ✓ Firma del consentimiento informado y cuestionario contestado (datos demográficos, historial reproductivo, antecedentes médicos personales y familiares).
- Criterios de no inclusión:
 - ✓ Diagnóstico de CaMa, diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedades autoinmunes o procesos inflamatorios.
 - ✓ Gingivitis o periodontitis (evaluación realizada por médicos estomatólogos de la Facultad de Estomatología de la UASLP).

- ✓ Embarazo o lactancia.
- ✓ Consumo de medicamentos antiinflamatorios y corticoesteroides en los últimos tres meses.
- Criterios de eliminación:
 - ✓ Retiro voluntario del estudio antes de concluir el seguimiento.
 - ✓ Limitaciones técnicas para obtener y/o procesar la muestra sanguínea.

6.1.8 Variables de estudio

Variable	Definición operacional	Valor esperado	Unidades	Tipo de variable	Categorización para el análisis estadístico
Variables dependientes					
Concentración de ácido siálico	Cantidad de ácido siálico en saliva	0-50	mg/dL	Cuantitativa continua	NA
Variables independientes					
Edad	Años cumplidos desde la fecha de nacimiento hasta su inclusión en el estudio	18-90	años	Cuantitativa discreta	NA
Índice de masa corporal (IMC)	Índice del peso de una persona en relación con su altura	16-45	Kg/m ²	Cuantitativa continua	NA
Grasa corporal	Masa total de grasa dividida por la masa corporal total, multiplicada por 100	18-50	%	Categórica nominal	< 33% = 0 33 – 39 % = 1 > 39% = 2
AH	Uso de AH en la paciente/voluntaria	a) Sí b) No	NA	Categórica nominal	Si = 0 No = 1
Antecedentes de familiares con cáncer	Presencia de cáncer en la familia de la paciente/voluntaria	a) Sí b) No	NA	Categórica nominal	Si = 0 No = 1
SNP <i>ESR1</i> (rs3020314)	SNP encontrado en el gen <i>ESR1</i> que se ha relacionado con el CaMa	a) CC b) CT c) TT	NA	Categórica nominal	CC = 0 CT = 1 TT = 2

Clasificación histológica de CaMa	Tipo histológico determinado por patología en biopsia de tumor.	a) Ductal b) Lobulillar c) Mixto d) Otros e) Benigno	NA	Categórica nominal	Ductal = 0 Lobulillar = 1 Mixto = 2 Otros = 3 Benigno = 4
Estadio clínico	El estadio otorgado clínicamente al momento del diagnóstico	a) 0 b) Ia c) IIa d) IIb e) IIIa f) IIIb g) IIIc h) IV	NA	Categórica ordinal	0 = 0 Ia = 1 IIa = 2 IIb = 3 IIIa = 4 IIIb = 5 IIIc = 6 IV = 7
Receptor de estrógeno	Determinación de receptores estrógenos por inmunohistoquímica	a) Positivo b) Negativo	NA	Categórica nominal	Positivo = 1 Negativo = 2
Receptor de progesterona	Determinación de receptores progesterona por inmunohistoquímica	a) Positivo b) Negativo	NA	Categórica nominal	Positivo = 1 Negativo = 2
HER2NEU	Determinación de HER2NEU por inmunohistoquímica	a) Positivo b) Negativo	NA	Categórica nominal	Positivo = 1 Negativo = 2

Tabla 1. Variables de estudio

6.1.9 Aspectos éticos

El protocolo del trabajo se sometió al Comité Estatal de Ética en Investigación en Salud, obteniendo su aprobación con el número de registro estatal: SLP/13-2022.

En cuanto a la garantía de confidencialidad, la información personal y médica que se proporcionó para este estudio fue de carácter estrictamente confidencial y fue utilizada únicamente por el equipo de investigación de este proyecto y no estuvo disponible para ningún otro propósito. Esta información se conjuntó con la de otros participantes para realizar el presente estudio. Con la finalidad de mantener el anonimato, se le asignó un código a cada participante para el uso de sus datos.

6.1.10 Plan de trabajo

El reclutamiento de las pacientes diagnosticadas con CaMa se realizó por medio de sus consultas de seguimiento y primera vez en consulta privada en el Centro Regional de Enfermedades Oncológicas (CREO), se les hizo una invitación a participar en el protocolo de investigación siempre y cuando cumplieran con los criterios de selección, una vez aceptada su participación voluntaria, se les fue entregada la carta de consentimiento informado.

El reclutamiento de los controles sanos se realizó por medio de una infografía en el cual se invitó a participar en el protocolo de investigación a las voluntarias que cumplieran con los criterios de selección. Las voluntarias interesadas fueron citadas en el Centro Regional de Enfermedades Oncológicas (CREO) para la entrega de la carta de consentimiento informado.

Las pacientes y voluntarias interesadas en participar, firmaron su carta de consentimiento informado y posteriormente se les aplicó un breve cuestionario para recopilar los datos necesarios para efectuar el estudio.

El cuestionario tuvo la finalidad de obtener información general, salud ginecológica, antecedentes ginecológicos, antecedentes familiares y hábitos y costumbres. En la sección de información general, se preguntó la escolaridad, la ocupación y el estado

civil, con la finalidad de usar estos datos para describir ambos grupos mediante estadísticas descriptivas; el número de teléfono se usó como medio de contacto para la entrega de resultados. Además, en la sección de antecedentes ginecológicos se preguntó si se usó o habían usado anticonceptivos hormonales, así como el tipo de anticonceptivo hormonal, la marca y el tiempo de uso (Anexo 3 y 5). Para mantener el anonimato y la confidencialidad de los datos personales, se le asignó un código a cada participante, con la finalidad de evitar asociarse o vincularse con la titular de estos.

Una vez contestado el cuestionario, a cada participante se les tomaron datos antropométricos como estatura, peso y porcentaje de grasa corporal. Seguido a esto, se pasó a la toma de muestra, se recolectó una muestra de saliva y una muestra de sangre venosa periférica.

6.1.10.1 Toma de muestra de saliva

Para la recolección de la muestra de saliva a cada paciente / voluntaria se le indicó realizarse una limpieza oral que consistía en un cepillado dental vigoroso para posteriormente esperar 3 minutos antes de depositar de 1.0 a 1.5 mL de saliva en un vial estéril. Las muestras se conservaron a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

6.1.10.2 Toma de muestra de sangre

Posterior a la muestra de saliva, las pacientes / voluntarias fueron sometidos a un procedimiento de toma de muestra sanguínea en la vena cubital media, recolectando una muestra en un tubo BD Vacutainer™ de 3 mL adicionado con EDTA como anticoagulante, para la posterior extracción y análisis de ADN para la evaluación del polimorfismo del gen *ESR1* (rs3020314).

6.1.10.3 Análisis de muestras de saliva

Las muestras de saliva al ser recolectadas se conservaron a una temperatura de 4°C. En cuanto al tratamiento previo a su análisis, las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm por 5 min, esto con la finalidad de conservar el sobrenadante en el cuál se encuentra el ácido siálico libre, el sobrenadante se transfirió a otro vial, las muestras

ya tratadas se almacenaron a 4°C hasta el día de su análisis, en el cual se mezclaron con AgNPs para después medir la concentración de AS por la técnica de Espectroscopía RAMAN-SERS.

6.1.10.4 Análisis de muestras sanguíneas

Las muestras de sangre al ser recolectadas se conservaron a una temperatura de 4°C hasta su extracción de ADN genómico en un periodo no mayor a 5 días.

6.2 Equipo y reactivos

6.2.1 Equipo

- Parrilla de calentamiento con agitación magnética MS-H340-S4 de 4 posiciones, DLAB.
- Dispersión de luz dinámica (DLS) Nano Zetasizer Malvern, Modelo Zen 3600.
- Microscopio Hitachi STEM-5500 equipado con campo brillante, modo STEM y detectores campo oscuro.
- Raman de HORIBA Jobin Yvon XploRA Plus acoplado a un microscopio óptico Olympus BX41.
- Sistema de filtración al vacío “Millipore”.
- Balanza analítica.
- Centrifuga refrigerada.
- Ultracongelador.
- Nanodrop Thermo Scientific.
- Termociclador BIO-RAD CFX96 Touch Real Time PCR.

6.2.2 Reactivos

- Nitrato de plata (AgNO_3 , 99.99%), Citrato trisódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) de grado analítico adquiridos en Sigma-Aldrich.
- Agua desionizada.
- Blood DNA Preparation – Solution Kit (Jena Bioscience).
- Ensayo de genotipado TaqMan®.
- qPCR ProbesMaster (Jena Bioscience).
- Agua grado biología molecular.
- Etanol e isopropanol grado biología molecular.

6.3 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas utilizada fue la del método de Turkevich que se basa en la reducción de iones plata en una disolución acuosa de citrato de sodio, para después realizar la calibración de la cuantificación de ácido siálico por la técnica de Raman-SERS (28).

6.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

Se realizó la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) por el método de Turkevich, partiendo de una solución de nitrato de plata (2.5 mM) en agua desionizada, la cual se calentó hasta lograr una ebullición alrededor de los 95°C, posteriormente se le añadió una solución de citrato trisódico (2.5 mM). Al pasar 40 minutos, la reacción se tornó de incolora a un color amarillo grisáceo, lo que indica la formación de nanopartículas. Se llevó a cabo el lavado de las AgNPs por centrifugación a ciclos de redispersión con agua desionizada tres veces, y se realizó su caracterización.

6.3.2 Caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs)

6.3.2.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS por sus siglas en inglés, “Dynamic Light Scattering”) es una técnica la cual nos ayuda a medir las características físicas de partículas en solución por debajo del intervalo del micrón (10 nm a 100 nm).

Las AgNPS fueron caracterizadas con un equipo DLS Zetasizer Nano Malvern Panalytical modelo Zen 3600 empleando las siguientes características: temperatura a 25°C, láser estándar 633 nm y a 4 mW de potencia para la medición del tamaño promedio y potencial Z. Todas las mediciones fueron realizadas por 5 corridas de 15 segundos por triplicado. Para ambas mediciones se utilizó agua desionizada como dispersante.

Las mediciones de potencial Z nos definen la estabilidad del coloide, de acuerdo con una propiedad física en la cual las cargas superficiales neta de las nanopartículas, se repelen unas a otras evitando así su aglomeración.

6.3.2.2 Espectroscopía de Transmisión Óptica

Los espectros de absorbancia óptica se registraron en un espectrofotómetro Cary 100 UV y visible (UV-Vis) en el rango de 200 a 800 nm, además del software Origin Pro 2018. El registrador de gráficos generalmente grafica la absorbancia contra la longitud de onda (nm) en la sección UV y visible del espectro EM.

6.3.2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión

Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de alta resolución de las AgNPs.

Para la evaluación de las AgNPs, fue necesario realizarle un lavado para eliminar el citrato, ya que la finalidad no fue observarlo en el microscopio, para eso se colocaron 500 μ L de AgNPs en un vial, se agregaron 2.5 mL de etanol y se realizaron dos lavados en la centrifuga a 4500 rpm por 8 min, por último se agregó etanol hasta obtener una muestra color transparente opaco. Para el preparado, se utilizó una rejilla de cobre recubierta de carbono, se colocaron 8 μ L de la preparación anterior y se dejó secar al aire libre.

6.3.3. Calibración de ácido siálico mediante la técnica Raman-SERS

Para la calibración de AS fue necesario preparar una serie de soluciones que correspondían a la curva de calibración del mismo. Estas soluciones se prepararon con Ácido N-acetilneuramínico (Neu-5Ac) de grado analítico adquirido en Sigma-Aldrich, las concentraciones a preparar fueron de 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/dL, respectivamente.

Para las mediciones por Espectroscopia Raman se utilizó el equipo Raman de HORIBA Jobin Yvon XploRA Plus acoplado a un microscopio óptico Olympus BX41, empleando un rango de medición de 400 – 1800 nm, 40 segundos de tiempo de adquisición 3

acumulaciones y una fuente de láser verde de 532 nm. El haz del láser se enfocó al centro de la muestra con el objetivo de 20 x. Debido a que las muestras eran líquidas fueron depositadas en una placa de aluminio con pozos de capacidad de 100 μL cada uno.

Para la técnica SERS, primero se midió el espectro Raman de las AgNPs (50 μL), posteriormente las AgNPs en combinación con agua desionizada en una relación 2:1 y finalmente se prosiguió con la medición de cada una de las concentraciones de la curva de calibración siguiendo la misma relación.

La fluorescencia fue removida con el software Vancouver Raman Algorithm, para después graficar con el software OriginPro 2018.

6.3.4 Medición de ácido siálico en muestras de saliva

Para la obtención de las concentraciones de AS en saliva se hace una recalibración diaria del AS para poder comparar en las mismas condiciones instrumentales mencionadas anteriormente los niveles de AS en saliva.

Las muestras de saliva una vez recolectadas, se centrifugaron a 6000 rpm por 5 min para obtener el sobrenadante y mezclarlo con las AgNPs; las muestras se colocaron en pozos de un sustrato de aluminio en una relación 2:1 (50 μL de AgNPs y 25 μL de saliva) para posteriormente medir la concentración de ácido siálico (AS) por Espectroscopia Raman-SERS.

La fluorescencia fue removida con el software Vancouver Raman Algorithm, para después graficar con el software OriginPro 2018.

6.4 Genotipificación del polimorfismo del gen *ESR1* (rs3020314)

Para la evaluación del polimorfismo SNP del gen *ESR1* (rs3020314) se empleó el método de discriminación alélica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real mediante sondas TaqMan.

6.4.1 Extracción de ADN genómico

Las extracciones de ADN genómico se realizaron a partir de sangre venosa periférica por medio de un kit de purificación de ADN basado en soluciones (Jena Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADN, se cuantificó usando el equipo Nanodrop Thermo Scientific; por otro lado, también se evaluó la pureza empleando el cociente de absorbancias 260/280 con un valor óptimo de 1.8 a 2.0.

Con la finalidad de utilizar concentraciones homogéneas de ADN para todas las muestras en estudio, se realizaron diluciones de 20 ng/ μ L, para así obtener una concentración final de 90 ng de ADN genómico por pocillo de reacción. El volumen final de reacción fue de 10 μ L.

6.4.2 PCR tiempo real

Para llevar a cabo la reacción de amplificación se utilizó el kit qPCR ProbesMaster (Jena Bioscience). Primero se preparó una mezcla maestra con el Master Mix, las sondas Taq Man específicas del SNP rs3020314 del gen *ESR1* (ThermoFisher Scientific, catálogo #4351379) y el agua de grado biología molecular. Finalmente se añadía la plantilla de ADN genómico purificado antes mencionada, cada una de las muestras fue analizada por duplicado.

La secuencia de las sondas TaqMan específicas se proporciona en la orientación de la cadena del genoma (+) en relación con el genoma de referencia del *Centro Nacional para la Información Biotecnológica* (NCBI, por sus siglas en inglés).

Los alelos SNP se incluyen entre paréntesis, donde el orden de los alelos corresponde a la asociación con los fluorocromos de la sonda, donde [Alelo 1 = fluorocromo VIC™ / Alelo 2 = fluorocromo FAM™].

Para llevar a cabo la PCR se utilizó el equipo BIO-RAD CFX96 Touch Real Time PCR.

Para el análisis de resultados el software utilizado fue Bio-Rad CFX Manager, en el cuál se realizó una discriminación alélica arrojando los siguientes resultados:

- Alelo 1 – CC (Homocigoto silvestre)
- Heterocigoto – CT
- Alelo 2 – TT (Homocigoto mutado)

De acuerdo con estos resultados, quienes presentaron el genotipo “Heterocigoto – CT” contaban con la presencia del SNP del gen *ESR1* (rs3020314). Por el contrario aquellas que tuvieron el genotipo CC o TT, no lo tenían.

6.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos, en los que se evaluaron, medias, desviaciones estándar (DE), frecuencias, porcentajes y percentiles. Posteriormente se realizó el análisis de los datos para evaluar el tipo de distribución mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($n < 50$).

Para evaluar la diferencia de cada variable entre los grupos (pacientes y controles) se utilizaron las pruebas estadísticas de *t* de Student o U de Mann-Whitney en base a la normalidad de los datos, paramétricos y no paramétricos, respectivamente.

También se realizó un análisis multivariado a través de regresión logística para identificar factores de riesgo para CaMa modificables y no modificables asociados con la presencia del SNP del gen *ESR1* (genotipo CT).

El análisis estadístico se realizó con el paquete GraphPad Prism 8 y STATA.

7. RESULTADOS

7.3.1 Características demográficas y clínicas

Se analizaron un total de 43 muestras, de las cuales 13 fueron pacientes diagnosticadas con CaMa (grupo de casos) y 30 mujeres sanas como grupo control. Las características demográficas descriptivas y los principales factores de riesgo para CaMa tanto de las pacientes como de los sujetos control se resumen en la tabla 5, para el caso de las pacientes, dos de ellas no respondieron su estado civil, y una de ellas no contaba con su historia clínica.

Las pacientes presentaron una media de 59.8 años y el grupo control 27.3 años. El 100% de las pacientes eran casadas y el 83.3% de los controles eran solteras. De acuerdo con el grado de escolaridad, el 76.9% de las pacientes y el 66.7% de los controles sanos concluyeron una licenciatura. Estas tres características tuvieron una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$).

Para los datos antropométricos se evaluaron la talla, el peso, el IMC y el porcentaje de grasa corporal. La talla se midió en metros (m) y el peso en kilogramos (Kg), la media \pm DE para los casos fue de 1.64 ± 0.05 m y 65.8 ± 9.11 Kg, y la media para los controles fue de 1.60 ± 0.06 m y 64.5 ± 11.82 Kg. Con base en estos datos se calculó el IMC, observándose un resultado de 24.9 ± 2.85 Kg/m² y 25.1 ± 3.7 Kg/m² para los casos y controles, respectivamente. Para el porcentaje de grasa corporal se utilizó una báscula de bioimpedancia, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (26.5 % para casos y 38.9 % para controles; $p < 0.0001$).

No se observó una diferencia estadísticamente significativa para la menarquía en años (12 años para ambos grupos), visita al ginecólogo, el hábito de fumar y realizar actividad física. Por el contrario, el embarazo, el uso de AH y la historia familiar de cáncer, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0.05$) (tabla 5).

Las características clínico-patológicas de los casos de CaMa se resumen en la tabla 6, el tipo histológico más común entre las pacientes fue el carcinoma ductal y en su mayoría (75 %) fueron diagnosticadas en etapas localmente avanzadas (IIB-IIIIC). También se obtuvieron datos de la expresión de los receptores por inmunohistoquímica, el 66.7 % y 50 %, de las pacientes tuvo una expresión positiva del RE y de RP, respectivamente, sin embargo, el 33.3 % de los casos tuvo una expresión positiva del receptor HER2NEU. En cuanto al subtipo molecular el 41.6 % se catalogaron en luminal A, 25% en luminal B, 16.6 % en Her2+ y 16% triple negativo (nula expresión de receptores).

7.2 Medición de ácido siálico

7.2.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs)

Se realizó una síntesis de AgNPs por el método de Turkevich en base a la reducción de iones plata en disolución acuosa de citrato de sodio, la caracterización se llevó a cabo en la solución de nanopartículas obtenidas posterior a sus respectivos lavados.

Para la primera caracterización se utilizó el equipo DLS Zetasizer Nano Malvern Panalytical modelo Zen 3600 empleando las siguientes características: temperatura a 25°C, láser estándar 633 nm y a 4 mW de potencia, esto con la finalidad de medir el tamaño de las nanopartículas así como su potencial Z.

7.2.1.1 Tamaño AgNPs

La técnica de DLS permite medir las características físicas de partículas en solución por debajo del intervalo del tamaño del micrón, que va desde los 10 nm a 100 nm.

En la Fig. 7.1 se muestra la distribución de tamaño de las AgNPs sintetizadas. La muestra fue leída por triplicado, por lo cual los tamaños de nanopartículas varían. Esta variación se puede observar al mostrarse dos picos de 22.5 y 153.3 nm, con una intensidad de 10.6 y 89.4 %, respectivamente, con un promedio de 84.76 nm.

7.2.1.2 Potencial Z de AgNPs

El potencial Z es un criterio que mide la estabilidad de las nanopartículas en solución, se considera estable en valores de potencial zeta superiores a + 30 mV o inferiores a - 30 mV. La Fig. 7.2 muestra la distribución de potencial Z de las AgNPs, la muestra fue leída por triplicado obteniendo una media de - 34 mV.

7.2.1.2 Espectroscopia de Transmisión Óptica

La Espectroscopia de Transmisión Óptica genera un espectro Uv-Vis el cual nos confirma la formación de AgNPs preparadas en líquido por el método de reducción química. En la Fig. 7.3 el espectro muestra una banda con una absorción máxima en 412 nm a una absorbancia de 0.92.

7.2.1.3 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopia electrónica de transmisión (TEM) es una herramienta importante para la caracterización de nanomateriales. Debido a su alta resolución, es posible obtener imágenes de las columnas de átomos que conforman una muestra. En la Fig. 7.4 se muestran las imágenes que confirman el tamaño y la forma cuasi esférica de las AgNPs a una concentración de 2.5 mM.

7.2.2 Calibración de ácido siálico por la técnica Raman-SERS

Inicialmente, se determinaron los espectro Raman de referencia: AS en estado sólido, el coloide de AgNPs y la combinación de AgNps con una solución de AS a 200 mg/dL, para posteriormente realizar la curva de calibración con base en las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/dL respectivamente.

En la Fig. 7.5 se muestran las bandas más significativas para los espectros Raman de: AS en estado sólido, las AgNPs y la combinación de AgNPs con una solución de AS a 200 mg/dL. Para el espectro Raman de AS sólido se observaron las bandas: 647, 846, 945, 1001, 1110, 1258, 1656 y 1726 cm^{-1} , las cuales corresponden a modos de vibración característicos de este compuesto.

Posteriormente en el espectro Raman de las AgNPs, se pueden observar las bandas características en 924, 952, 1023 y 1607 cm^{-1} . Además, los modos de vibración más amplios nos indican la interacción entre el ión citrato con la superficie del metal.

Finalmente, se muestra el espectro Raman SERS del AS a 200 mg/dL adsorbido en las AgNPs. Las bandas SERS más significativas se encuentran en: 1002, 1237 y 1391 cm^{-1} , atribuidas a las vibraciones del anillo de piranosa, acetamida y grupos carboxilo, respectivamente. Algunas bandas que sobresalen un poco después de los 1500 cm^{-1} (1559 y 1585 cm^{-1}) se han asignado a residuos de iones citrato.

En la Fig. 7.6 se puede observar como el espectro Raman de las AgNPs por si solas no tienen una intensidad tan marcada. Podemos comprobar el efecto Raman SERS ya que cuando combinamos las AgNPs con la solución de AS a 200 mg/dL, la señal se amplifica hasta 3 veces su magnitud con la ayuda de las nanopartículas, respecto al espectro Raman del AS sólido.

Para las mediciones de AS en saliva fue necesario realizar una curva de calibración, para ello se partieron de las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/dL, las cuales se realizaron en base a AS comercial (Sigma-Aldrich).

En la Fig. 7.7 se muestran los espectros Raman SERS de todas las disoluciones que se usaron para la curva de calibración, se puede observar cómo va aumentando la señal Raman de la misma manera que aumenta la concentración de AS, es importante mencionar que las AgNPs utilizadas fueron las mismas para cada una de las mediciones. Las bandas SERS más significativas que se encuentran en todos los espectros son: 1002, 1237 y 1391 cm^{-1} , que se encuentran en el eje X, y en el eje Y podemos comprobar como la intensidad Raman va aumentando conforme la concentración de AS. De esta manera se pudo proseguir con la medición de AS en muestras de saliva del grupo de controles y pacientes.

7.3.2 Concentración de ácido siálico en saliva

En esta etapa de resultados se midió la concentración de AS en saliva de doce muestras de pacientes y de treinta muestras de voluntarias. Una de las muestras de

pacientes presentaba una saturación en la medición y por lo tanto no se pudo obtener su espectro.

En la Fig. 7.8 se muestra un diagrama de cajas en el cuál podemos observar que la concentración de AS en ambos grupos difiere significativamente.

Los datos se presentan como mediana (cuartil inferior a cuartil superior). Debido a la distribución no paramétrica de los datos, se utilizó la prueba estadística U de Mann Whitney. La mediana de concentración de AS fue de 16.95 mg/dL y 5.51 mg/dL, para el grupo de pacientes y controles (Tabla 7), también se evaluó el valor de p dando así un resultado de $p < 0.05$, con el cuál se comprueba que la concentración de AS en ambos grupos tiene una diferencia estadísticamente significativa.

También se decidió evaluar la concentración de AS en función del estadio clínico. Como solo hubo dos pacientes en estadio IV, se agruparon con las pacientes en estadio III. En la Fig. 7.9 se muestra un diagrama de cajas en el cuál podemos observar la concentración de AS en función del estadio clínico. Los valores numérico se muestran en la Tabla 8 como la mediana (cuartil inferior a cuartil superior).

Debido a que el número de pacientes fue reducido y por lo tanto, los datos de cada grupo, no se realizó un análisis estadístico.

Cómo en el presente estudio también se evaluó el uso de AH como factor predisponente, se dividió al grupo control ($n=30$) en grupo con uso de AH ($n=20$) y grupo sin AH ($n=10$) (Fig.7.10). Al realizar esta división, se verificó la normalidad de los datos, resultando una distribución paramétrica. Se realizó el análisis t de student para evaluar si había una diferencia de la concentración de AS entre ambos grupos, obteniendo una concentración de 5.45 y 5.62 mg/dL, respectivamente (Tabla 9).

De acuerdo con el análisis, en el grupo control no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de AS entre usar AH o no.

7.3 Factores de riesgo en grupo control

Debido a que únicamente se incluyeron 13 pacientes y no se logró incorporar el número mínimo deseado (n=30). Se decidió analizar únicamente los factores de riesgo tanto modificables (IMC, grasa corporal, uso de AH, actividad física) y no modificables (menarquía e historia familiar de cáncer) en el grupo control los cuales se resumen en la tabla 10. Como se puede observar la mayoría de las mujeres sanas presentaron un IMC normal con una media de 22.49 Kg/m², el 56.7% realizaban actividad física y el 66.7% tuvo una edad de menarquía \geq 12 años. Sin embargo, aunque la mayoría presentó un IMC normal, no fue el mismo caso con el porcentaje de grasa corporal, ya que 23 de ellas presentaron $>$ 35% de grasa corporal con una media de 41.57 %, el 70 % utilizaban AH y el 63.4 % refirió tener historia familiar con cáncer.

De igual manera se hizo el mismo análisis pero evaluando solo a los controles que usaban AH (n=20), en la tabla 11, se puede observar que se sigue manteniendo la misma tendencia, en su mayoría IMC normal (media de 22.27 Kg/m²), porcentaje de grasa corporal $>$ 35 (media de 40.34 %), menarquía \geq 12 años e historia familiar de cáncer, únicamente la realización o no de la actividad física fue la misma.

Por último, en la tabla 12, se muestra el número de factores de riesgo (IMC mayor a 25 Kg/m², grasa corporal mayor a 35 %, sedentarismo, edad de menarquía menor a 12 años, historia familiar de cáncer presente en los controles con y sin uso de AH. Como se puede observar, son pocas las mujeres del grupo control que presentan menos de 2 factores de riesgo, independientemente del uso o no de AH.

En el grupo control 20 mujeres sanas utilizaban AH, de acuerdo con el tipo un 60% usaban tabletas orales, un 15% parche transdérmico, un 5% inyecciones, un 15% implante subdérmico y un 5% DIU (Fig. 7.11).

A su vez se determinó la concentración de AS de acuerdo con el tipo de AH (tabla 13 y Fig.7.12), para las tabletas orales se obtuvo una media de 5.28 mg/dL, el parche de 5.21 mg/dL y el implante de 5.86 mg/dL. Las inyecciones y el DIU presentaron una frecuencia de uno, por lo cual se obtuvo una concentración de AS de 7.29 y 5.08 mg/dL,

respectivamente. De esta manera, con el implante y las inyecciones, se tuvieron concentraciones de AS por encima de la mediana en el total de los controles (5.62 mg/dL) y por la media en total de los controles que usaban AH (5.45 mg/dL).

7.4 Genotipificación del polimorfismo rs3020314

En la Fig. 7.13 y 7.14, se muestran las gráficas de discriminación alélica de los resultados del grupo control y pacientes, respectivamente.

Debido a que no se logró reclutar en pacientes la N mínima planteada en la propuesta de investigación (N=30) no fue posible realizar una comparación con suficiente potencia estadística con el grupo de controles (N=30), por lo que solo se presentan las frecuencias de alelos y genotipos en la tabla 14 como resultados preliminares.

La frecuencia relativa de cada alelo fue 0.346 para C y 0.654 para T en pacientes con CaMa y 0.53 para C y 0.47 para T en controles. De acuerdo con la frecuencia de genotipos, la variante homocigota silvestre (CC) se presentó en 1 (7.7 %) paciente y en 9 (30 %) controles. Para el caso de las pacientes, las variantes heterocigota (CT) y homocigota mutada (TT) se presentó en 6 (46.6 %) cada una. En cambio, en el grupo control, la variante CT fue la más frecuente en un 46.6 %, y la variante TT la menos frecuente con un 23.4 %.

7.4.1 Regresión logística multivariada

De las variables consideradas en el modelo, no se encontró asociación entre los factores de riesgo para CaMa y la presencia del SNP del gen *ESR1*.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Debido a que en México esta información es limitada, en el presente trabajo se decidió evaluar biomarcadores de riesgo para el CaMa, como lo son el ácido siálico y el SNP en el gen *ESR1* (rs3020314) con la finalidad de generar una investigación con enfoque preventivo y de detección temprana (Chávarri et al., 2012).

De acuerdo con nuestros resultados, existe una diferencia de edad entre ambos grupos, ya que las pacientes tuvieron una media de 59.8 años y el grupo control de 27.3 años (tabla 5). De esta manera, contar con un grupo control más joven nos permitió evaluar de manera más específica los factores de riesgo que pudieran estar presentando las jóvenes, como es el caso de un IMC en sobrepeso u obesidad, porcentaje de grasa corporal elevado (> 35 %), el uso de AH en su mayoría, así como historia familiar con cáncer. Con ello no se descarta que para futuros proyectos se amplíe el rango de edad para poder llegar a una media comparable en ambos grupos, como sería lo ideal.

Para las características clínico-patológicas, el tipo histológico más común entre las pacientes fue el carcinoma ductal, dentro de este diagnóstico el 75 % presentó etapas localmente avanzadas (IIB-IIIC). En cuanto a los receptores el 66.7 % tuvo una expresión positiva del RE, el 50 % del RP y un porcentaje más bajo (33.3 %) tuvo una expresión positiva de HER2.

En cuanto al subtipo molecular, el luminal A y B fueron los más frecuentes (41.6 % y 25 %, respectivamente) seguidos por el subtipo Her2 + y finalmente el triple negativo (16.6 % estos dos últimos).

Con base en lo anterior, aunque el número de pacientes fue reducido, nuestros resultados reflejan en gran parte el comportamiento de la enfermedad a nivel nacional. En un estudio de revisión realizado por Chavarri et al. (2012), los autores reportaron entre los resultados más relevantes de diversos estudios que alrededor del 80 % de las pacientes presentaron enfermedad localmente avanzada o metastásica. También encontraron que el 57% de las participantes presentaron tumores con receptores

hormonales positivos, seguidos de tumores Her2 + en un 20% y enfermedad triple negativa en un 23%.

En el estudio realizado por Carrillo et al. (2019) evaluaron distintos SNP (rs2234693 y rs9340799) en el gen *ESR1*. En este trabajo participaron 507 pacientes con CaMa. Los autores reportaron que el 91 % presentaba carcinoma ductal como tipo histológico y el 67 % fueron diagnosticadas en etapas localmente avanzadas. Con respecto al subtipo molecular, el 46 % presentó tipo Luminal A, el 20% Luminal B, el 12 % Her2 + y el 22% triple negativo. Como se puede observar, al comparar las cifras obtenidas en nuestro estudio con otras reportadas de CaMa presente en mujeres mexicanas, son muy similares.

Para la determinación de AS en saliva fue necesario realizar en primera instancia la síntesis de AgNPs para la cual se utilizó el método de Turkevich que implementa la reducción de iones plata en disolución acuosa de citrato de sodio (Hernández, 2019; Vinogradova et al., 2014). Posteriormente, se llevó a cabo su caracterización por DLS, espectroscopia de transmisión óptica y microscopia electrónica de transmisión. El equipo DLS, mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño, por lo que las nanopartículas deben medir de 1 a 100 nm de preferencia. De acuerdo con la distribución de tamaño obtenida de nuestras muestras, el promedio de las nanopartículas se encontraba en 84.76 nm como se observa en la Fig. 7.1.

Es importante señalar que el tamaño de las AgNPs puede variar de una síntesis a otra, en un estudio realizado por Hernández et al. (2017) realizaron mediciones de AS con cinco diferentes distribuciones de AgNPs: 5 a 50 nm, 80 ± 30 nm, 65 ± 20 nm, 110 ± 30 nm y 20 a 150 nm. Las mediciones se realizaron en una muestra control y de una paciente con CaMa, dando los siguientes resultados: 3.2 mg/dL, 3.4 mg/dL, 2.9 mg/dL, 3.6 mg/dL y 3.1 mg/dL con una media de 3.24 ± 0.27 mg/dL para la muestra control y 20.1 mg/dL, 19.7 mg/dL, 20.1 mg/dL, 19.5 mg/dL y 20.4 mg/dL con una media de 19.96 ± 0.36 mg/dL para la muestra de paciente. Con esto se demuestra la reproducibilidad de la metodología y que los resultados de la concentración de AS son confiables, ya que se traslapan los valores medios en la incertidumbre experimental del método.

Para evaluar la estabilidad de las nanopartículas en solución se midió el potencial zeta, el cual es una propiedad de los materiales que miden el potencial electrocinético en sistemas coloidales, lo que nos indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión (Mayoral et al., 2014). Una solución se considera estable con valores de potencial zeta superiores a + 30 mV o inferiores a - 30 mV. El potencial zeta de nuestras AgNPs presentó una media de - 34 mV, debido a que nuestras partículas son lo suficientemente pequeñas, este potencial zeta nos indica que la solución es estable y por lo tanto se resistirá a la agregación, lo cual es indispensable para la correcta adsorción del AS y las AgNPs al momento de su análisis.

Para la espectroscopia de transmisión óptica se obtuvo un espectro Uv-Vis (Fig. 7.3) que muestra una banda con una absorción máxima en 412 nm a una absorbancia de 0.92, esta banda surge de la resonancia de plasmones de superficie característica de AgNPs a nano escala, lo que confirma su formación por el método de reducción química. Comparando nuestros resultados, estos son similares a los obtenidos por Vinogradova et al. (2014) donde también realizaron la síntesis de AgNPs por el método de Turkevich y obtuvieron una banda de absorción máxima de 403 nm, al igual que Hernández et al. (2019), en el cual también obtuvieron una banda de absorción máxima en el mismo rango (428 nm).

Por último se realizó microscopia de transmisión óptica, la cual es una herramienta fundamental para la caracterización de nanomateriales, ya que nos permite obtener imágenes de alta resolución al punto de obtener imágenes de las columnas de átomos que conforman una muestra. Las imágenes TEM que se muestran en la Fig. 7.4 confirman el tamaño y la forma cuasi esférica de las AgNPs a una concentración de 2.5 mM, el tamaño que se puede observar en las imágenes coinciden con el tamaño promedio que se obtuvo por DLS, aproximadamente de 80 nm.

Una vez caracterizadas las AgNPs, se realizó la calibración de AS por Espectroscopia Raman-SERS, en base a tres espectros de referencia: AS sólido, el coloide de AgNPs y la combinación de AgNPs con una solución de AS a 200 mg/dL.

La estructura relajada del AS está formada por carboxilo, hidroxilo, N-acetilo y una cadena lineal que se asemeja a la estructura del glicerol, además tiene 114 modos vibratorios que son infrarrojos y Raman activos. Para el espectro Raman del AS sólido se obtuvieron las principales bandas en: 647, 846, 945, 1001, 1110, 1258, 1656 y 1726 cm^{-1} , que de acuerdo con Vinogradova et al. (2014) el espectro se puede dividir en tres rangos espectrales principales: de 500 a 950 cm^{-1} , se atribuyen a vibraciones debidas a grupos CO(CH) o sus sustitutos en el anillo de piranosa, de 950 a 1200 cm^{-1} , modo de estiramiento C-O con alguna contribución de vibraciones de estiramiento C-C, y de 1200 a 1500 cm^{-1} con vibraciones deformativas como las que involucran funcionalidades HCH y CH₂OH.

La banda ubicada en 647 cm^{-1} se le asigna al modo de balanceo CH₂ en el ciclo de piranosa, la banda 845 cm^{-1} se da por el estiramiento C-O en la cadena de glicerol, la banda 1001 y 1110 cm^{-1} corresponde a la deformación C-O-C, las bandas 1258, 1656 y 1726 cm^{-1} indican el modo amida III y amida I, respectivamente (Vinogradova et al., 2014; Hernández et al., 2019).

En el espectro Raman de las AgNPs se pueden observar las bandas características en 924, 952, 1023 y 1607 cm^{-1} , estos modos se atribuyen a los grupos carboxilato de anclaje ubicados en el campo de plasmones de superficie de la plata. Munro et al. (1995) propone una geometría de unión que muestra dos grupos de carboxilato de citrato que se unen a la superficie de coloide de la plata.

En el espectro Raman SERS de las AgNPs en combinación con la solución de AS a 200 mg/dL, se pudo observar un aumento en la intensidad Raman, a su vez se identificaron las bandas características en 1002, 1237 y 1391 cm^{-1} , atribuidas a las vibraciones del anillo de piranosa, acetamida y grupos carboxilo, respectivamente.

En cuanto al mecanismo de adsorción del AS a las AgNPs, Vinogradova et al. (2014) compararon la intensidad de la banda 1237 cm^{-1} observada en un espectro SERS de Cit-AgNPs con el espectro SERS de AgNPs-AS, este modo se atribuye a las vibraciones de estiramiento de los enlaces Ag-O y Ag-N, sugiriendo así que la

adsorción de AS en la superficie de las AgNPs se da a través del grupo carboxilo o amida, o ambos. De esta manera, para generar el efecto SERS, las moléculas de AS tienen que cruzar una barrera energética provocada por la repulsión electrostática de la cubierta de citrato antes de que puedan adsorberse directamente en las AgNPs cargadas positivamente o permanecer en las proximidades (menos de 10 Å) de su superficie (Biswas et al., 2007).

Para la evaluación de la concentración de AS en saliva, se analizaron 12 muestras de pacientes y 30 de grupo control, obteniendo una mediana (Q1-Q3) de concentración de 16.95 (12.2 – 20.7) mg/dL y 5.06 (3.1 – 6.9) mg/dL, respectivamente, la diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$), con ello se confirma que la expresión de AS se encuentra aumentada en las mujeres con CaMa.

Es importante mencionar que la medición de AS en saliva se considera un análisis reciente, ya que en sus primeras evaluaciones se obtenía la concentración sérica de AS no solo en CaMa sino en otras enfermedades. Es el caso de un estudio realizado por Stefenelli et al. (1985) en el cual se determinó la concentración de AS en 2,264 personas con diversos tumores malignos, infecciones bacterianas, enfermedades reumáticas y enfermedades hepáticas crónicas, así como en un grupo control, en este último se obtuvo una concentración media de 58.5 mg/dL, y dentro de los tumores malignos se evaluó el CaMa con una concentración media de 79.8 mg/dL, en la tabla 16 se puede observar las concentraciones obtenidas para las otras enfermedades. Así mismo, la concentración de AS no sólo se ve aumentada en neoplasias malignas sino también en procesos bacterianos, inflamatorios y reumatoides, es por eso la importancia de mencionar que la medición de este biomarcador se debe de realizar como un método complementario y no como único método de diagnóstico.

En otro estudio realizado por Hogan et al. (1980) midieron la concentración de AS en suero de 65 pacientes con CaMa y en 56 sujetos control, obteniendo una concentración media de 88.5 mg/dL y 51 mg/dL, respectivamente, sus resultados sugieren que las concentraciones séricas de AS pueden ser de valor complementario en la evaluación del estadio del tumor.

Sin embargo, no fue hasta Ozturk et al. (2011) realizaron un estudio piloto para evaluar la concentración de AS en saliva de 15 pacientes con CaMa en diferentes etapas y 10 individuos sanos como controles de la misma edad, obteniendo una concentración media de 4.7 mg/dL para el grupo control y 11.4 mg/dL para el grupo de pacientes, al igual que en las concentraciones obtenidas en muestras séricas, se puede observar que también existe una diferencia en su concentración respecto al grupo control.

Además, Hernández et al. (2017) también evaluaron la concentración de AS en una población mayor, en 100 mujeres con CaMa y en 106 mujeres sanas, implementando la síntesis de AgNPs y la espectroscopia Raman SERS para su medición, dentro de sus resultados obtuvieron una concentración media de AS de 4.7 mg/dL para el grupo control y de 18.3 mg/dL en las pacientes.

Siguiendo esta metodología, Hernández et al. (2019) realizaron la evaluación del AS en saliva en otro tipo de afecciones como el cáncer de ovario, gingivitis y periodontitis. Para el cáncer de ovario se evaluaron 52 pacientes con masas axiales programadas para intervención quirúrgica, 37 de ellas resultaron con masas axiales benignas y en 15 pacientes estas masas fueron cancerígenas, en cuanto a su concentración de AS fue de 5.1 mg/dL y 23.0 mg/dL, respectivamente.

Para la segunda parte de su estudio evaluaron a 30 mujeres sanas, 30 pacientes con diagnóstico de gingivitis y 33 pacientes con diagnóstico de periodontitis, en las cuales se obtuvo una concentración media de AS de 5.79 mg/dL, 12.98 mg/dL y 19.81 mg/dL, respectivamente (Hernández et al., 2019).

De acuerdo con los resultados anteriores, podemos observar que en nuestro estudio obtuvimos concentraciones medias de AS muy similares a los últimos estudios, el primero por Hernández et al. (2017) en el cual su grupo de pacientes con CaMa obtuvieron una concentración media de 18.3 mg/dL y nosotros de 18.15 mg/dL; en el segundo estudio realizado por Hernández et al. (2019), en su grupo control se obtuvo una concentración media de 5.79 mg/dL y nosotros de 5.51 mg/dL.

A su vez, se realizó una evaluación del AS en función del estadio clínico, los datos se dividieron en etapa I (mediana = 17.01 mg/dL), III (mediana = 14.44 mg/dL), III y IV (mediana = 19.21 mg/dL), estas últimas dos se agruparon en uno solo debido a que en el estadio IV solo se contaba con dos pacientes. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Hernández et al. (2017), etapa I (mediana=11.9 mg/dL), II (16.3 mg/dL), III y IV (20.7 mg/dL).

Con esto se comprueba que el AS se encuentra aumentado en varias enfermedades, sin embargo, en los últimos años se le ha dado prioridad a su medición en saliva, debido a que la obtención de la muestra no es invasiva en comparación de una muestra sanguínea. Además, su medición por Raman SERS para el CaMa es altamente prometedor, ya que se puede aplicar como biomarcador de diagnóstico complementario, independientemente de la edad o la densidad mamaria, las cuales son características que resultan inconvenientes para un diagnóstico convencional. Es por ello, que este biomarcador puede ser útil para la prevención del CaMa por estar al alcance de una población de mujeres jóvenes (< 30 años). También, en cuestión del tratamiento, su medición constante pudiera ser de utilidad clínica al momento de evaluar la respuesta de la paciente al mismo. Debido a que las concentraciones de AS tienen a disminuir conforme disminuye la carga tumoral.

Por otra parte, debido al número reducido de pacientes, se decidió evaluar los factores de riesgo modificables y no modificables en el grupo control, con el fin de representar lo que pudiera estar pasando entre las mujeres jóvenes de nuestra población.

Dentro de los resultados obtenidos (tabla 12) se puede observar que 17 participantes del grupo control presentan un IMC normal (media de 22.49 Kg/m²) y el resto un IMC de sobrepeso en promedio de 28.40 Kg/m². Sin embargo, aunque la mayoría presentó un IMC normal, 23 de las mujeres tuvieron un porcentaje de grasa corporal mayor a 35 %, lo cual es alarmante debido a que estos niveles de grasa corporal no solo se asocian con el riesgo de padecer CaMa, sino también para otro tipo de enfermedades, principalmente metabólicas y cardiovasculares. De igual forma, el 70 % de las mujeres del grupo control usaba AH y el 43.3 % no realizaba ningún tipo de actividad física. En

cuestión de factores no modificables, el 33.3 % presento su menarquía antes de los 12 años y el 63.4 % refirió tener historia familiar con algún tipo de cáncer.

De acuerdo con estos resultados, podemos observar que desde una temprana edad, la mujer ya puede estar presentando una serie de factores de riesgo para CaMa, en su mayoría mediados por exposición prolongada a hormonas endógenas o exógenas, principalmente en el tejido mamario (Feng et al., 2018; Sun et al., 2017; Rojas & Stuckey, 2016).

Dentro de los mecanismos cancerígenos del estrógeno se han propuesto dos vías, la primera es a través de la señalización del RE que altera la expresión genética, aumentando la proliferación y por lo tanto las mutaciones; y en la segunda se ve implicado su metabolismo oxidativo en metabolitos de quinona que pueden formar aductos despurinantes del ADN (Del Pup et al., 2019; Cavaliere & Rogan, 2014; Lavigne et al., 2001). Además, dentro de los factores no modificables, está la menarquía menor a 12 años y la menopausia tardía (después de los 55 años), la razón de ambos se da por una exposición prolongada a hormonas ováricas.

Un estudio realizado por Titus et al. (1998) demostró que las mujeres que comenzaban a tener la menstruación antes de los 12 años tenían aproximadamente un 50 % más de riesgo de CaMa que aquellas que presentaron la menarquía después de los 15 años. Por su parte, Trichopoulos et al. (1972) reportaron que las mujeres con menopausia natural a los 55 años o más tenían el doble de riesgo en comparación con la menopausia después de los 45 años.

En cuanto a los factores modificables, Biglia et al. (2013) evaluaron el IMC de 2,148 mujeres pre y posmenopáusicas con CaMa. Sus resultados muestran que las mujeres posmenopáusicas con un IMC mayor a 25 Kg/m² tenían un porcentaje significativamente mayor de tumores de ER+ que las mujeres con IMC normal, además de una asociación con un mayor tamaño del tumor. A su vez, Turkos et al. (2013) evaluaron a 818 mujeres premenopáusicas con CaMa no metastásico con un seguimiento de 29 meses, encontrando que las mujeres obesas (IMC mayor a 30

Kg/m²) tenían más probabilidades que las mujeres de peso normal de ser diagnosticadas con tumores de alto grado e invasión linfovascular. También, la resistencia a la insulina da como resultado una sobreestimulación del epitelio mamario mediado por estrógenos. Estos efectos imitan la proliferación y progresión de las células cancerosas, aumentando así el riesgo de CaMa y el desarrollo de un fenotipo agresivo. Con esto, la evidencia epidemiológica muestra que tener sobrepeso u obesidad se asocia con un mayor riesgo a distintos tipos de cáncer.

Se cree que el mecanismo que relaciona el exceso de grasa corporal con el aumento del riesgo de CaMa está vinculado con la insulina y los compuestos similares a la insulina, como factores de crecimiento. De esta manera, la hiperinsulinemia crónica (HC) disminuye la concentración de proteínas que se unen a factores de crecimiento, aumentando sus niveles circulantes, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el cual se ha asociado con el CaMa premenopáusico (Renehan et al., 2004; Renehan et al., 2006). Además se ha descubierto que la HC disminuye la concentración sanguínea de globulina fijadora de hormonas sexuales, lo que provoca un aumento de estrógenos circulantes (Kaaks et al., 2002).

Con base en lo anterior, otro factor modificable relacionado a su vez con el IMC es el sedentarismo, de manera contraria, el aumento de actividad física tiene efectos positivos sobre el estado físico, como reducción de la obesidad, efectos hormonales y reproductivos, entre otros. En un estudio de cohorte prospectivo, se encontró que las mujeres que realizaban regularmente actividad física a la edad de 35 años tenían una disminución del 14 % en el riesgo de CaMa. El mecanismo propuesto se basa en la disminución de la grasa corporal que conlleva a una disminución de la conversión periférica de andrógenos en estrógenos a través de la enzima aromatasa, así como a una disminución de la insulina y otros factores de crecimiento. Además la actividad física provoca un aumento de la globulina fijadora de hormonas sexuales por lo cual reduce la cantidad total de estrógeno circulante libre (McTiernan et al., 1998; McTiernan et al., 2003).

A diferencia de la edad en la que se presenta la menarquía y la menopausia o el comportamiento de estas, uno de los factores modificables que se han relacionado con la exposición a hormonas exógenas, es el uso de AH. Estos han retomado mayor relevancia desde que su uso aumentó en el estilo de vida de la mujer moderna, ya que esta exposición hormonal está muy por encima de la de las mujeres en poblaciones de fertilidad natural, y por lo tanto el comienzo de su uso se da en edades más tempranas y por intervalos de tiempo más prolongados antes del primer parto (Bonfiglio & Di Pietro, 2021; Lovett et al., 2017).

De acuerdo con la OMS, para el año 2020 el uso de AH entre las mujeres en edad reproductiva (15 a 49 años) aumentó a 851 millones (49 %) y en México, el último dato proporcionado por el ENADID en el 2018 fue de 17.6 millones que equivale a un 53.4 % . Desafortunadamente, los datos sobre su asociación y relación con el CaMa aún son controversiales y no concluyentes.

Se han realizado a lo largo del tiempo, estudios epidemiológicos analíticos, particularmente investigaciones de cohorte en los cuales evalúan asociación entre la administración exógena de hormonas sexuales femeninas, como anticonceptivos orales (AO) y el riesgo de CaMa (Peachman, 2018). Es el caso de Calle et al. (1996) realizaron un análisis de más de 150,000 mujeres de 54 estudios alrededor del mundo sobre la relación en el CaMa y el uso de AO, concluyendo que las usuarias actuales o recientes (mínimo 12 meses) de AO estuvieron expuestas a un mayor riesgo (riesgo relativo, RR=1.24), aunque este riesgo ya no era evidente 10 años después de suspender su uso. En 2014, Beaber et al. realizaron un estudio de casos y controles entre mujeres de 20 a 49 años, en el cual observaron que el uso reciente de las formulaciones de AO más nuevas se asoció con un aumento del 50 % en el riesgo de CaMa en comparación en el uso anterior o con nunca haber usado. Por su parte, otro estudio de cohorte prospectivo a nivel nacional en Dinamarca realizado por Mørch et al. (2017) evaluaron la asociación entre el uso de AH y el riesgo de CaMa en mujeres de 15 a 49 años, en comparación con las mujeres que nunca habían utilizado AH el RR entre las usuarias actuales y recientes de AH fue de 1.20. Los autores encontraron

que después de suspender el uso de AH, el riesgo de CaMa fue aún mayor entre las mujeres que habían utilizado AH durante 5 años o más respecto a las mujeres que no habían usado AH.

En el presente estudio también evaluamos el uso de AH, para ello dividimos a las mujeres sanas en dos grupos, aquellas que utilizaban AH (n=20) y en aquellas que no (n=10). Se realizó un análisis para determinar posibles diferencias en cuanto a la concentración media de AS entre ambos grupos, los cuales tuvieron una concentración de 5.45 mg/dL y 5.62 mg/dL, respectivamente (tabla 8).

De acuerdo con este análisis, dentro del grupo control la concentración de AS no presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.9942$) entre usar o no AH. Sin embargo, dentro del grupo de mujeres que utilizaban AH, el uso de tabletas orales fue el tipo más utilizado con un 60 %, seguido del parche transdérmico e implante subdérmico (15 % cada uno), así como inyecciones y DIU (5 % cada uno).

Nuevamente se realizó el análisis estadístico para la concentración media de AS, pero ahora con base en el tipo de AH utilizado, así como su duración promedio en meses (tabla 12). Las mujeres que utilizaban el implante presentaron una concentración media de AS de 5.86 mg/dL con una duración de 34.7 meses y, en el caso de las inyecciones, únicamente una mujer lo utilizaba y presentó una concentración de AS de 7.29 mg/dL con un tiempo de uso de 24 meses. Con estos tipos de AH, se obtuvieron concentraciones de AS por encima de la media en el total de los controles (5.51 mg/dL) y en total de los controles que usaban AH (5.45 mg/dL).

De esta manera, la exposición tanto endógena como exógena a hormonas sexuales a lo largo de la vida puede influir posteriormente en el desarrollo de CaMa debido a que las células mamarias son más susceptibles a los efectos cancerígenos de las hormonas desde el periodo prenatal hasta la pubertad y adolescencia, y hasta el primer embarazo a término por que la mama aún no ha completado la diferenciación celular (Bonfiglio & Di Pietro, 2021; Klijn et al., 2000).

Otro de los factores no modificables que también se evaluó fue la historia familiar de cáncer, ya que del 10 al 30 % de los casos de CaMa se atribuyen a la presencia de al menos un familiar de primer grado afectado (Feng et al., 2018; Dunning et al., 2009). Se puede observar en la tabla 9, que el 63.4 % de las mujeres del grupo control, refirió tener al menos un familiar afectado de cáncer. Lo anterior es relevante, ya que todas las enfermedades tienen un componente ambiental y genético, y en el caso específico del CaMa, en la mayoría de las ocasiones, las mujeres no toman en cuenta la carga genética que se puede llegar a tener, así como la presencia de otros factores no modificables. De esta manera, es de vital importancia que las mujeres en la actualidad identifiquen los factores de riesgo para así tomar decisiones más acertadas y evitar que aumente su predisposición a desarrollar CaMa a lo largo de su vida.

Sin embargo, dentro de la historia familiar se pueden presentar distintas mutaciones que van desde un componente hereditario fuerte con alta penetrancia, por ejemplo en el gen *BRCA1* o *BRCA2*, hasta aquellas de penetrancia intermedia o baja. En estas últimas se encuentran los SNP, que han tomado relevancia en los últimos años dentro del estudio del CaMa ya que varios de ellos se han evaluado en genes involucrados con la biosíntesis y metabolismo de los estrógenos, como es el caso del gen *ESR1* que codifica al RE, el cual se expresa en un 70 % del total de casos de CaMa.

En el presente estudio se evaluó el SNP en el gen *ESR1* denominado rs3020314, el cual se encuentra en el intrón 4 en la posición +2464 (C → T), lo cual genera un empalme de ARN y da lugar a un nuevo receptor (D5ER α) que carece de los dominios de unión a hormonas y activación de genes, ocasionando que el receptor se active constitutivamente en ausencia de estrógenos.

Desafortunadamente, al no lograr alcanzar el número de pacientes establecido, únicamente reportamos resultados preliminares en cuanto a la genotipificación del polimorfismo en el grupo control (tabla 14). También es importante mencionar que el SNP rs3020314 en específico no ha sido evaluado previamente en población mexicana y de acuerdo con la investigación bibliográfica realizada, este trabajo es el primer en abordarlo. Los SNP del gen *ESR1* evaluados en población mexicana incluyen

rs2234693, rs9340799, rs1884051, rs3798577, rs2077647, rs1801132, rs2234693 y rs9340799 (Carrillo et al., 2019; Cahua et al., 2015).

Dentro de los resultados preliminares obtenidos en el grupo control (n=30), se calculó una frecuencia alélica de 0.53 para C y 0.47 para T. Además, con la frecuencia de genotipos, la variante más frecuente fue la heterocigota (CT) con un 46.6 %, seguida de la variante homocigota silvestre (CC) con un 30.0 % y finalmente la variante homocigota mutada (TT) con un 23.4 %. Al no contar con un estudio de referencia en población mexicana para el SNP rs3020314, se decidió comparar la frecuencia alélica obtenida con las de otras poblaciones.

En un estudio realizado en mujeres sudanesas la frecuencia alélica fue de 0.537 para C y 0.463 para T (Gebreslasie et al., 2019), para mujeres de ascendencia africana su frecuencia alélica fue de 0.72 para C y 0.28 para T, y dentro de este mismo estudio se evaluaron a mujeres de ascendencia europea, las cuales tuvieron una frecuencia alélica de 0.28 para C y 0.72 para T (Quan et al., 2014). Para el caso de mujeres del reino unido, su frecuencia alélica fue de 0.31 para C y 0.69 para T (Dunning et al., 2009), la frecuencia alélica en población española es de 0.27 para C y 0.73 para T, a su vez, en este mismo artículo comparan estas frecuencias con las reportadas en Hapmap-CEU (residentes de Utah con ascendencia del norte y oeste de Europa) que fueron de 0.29 para C y 0.71 para T, y en Hapmap-HCB (Chino han en Beijing) que fueron de 0.81 para C y 0.19 para T (Velasco et al., 2010).

Con base en lo anterior, podemos deducir que la frecuencia alélica obtenida en nuestro estudio se asemeja con la obtenida en mujeres sudanesas, sin embargo, se recomienda disponer de una base de datos de al menos 200 alelos por locus (100 individuos) para estimar parámetros poblacionales y alelos precisos (Restrepo et al., 2019).

Por otra parte, se realizó un análisis multivariado con los datos obtenidos del grupo control a través de regresión logística para identificar de manera exploratoria factores

de riesgo para CaMa modificables y no modificables asociados con la presencia del SNP del gen *ESR1* (genotipo CT) (tabla 16).

Las variables consideradas en el modelo fueron: IMC (sobrepeso u obesidad), uso de AH, actividad física, menarquia (antes de los 12 años) e historia familiar con cáncer. Se determinó que no existe una asociación estadísticamente significativa entre los factores de riesgo antes mencionados y la presencia del SNP. Sin embargo, este resultado pudo verse afectado por la *n*, y no se descarta que en futuros estudios esta relación entre los factores de riesgo y la presencia del SNP sea significativa, al igual que en el estudio realizado por Gebreslasie et al (2019).

De acuerdo con lo anterior, se considera que es necesario aumentar la *n* con la finalidad de explorar y ampliar el conocimiento en el área de la genética y el CaMa en México, ya que el SNP del gen *ESR1* (rs3020314) puede representar un potencial como biomarcador de riesgo.

Limitaciones

En cuanto a las limitaciones del proyecto, se encuentra principalmente que no fue posible completar el número mínimo propuesto de pacientes con CaMa por diversos motivos en distintos espacios.

Además, otra limitación en cuanto a la realización del análisis de regresión logística fue la *n* de las voluntarias, debido a que para este análisis, los resultados de los 30 genotipos se subdividieron, por lo cual la *n* se redujo aun más. De esta manera, no se descarta totalmente que no exista una asociación significativa entre los factores de riesgo y el SNP.

Perspectivas

Aunque no se logró completar la *n* deseada para el grupo de las pacientes, se obtuvieron resultados muy interesantes, por lo cual dentro de las perspectivas para el trabajo sería no solo completar la *n* para el grupo de pacientes, sino también aumentar la *n* para ambos grupos. En lo que respecta a la genotipificación del SNP del gen *ESR1* (rs3020314) debido a que en nuestro estudio fue evaluado por primera vez en población mexicana, lo ideal sería aumentar la *n* mínimo a 100 participantes por grupo, además de incluir a mujeres posmenopáusicas en el grupo control para así tener las características descriptivas lo más similar posible y los resultados obtenidos puedan ser comparables estadísticamente.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se destaca la importancia de los factores de riesgo para CaMa, principalmente de los factores de riesgo modificables como el IMC, el porcentaje de grasa corporal, el uso de anticonceptivos hormonales y la actividad física, los cuales observamos que se encuentran presente en gran medida en una población joven. De esta manera, se considera indispensable identificar y evaluar el papel que desempeñan estos factores de riesgo modificables para así contribuir al desarrollo de estrategias de prevención primaria destinadas a reducir la incidencia del CaMa.

En cuanto a la evaluación de la concentración de ácido siálico, se comprobó que se encuentra aumentado en la saliva de pacientes con CaMa y de acuerdo con el método de análisis utilizado (Raman SERS) y al tipo de muestra no invasiva, es altamente prometedor para ser aplicado como un biomarcador de diagnóstico complementario, ya que, en comparación de los métodos convencionales, su evaluación no es influenciada por la edad de la mujer o la densidad mamaria. Desde el punto de vista preventivo, la determinación de AS como biomarcador de CaMa se encontraría al alcance de mujeres jóvenes (< 40 años) a diferencia de la mastografía. De igual forma, su constante monitorización en mujeres con CaMa que ya cuentan un tratamiento establecido, podría servir de referencia para el médico al momento de evaluar la respuesta al tratamiento.

Finalmente, en cuanto a los factores de riesgo no modificables, aunque solo pudimos obtener resultados preliminares sobre la genotipificación del SNP del gen *ESR1* (rs3020314), observamos que tiene potencial como un biomarcador de riesgo. Sin embargo, es necesario ampliar el estudio al aumentar n de ambos grupos y poder realizar un análisis más completo sobre la presencia de este polimorfismo en población mexicana, ya que hasta dónde se investigó, el presente trabajo es el primero en determinarlo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bardaweel, S., Akour, A., Al-Muhaisen, S., AlSalamat, H., & Ammar, K. (2019). Oral contraceptive and breast cancer: do benefits outweigh the risks? A case-control study from Jordan. *BMC women's health*, *19*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12905-019-0770-x>
- Beaber, E., Buist, D., Barlow, W., Malone, K., Reed, S., & Li, C. (2014). Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age. *Cancer research*, *74*(15), 4078-4089. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3400>
- Berrones, M., Velázquez, J., & Berrones, J. (2012). Expresión de ácidos siálicos en el cáncer cervicouterino. Estudio de una población del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, *17*(2), 115-118.
- Biglia, N., Peano, E., Sgandurra, P., Moggio, G., Pecchio, S., Maggiorotto, F., & Sismondi, P. (2013). Body mass index (BMI) and breast cancer: impact on tumor histopathologic features, cancer subtypes and recurrence rate in pre and postmenopausal women. *Gynecological Endocrinology*, *29*(3), 263-267. <https://doi.org/10.3109/09513590.2012.736559>
- Biswas, N., Kapoor, S., Mahal, H. S., & Mukherjee, T. (2007). Adsorption of CGA on colloidal silver particles: DFT and SERS study. *Chemical Physics Letters*, *444*(4-6), 338-345. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.07.049>
- Bonfiglio, R., & Di Pietro, M. (2021). The impact of oral contraceptive use on breast cancer risk: state of the art and future perspectives in the era of 4P medicine. In *Seminars in Cancer Biology*, *72*, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.10.008>

- Cahua, J., Cruz, M., Méndez, A., Antúnez, D., Vences, A., Alarcón, L., Parra, E., Tello, V., Leyva, M., Valladares, A., Pérez, C., & Flores-Alfaro, E. (2015). Polymorphisms in the LPL and CETP genes and haplotype in the ESR1 gene are associated with metabolic syndrome in women from southwestern Mexico. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21539-21554. <https://doi.org/10.3390/ijms160921539>
- Calle, E., Heath, C., Miracle, H., Coates, R., Liff, J., Franceschi, S., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Morabia, A., Schuman, L., Stewart, S., Szklo, M., Bain, C., Schofield, F., Siskind, V., Band, P., Coldman, A., ... Meirik, O. (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet*, *347*(9017), 1713-1727. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)90806-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90806-5)
- Carrillo, D., Figuera, L., González, G., Pérez, A., Mendoza, A., & Arreola, M. (2019). Association of rs2234693 and rs9340799 polymorphisms of ESR1 gene in breast cancer of Mexican population. *J BUON*, *24*(5), 1927-1933.
- Cavalieri, E., & Rogan, E. (2014). The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers. *Molecular aspects of medicine*, *36*, 1-55. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2013.08.002>
- Chávarri, Y., Villarreal, C., Liedke, P., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D., & Goss, P. (2012). Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *The Lancet Oncology*, *13*(8), 335-343. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70246-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70246-2)
- Del Pup, L., Codacci, G., & Peccatori, F. (2019). Breast cancer risk of hormonal contraception: Counselling considering new evidence. *Critical reviews in oncology/hematology*, *137*, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.03.001>

- Díaz, S., & Schiappacasse, V. (2017). ¿Qué y cuáles son los métodos anticonceptivos?. Instituto Chileno de Medicina Reproductiva. https://icmer.org/wp-content/uploads/2019/Temas_destacados/Anticoncepcion/Que-y-cuales-son-los-metodos-anticonceptivos-01122017-1.pdf
- Dunning, A., Healey, C., Baynes, C., Maia, A., Scollen, S., Vega, A., Rodríguez, R., Barbosa, N., Ponder, B., Low, Y., Bingham, S., Haiman, C., Marchand, L., Broeks, A., Schmidt, M., Hopper, J., Southey, M., Beckmann, M., Fasching, P., ... Chenevix, G. (2009). Association of ESR1 gene tagging SNPs with breast cancer risk. *Human molecular genetics*, 18(6), 1131-1139. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn429>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapapati, A., Luu, H., Haydon, R., He, T., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
- Finlay, J., & Sartorius, C. (2015). Steroid hormones, steroid receptors, and breast cancer stem cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 20, 39-50. <https://doi.org/10.1007/s10911-015-9340-5>
- Garimaldi, J., Demarchi, J., Puebla, L., Guerci, M., Medina, J., & Varea, E. (1983). El ácido siálico como marcador biológico en las neoplasias urológicas. *Revista Argentina de Urología*, 49(1), 9-10.
- Gebreslasie, A., Faggad, A., Zaki, H., & Abdalla, B. (2019). Association of ESR1 polymorphisms (rs3020314 and rs1514348) with breast cancer in Sudanese women. A pilot study. *Gene Reports*, 15, 100396. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100396>

- Gómez, L., Álvarez, R., Villarreal, C., Wegman, T., & Mohar, A. (2017). Breast cancer genetics in young women: What do we know?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 774, 33-45. <http://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.08.001>
- Hernández, A., Zermeño, J., Kolosovas, E., Velázquez, J., Vinogradova, E., Yacamán, M., & Navarro, H. (2017). Diagnosis of breast cancer by analysis of sialic acid concentrations in human saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles. *Nano Research*, 10, 3662-3670. <http://doi.org/10.1007/s12274-017-1576-5>
- Hernández, A., Zermeño, J., Martínez, M., Hernández, A., Ojeda, H., Yacamán, M., & Navarro, H. (2019). Determination of salivary sialic acid through nanotechnology: A useful biomarker for the screening of breast cancer. *Archives of medical research*, 50(3), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.05.013>
- Hernández, A. (2019). *Estudio del ácido siálico en saliva como biomarcador clínico para la implementación de una herramienta adicional en el tamizaje de cáncer cervicouterino, lesiones precancerosas y enfermedad periodontal* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Repositorio institucional: <http://www.fc.uaslp.mx/pca/investigacion/tesismt.html>
- Hernández, A., García, M., Hernández, A., Patiño, N., Vértiz, Á., Yacamán, M., & Navarro, H. (2019). Determination of sialic acid levels by using surface-enhanced Raman spectroscopy in periodontitis and gingivitis. *Oral diseases*, 25(6), 1627-1633. <https://doi.org/10.1111/odi.13141>
- Hogan, A., Fennelly, J., Jones, M., Cantwell, B., & Duffy, M. (1980). Serum sialic acid and CEA concentrations in human breast cancer. *British journal of cancer*, 41(4), 587-592. <https://doi.org/10.1038/bjc.1980.101>

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2022). *Estadísticas a propósito del día internacional de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre)*.
https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANMAMA22.pdf
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018). *Desciende la proporción de personas menores de 15 años de 27.5% en 2014 a 25.3% en 2018: ENADID 2018*.
<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodemo/ENADID2018.pdf>
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2017, 16 de marzo). *Tratamiento del cáncer de mama en segundo y tercer nivel de atención*. <http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc>
<http://www.cenetec.salud.gob.mx/contenidos/gpc/catalogoMaestroGPC.html>
- Kaaks, R., Lukanova, A., & Kurzer, M. (2002). Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 11(12), 1531-1543.
- Klijn, J. G., Setyono, B., & Foekens, J. (2000). Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids*, 65(10-11), 825-830.
[https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(00\)00195-1](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(00)00195-1)
- Lavigne, J., Goodman, J., Fonong, T., Odwin, S., He, P., Roberts, D., & Yager, J. (2001). The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer research*, 61(20), 7488-7494.
- Liang, L., Shen, Y., Zhang, J., Xu, S., Xu, W., Liang, C., & Han, B. (2018). Identification of breast cancer through spectroscopic analysis of cell-membrane sialic acid

- expression. *Analytica Chimica Acta*, 1033, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.072>
- Lovett, J., Chima, M., Wexler, J., Arslanian, K., Friedman, A., Yousif, C., & Strassmann, B. (2017). Oral contraceptives cause evolutionarily novel increases in hormone exposure: a risk factor for breast cancer. *Evolution, medicine, and public health*, 2017(1), 97-108. <https://doi.org/10.1093/emph/eox009>
- Mayoral, J., Moreno, A., & Martínez, E. (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 19.
- McTiernan, A., Kooperberg, C., White, E., Wilcox, S., Coates, R., Adams, L., Woods, N., & Ockene, J. (2003). Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *Jama*, 290(10), 1331-1336. <https://doi.org/10.1001/jama.290.10.1331>
- McTiernan, A., Ulrich, C., Slate, S., & Potter, J. (1998). Physical activity and cancer etiology: associations and mechanisms. *Cancer Causes & Control*, 9, 487-509. <https://doi.org/10.1023/a:1008853601471>
- Messinis, I., Messini, C., & Dafopoulos, K. (2014). Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reproductive biomedicine online*, 28(6), 714-722. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.003>
- Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad (2018). Clasificación Internacional de Enfermedades 10ª Revisión (CIE-10). https://www.sanidad.gob.es/estadEstudios/estadisticas/normalizacion/CIE10/CIE10ES_2018_diag_pdf_20180202.pdf
- Morales, D., & Vallejo, V. (2007). Expresión de ácido siálico y de la β -galactósido- α -2, 6-sialiltransferasa en cáncer. *Revista de Educación Bioquímica*, 26(3), 93-98.

- Mørch, L., Skovlund, C., Hannaford, P., Iversen, L., Fielding, S., & Lidegaard, Ø. (2017). Contemporary hormonal contraception and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(23), 2228-2239. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1700732>
- Munro, C., Smith, W., Garner, M., Clarkson, J., & White, P. (1995). Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance Raman scattering. *Langmuir*, 11(10), 3712-3720.
- Nagasundaram, M., Horstkorte, R., & Gnanapragassam, V. S. (2020). Sialic acid metabolic engineering of breast cancer cells interferes with adhesion and migration. *Molecules*, 25(11), 2632. <http://doi.org/10.3390/molecules25112632>
- Organización Mundial de la Salud (2023). *Planificación familiar / métodos anticonceptivos*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/family-planning-contraception#:~:text=Datos%20y%20cifras,satisfecha%20de%20anticoncep%3Bn%20\(1\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/family-planning-contraception#:~:text=Datos%20y%20cifras,satisfecha%20de%20anticoncep%3Bn%20(1))
- Ozturk, L., Emekli, E., Kasikci, E., Demir, G., & Yarat, A. (2011). Salivary total sialic acid levels increase in breast cancer patients: a preliminary study. *Medicinal Chemistry*, 7(5), 443-447. <https://doi.org/10.2174/157340611796799230>
- Pally, D., Pramanik, D., Hussain, S., Verma, S., Srinivas, A., Kumar, R., Everest, A., & Bhat, R. (2021). Heterogeneity in 2, 6-linked sialic acids potentiates invasion of breast cancer epithelia. *ACS central science*, 7(1), 110-125. <https://dx.doi.org/10.1021/acscentsci.0c00601>
- Peachman, R. (2018). Weighing the risks and benefits of hormonal contraception. *Jama*, 319(11), 1083-1084. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.0448>

- Pisarev, M., Calandra, R., & Juvenal, G. (2010). *Fisiopatología Endocrina: Bioquímica y métodos diagnósticos*. Separatas Montpellier.
<https://www.montpellier.com.ar/Uploads/Separatas/ENDO4.PDF>
- Porras, L., Ismail, H., & Mader, S. (2021). Positive Regulation of Estrogen Receptor Alpha in Breast Tumorigenesis. *Cells*, *10*(11), 2966. <https://doi.org/10.3390/cells10112966>
- Quan, L., Hong, C., Zirpoli, G., Roberts, M., Khoury, T., Sucheston, L., Bovbjerg, D., Jandorf, L., Pawlish, K., Ciupak, G., Davis, E., Bandera, E., Ambrosone, C., & Yao, S. (2014). Variants of estrogen-related genes and breast cancer risk in European and African American women. *Endocrine-related cancer*, *21*(6), 853-864. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0250>
- Reglero, Á., Bravo, I., & Martínez, V. (2007). Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, *73*(4), 833-871.
- Renehan, A., Frystyk, J., & Flyvbjerg, A. (2006). Obesity and cancer risk: the role of the insulin–IGF axis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *17*(8), 328-336. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.006>
- Renehan, A., Zwahlen, M., Minder, C., O'Dwyer, S., Shalet, S., & Egger, M. (2004). Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *The Lancet*, *363*(9418), 1346-1353. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16044-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16044-3)
- Restrepo, T., Martínez, M., Palacio, O., Posada, Y., Zapata, S., Gusmão, L., & Ibarra, A. (2011). Database sample size effect on minimum allele frequency estimation: Database comparison analysis of samples of 4652 and 560 individuals for 22 microsatellites in

- Colombian population. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), 13-14. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.08.006>
- Rodríguez, A., Córdova, M., González, A., Téllez, K., Marín, L., Santoyo, M., & Hernández, A. (2022). Evaluation of sialic acid concentrations and its association with the use of hormonal contraceptives. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 21(3), 89-98. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.22000081>
- Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clinical obstetrics and gynecology*, 59(4), 651-672. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>
- Secretaria de Salud (2022). *Boletín Epidemiológico – Número 52 – Volumen 39*. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/792216/sem52.pdf>
- Secretaria de Salud. NOM-005-SSA2-1993, De los servicios de planificación familiar. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4699269&fecha=30/05/1994#gsc.tab=0
- Secretaria de Salud. NOM-041-SSA-2011: Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5194157&fecha=09/06/2011
- Singh, B., Gautam, R., Kumar, S., Vinay, B., Nongthomba, U., Nandi, D., Mukherjee, G., Santosh, V., Somasundaram, K., & Umapathy, S. (2012). Application of vibrational microspectroscopy to biology and medicine. *Current science*, 102 (2).
- Stefenelli, N., Klotz, H., Engel, A., & Bauer, P. (1985). Serum sialic acid in malignant tumors, bacterial infections, and chronic liver diseases. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 109, 55-59. <https://doi.org/10.1007/BF01884255>

- Sun, Y., Zhao, Z., Yang, Z., Xu, F., Lu, H., Zhu, Z., Shi, W., Jiang, J., Yao, P., & Zhu, H. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Tecalco, A., Ramírez, J., & Cruz-Ramos, E. (2019). Estrogen receptor alpha and its ubiquitination in breast cancer cells. *Current drug targets*, 20(6), 690-704. <https://doi.org/10.2174/1389450119666181015114041>
- Titus, L., Longnecker, M., Newcomb, P., Dain, B., Greenberg, E. R., Mittendorf, R., Stampfer, M., & Willett, W. (1998). Menstrual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 7(9), 783-789.
- Tortora, G. & Derrickson, B. (2013). El ciclo reproductor femenino. En *Principios de anatomía y fisiología* (pp. 1159 – 1166). 13ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Trichopoulos, D., MacMahon, B., & Cole, P. (1972). Menopause and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 48(3), 605-613. <https://doi.org/10.1093/jnci/48.3.605>
- Tsang, J., & Tse, G. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*, 27(1), 27-35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>
- Turkoz, F., Solak, M., Petekkaya, I., Keskin, O., Kertmen, N., Sarici, F., Babacan, T. & Altundag, K. (2013). The prognostic impact of obesity on molecular subtypes of breast cancer in premenopausal women. *J buon*, 18(2), 335-41.
- Velasco, J., Hernández, J., Pérez, J., Zarrabeitia, M., Alonso, M., González, J., & Riancho, J. (2010). Haplotypes of intron 4 of the estrogen receptor alpha gene and hip fractures: a replication study in Caucasians. *BMC medical genetics*, 11, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-16>
- Vinogradova, E., Tlahuice, A., Velázquez, J., Larios, E., & Yacaman, M. (2014). Surface-enhanced Raman scattering of N-acetylneuraminic acid on silver nanoparticle

surface. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(9), 730-735.

<https://doi.org/10.1002/jrs.4544>

World Health Organization (2020). *Global cancer observatory (GLOBOCAN)*.

<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>

Zermeño, J., Martínez, M., Ramírez, A., Hernández, A., García, M., Hernández, A., Yacamán,

M., & Navarro, H. (2019). Determination of sialic acid levels by using surface-enhanced

Raman spectroscopy in periodontitis and gingivitis. Determination of sialic acid in saliva

by means of surface-enhanced Raman spectroscopy as a marker in adnexal mass

patients: ovarian cancer vs benign cases. *Journal of Ovarian Research* 11:61.

<https://doi.org/10.1186/s13048-018-0433-9>

GLOSARIO

BRCA1: gen localizado de manera normal en el cromosoma 17, que por lo general, ayuda a suprimir el crecimiento de las células. La persona que hereda la versión alterada o mutada del gen *BRCA1* tiene un riesgo mayor de contraer cáncer de mama, de ovario o de próstata (IMSS, 2017).

BRCA2: gen localizado de manera normal en el cromosoma 13, que por lo general, ayuda a suprimir el crecimiento de las células. La persona que hereda la versión alterada o mutada del gen *BRCA2* tiene un riesgo mayor de contraer cáncer de mama, de ovario o de próstata (IMSS, 2017).

Cáncer de mama: proliferación acelerada e incontrolada de células del epitelio glandular. Son células que han aumentado enormemente su capacidad reproductiva. Las células de CaMa pueden diseminarse a través de la sangre o de los vasos linfáticos y llegar a otras partes del cuerpo, adherirse a los tejidos y crecer formando metástasis (IMSS, 2017).

Cáncer de mama hereditario: a la condición transmitida genéticamente que incrementa el riesgo de cáncer de mama (Secretaría de Salud, 2011).

Ciclo menstrual: periodo de 28 ± 5 días comprendido entre dos menstruaciones durante el cual se lleva a cabo la maduración de folículos ováricos, la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo (Secretaría de Salud, 1993).

Edad fértil o reproductiva: etapa de la vida del hombre y la mujer durante la cual se posee la capacidad biológica de la reproducción (Secretaría de Salud, 1993).

Factor de riesgo: a la característica o circunstancia personal, ambiental o social de los individuos o grupos, asociada con un aumento de la probabilidad de ocurrencia de un daño (Secretaría de Salud, 1993).

Familiar de primer grado: padre, madre, hermano, hermana o hijo (IMSS, 2017).

Familiar de segundo grado: abuelos, tíos, sobrinos, medios hermanos (IMSS, 2017).

Ganglio: a la estructura diferenciada que se encuentra rodeada por una cápsula de tejido conjuntivo y algunas fibras elásticas que forma parte de las cadenas del sistema linfático (Secretaría de Salud, 2011).

Mastografía: estudio radiológico de las mamas, tomado con un aparato (mastógrafo), con el que se efectúan mamografías de tamizaje o diagnóstico (IMSS, 2017).

Mastografía de tamizaje: al estudio realizado para la detección temprana de cáncer de mama a mujeres aparentemente sanas (IMSS, 2017).

Mastografía diagnóstica: al estudio realizado como parte de la evaluación diagnóstica por resultado de imagen sospechosa o en mujeres con síntomas clínicos de patología mamaria sospechosa de cáncer (IMSS, 2017).

Menarca temprana: edad de la primera menstruación antes de los 12 años (IMSS, 2017).

Menopausia: cese de la menstruación que, generalmente, ocurre alrededor de los 50 años. Se considera que una mujer está en la menopausia cuando no ha tenido un periodo menstrual durante 12 meses seguidos (IMSS, 2017).

Menopausia tardía: cese de la menstruación a los 55 años o más (IMSS, 2017).

Método anticonceptivo: son utilizados para regular la capacidad reproductiva de un individuo o una pareja con el fin de evitar un embarazo (Secretaría de Salud, 1993).

Nódulo: a la agrupación celular o fibrosa en forma de nudo o corpúsculo, identificable por exploración clínica o imagen en dos planos en estudio mamográfico (Secretaría de Salud, 2011).

Nuligesta: a la condición de la mujer que nunca se ha embarazado (Secretaría de Salud, 2011).

Prevención primaria: a las medidas orientadas a evitar la aparición de una enfermedad o problema de salud, mediante el control de los agentes causales y

factores de riesgo. Tiene como intervenciones la promoción de la salud, la protección específica y la quimioprofilaxis (IMSS, 2017).

Prevención secundaria: a las medidas orientadas a detener o retardar el progreso de una enfermedad o problema de salud ya presente en un individuo en cualquier punto de su aparición. Tiene como intervenciones los programas de detección precoz y tratamiento oportuno para limitar el daño (IMSS, 2017).

Prevención terciaria: a las medidas orientadas a evitar, retardar o reducir la aparición de las secuelas de una enfermedad o problema de salud (IMSS, 2017).

Razón de momios (Odds ratio, OR): posibilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo de población frente al riesgo de que ocurra en otro. En epidemiología, la comparación suele realizarse entre grupos humanos que presentan condiciones de vida similares, con la diferencia de que uno se encuentra expuesto al factor de riesgo mientras que el otro carece de esta característica. Por lo tanto, la razón de momios es una medida de tamaño de efecto (IMSS, 2017).

Riesgo relativo (RR): es una razón, el rango de su valor oscila entre 0 e infinito. Identifica la magnitud o fuerza de la asociación, lo que permite comparar la frecuencia con que ocurre el evento entre los que tiene el factor de riesgo y los que no (IMSS, 2017).

Terapia de reemplazo hormonal (TRH): hormonas (estrógeno, progesterona o ambas) administradas a las mujeres después de la menopausia para reemplazar las hormonas que los ovarios ya no producen (IMSS, 2017).